

Separacijske metode za određivanje treće i četvrte generacije fluorokinolona

Tomljanović, Željka

Professional thesis / Završni specijalistički

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:311613>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Željka Tomljanović

SEPARACIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE TREĆE I ČETVRTE GENERACIJE

FLUOROKINOLONA

Specijalistički rad

Zagreb, 2019

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr.sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 20.05.2019. na Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr.sc. Biljana Nigović
2. Prof. dr. sc. Ana Mornar Turk
3. Dr.sc. Maja Lusina Kregar

Rad ima 79 listova.

PREDGOVOR

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Na odabir teme završnog specijalističkog rada najviše je utjecala želja za stručnim usavršavanjem iz područja analitičkih metoda te spoznaja važnosti razvoja separacijskih metoda za određivanje koncentracije fluorokinolona u farmaceutskim formulacijama i biološkim tekućinama, kao i ispitivanje profila čistoće njihovih dozirnih oblika.

Tijekom izrade rada susrela sam se s brojnim prednostima i nedostacima pojedinih metoda koje mogu poslužiti kao polazište za buduće istraživačke aktivnosti u području razvoja novih metoda za fluorokinolone.

Zahvaljujem mentorici prof. dr.sc. Biljani Nigović na ukazanom povjerenju, podršci i svim stručnim savjetima koji su mi bili potrebni za izradu specijalističkog rada.

Zahvaljujem suprugu i obitelji na pruženoj potpori tijekom studija.

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je dati detaljan pregled, opis i usporedbu analitičkih metoda za određivanje treće i četvrte generacije fluorokinolona u složenijim matricama (krv, serum, tkiva) te detaljnije objasniti primjenjivane tehnike za razdvajanje analita (HPLC i CE) i pripadajućih detektora (MS, UV, FLD). U radu će detaljno biti opisan utjecaj različitih čimbenika kao što su priprema uzoraka, odabir metode razdvajanja, način detekcije, sastav mobilne i vrsta stacionarne faze, kapilare, te izbora različitih instrumentalnih parametara kao što su tlak, temperatura, na uspješnost, točnost, preciznost i varijabilnost analize. Osim toga biti će uspoređene pojedine razvijene metode i validacijski parametri te istaknute prednosti i nedostaci svake od opisanih metoda.

MATERIJALI I METODE

U ovom radu, istraživanje je teorijskog karaktera i obuhvaća proučavanje stručne znanstvene literature dostupne iz različitih znanstvenih izvora kao što su PubMed, Science Direct, Embase, Web of Science i Scopus. Nakon pregleda literature biti će objašnjena načela različitih HPLC i CE tehnika s pripadajućim detektorima, njihova primjena, te prednosti i nedostaci. Zatim će biti opisani najznačajniji pripadnici fluorokinolona treće i četvrte generacije, njihova osnovna svojstva, značajke kao i mehanizmi djelovanja. Slijedi glavni dio istraživanja koji detaljno opisuje primjenu pojedinih analitičkih tehnika (HPLC i CE s pripadajućim detektorima) na određivanje koncentracija fluorokinolona treće i četvrte generacije u složenijim matricama (krv,

serum, tkiva), izbor parametara analize i metode pripreme uzoraka u ovisnosti o vrsti ispitivanog fluorokinolona, te prednosti i nedostatke svake od opisanih metoda.

RASPRAVA

Za analizu fluorokinolona treće i četvrte generacije, primjenjuju se mnoge metode tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) kombinirane s različitim načinima detekcije. Najčešće HPLC korištene tehnike su HPLC s ultraljubičastom detekcijom (HPLC-UV), HPLC s detekcijom fluorescencije (HPLC-FLD) i HPLC s masenom detekcijom (HPLC-MS). Druga najčešće korištena tehnika je kapilarna elektroforeza (CE) kombinirana s UV ili FLD detekcijom.

Svaka od navedenih tehnika zahtjeva pravilnu pripremu uzoraka ovisno o kojem se tipu matrice i ispitivanog fluorokinolona radi. Farmaceutske formulacije su najmanje složene matrice te je potrebno samo razrijeđivanje. Fiziološke tekućine (krv, žuč, slina, urin) i homogenati tkiva zahtijevaju složeniju pripremu uzoraka zbog prisutnosti endogenih supstancija koje mogu otežati detekciju.

Osim pripreme i odabira analitičke tehnike, ključan faktor je optimizacija uvjeta analize (izbor odgovarajućeg pufera, dodanih tvari, kapilare, vrste kolone, temperature, tlaka, napona i sl.).

U ovom radu prikazane su značajke i navedeni su podaci i točni parametri do sada razvijenih i validiranih metoda analize različitih fluorokinolona treće i četvrte generacije u različitim vrstama matrica. Također su detaljno navedeni podaci o ponovljivosti, brzini izvođenja, složenosti i točnosti pojedine vrste analize kao i granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ) u vidu usporedbe navedenih metoda.

ZAKLJUČAK

U ovom radu predstavljene su informacije o različitim analitičkim i separacijskim metodama te stoga mogu biti korisne pri odabiru postupaka za određivanje razina antimikrobnih lijekova. Glavni problemi koji se susreću prilikom analize su loša simetrija kromatografskih vrhova i razlučivanje. Odabir sastojaka smjese i njihov udio u smjesi, odabir odgovarajućih metoda za pripremu uzoraka te odabir načina detekcije su ključni za uspjeh analize u ovisnosti o ispitivanom fluorkinolonu i matrici. Ukoliko nije moguće primjeniti najbolju metodu detekcije, dodavanje internog standarda omogućuje nadoknadu gubitka analita i ponovljivost analize.

SUMMARY

OBJECTIVES

Objective of this research work was to provide detailed view, description and comparison of different analytical methods for determination of third and fourth generation of fluorokinolones in complex matrices such (blood, serum and tissue homogenates) and to explain in detail the principles of the two of the most used analytical methods for separation of analites (HPLC and CE) and corresponding detection methods (MS, UV, FLD). In this work, a detailed explanation of impact of various factors such as sample preconditioning method, separation method, detection method, mobile and stationary phases components, capillary, and various parameters such as temperature, pressure, additional substances on method success rate, accuracy, precision and variability will be described. In addition, various developed and validated mehtods and validation parameters will be compared and cons and pros of every method will be noted.

MATERIALS AND METHODS

In this work, research is theoretical and comprises studying of professional scientific literature available from various scientific sources such as PubMed, Science Direct, Embase, Web od Science and Scopus. After literature overview, principles of various HPLC and CE methods with corresponding detectors is explained as well as their applications pros and cons. Next, the main representatives of third and fourth generation of fluorokinolones are described, their main characteristics, properties, as well as action mechanisms. In the main part of this research, a detailed explanation of aplication of different analytical methods (HPLC and CE with corresponding detectors) on determination of concentrations of fluorokinolones of third and

fourth generations in complex matrices (blood, serum, tissues), selection of analysis parameters and sample preconditioning methods depending on the type of analyzed fluorkinolone is given as well as pros and cons of each described method.

DISCUSSION

Various analytical methods of high performance liquid chromatography (HPLC) combined with various detection techniques are used for determination of third and fourth generation fluorokinolones. The most commonly used are HPLC with ultraviolet detection (HPLC-UV), HPLC with fluorescence detection (HPLC-FLD) and HPLS with mass detection (HPLC-MS). The other most commonly used method is capillary electrophoresis (CE) combined with UV or FLD detection.

Each one of mentioned methods demands proper sample preconditioning depending on the matrix type and analyzed fluorkinolone. Pharmaceutical formulations are the least complex matrices and only dilution is required. Physiological liquids (blood, bile, saliva, urine) and tissue homogenates require more complex sample preconditioning because of the presence of endogenous substances which can have negative impact on detection.

Additional to sample preconditioning and selected analytical method, a key factor is optimization of analysis conditions (selection of proper puffer, additinal substances, capliary, column type and parameters such as tepmerature, pressure, voltage etc.)

In this research, properties, data and precise parameters for present developed and validated analytical methods for determination of third and fourth generation flourokinolones in various matrix types are presented. Additionally, the precise information regarding repeatability, speed,

complexity, accuracy, precision is given as well as levels of detection (LOD) and levels of quantification (LOQ) in order to compare described methods.

CONCLUSION

In this research work, information regarding various analytical methods and separation techniques is presented which can be useful in selection of methods for determining levels of antimicrobial drugs. Main problems that are encountered during the analysis are peak trailing and low resolution. Selection of compounds and their volume in the mixture, selection of proper methods for sample preconditioning and selection of the detection method are crucial for analysis success depending on the analysed fluorkinolone and matrix. If it is not possible to apply the best detection method, addition of internal standard enables compensation for loss of the analyte and repeatability of the analysis.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	3
3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI.....	4
3.1. FLUOROKINOLONI	4
3.1.1. Mehanizam djelovanja fluorokinolona	6
3.1.2. Otpornost bakterija na fluorokinolone	8
3.1.3. Antimikrobni spektar	11
3.1.4. Farmakokinetika i farmakodinamika	14
3.1.5. Klasifikacija fluorokinolona	15
3.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC).....	21
3.2.1. Mehanizam separacije u HPLC-u	21
3.2.2. Podjela HPLC metoda.....	24
3.2.3. Detektori za HPLC sustave	26
3.2.3.1. UV – VIS DETEKTOR	26
3.2.3.2. DAD DETEKTOR.....	26
3.2.3.3. FLD DETEKTOR.....	27
3.2.3.4. MASENI SPEKTROMETAR.....	28
3.2.4. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.....	32
3.3. KAPILARNA ELEKTROFOREZA.....	34
3.3.1. Mehanizam separacije u kapilarnoj elektroforezi	34

3.3.2. Vrste kapilarne elektorforeze	38
3.3.3. Primjena kapilarne elektroforeze u farmaciji	46
4. RASPRAVA	49
4.1 ODREĐIVANJE FLUOROKINOLONA TREĆE GENERACIJE	50
4.2. ODREĐIVANJE FLUOROKINOLONA ČETVRTE GENERACIJE.....	58
5. ZAKLJUČAK	66
6. LITERATURA	68
7. POPIS KRATICA	79
8. ŽIVOTOPIS	80

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Fluorokinoloni su jedni od najpoželjnijih i najviše istraživanih područja suvremene antinfektivne terapije pokazujući široku primjenu i snažno djelovanje. Oni imaju relativno jednostavnu molekulsku strukturu koja je pogodna za mnoge strukturne modifikacije. Ovi agensi imaju nekoliko poželjnih svojstava kao što su izvrsna biodostupnost, dobra permeabilnost i relativno niska učestalost štetnih i toksičnih učinaka [1]. Otkriveno je da su učinkoviti u liječenju različitih zaraznih bolesti.

Djelovanje fluorokinolona snažno ovisi o njihovoj koncentraciji. Farmakodinamički parametri koji najbolje opisuju njihovu učinkovitost su površina ispod koncentracijsko-vremenske krivulje do minimalne koncentracije inhibitora (AUC/MIC) i maksimalne koncentracije lijeka u plazmi do minimalne koncentracije inhibitora (C_{max}/MIC) [2]. Optimalna vrijednost ovih parametara osigurava učinkovitu farmakoterapiju bakterijskih bolesti i time sprječava bakterijsku otpornost i nedostatak terapijske učinkovitosti. Istraživanja otpornosti bakterija na fluorkinolone pokazala su da je otpornost iznimno rijetka među klinički bitnim bakterijama, međutim nisu isključila mogućnost da u budućnosti određene mutacije kod bakterija mogu dovesti do otpornosti na fluorkinolone. Otpornost *Streptococcus pneumoniae* na beta-laktamske antibiotike i ostale antimikrobne lijekove dovela je do uključivanja fluorokinolona kao prvog izbora u liječenju infekcija. Postoji vjerojatnost da povećana upotreba fluorkinolona u spomenutom liječenju može dovesti do rezistencije na fluorokinolone [3]. Razumijevanje farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava, omogućuje odabir najmoćnijeg fluorokinolona.

U dosadašnjim istraživanjima razvijene su, opisane i validirane različite analitičke metode za određivanje koncentracije fluorokinolona. Većina metoda temelji se na HPLC tehnici reverzne

faze zbog dobre topljivosti fluorokinolona u vodi. Najčešće primjenjeni detektori su mjerenja apsorbancije u UV području (UV ili DAD; dioda-array detector) i fluorescencijski detektor (FLD) [4,5]. Međutim ako je potrebna niža razina kvantifikacije može se primijeniti masena detekcija (MS). Slijedeća tehnika razdvajanja koja se može primijeniti za fluorokinolone je kapilarna elektroforeza kombinirana (CE) s UV ili FLD [6]. Ove metode zahtijevaju relativno malu količinu analita. CE se također može primijeniti za kvantifikaciju fluorokinolona u različitim matricama. U usporedbi s kromatografskim metodama, razdvajanje u CE je složenije jer postoji više čimbenika koji utječu na razlučivanje sastavnica uzorka (pH, ionska jakost pufera, napon, temperatura, duljina i vrsta kapilara).

Brojnim istraživanjima došlo se do spoznaje da glavni problemi koji mogu nastati tijekom analize su prekrivanje kromatografskih vrhova i loše razlučivanje. Ostali problemi koje treba razmotriti u razvoju nove analitičke metode su priprema uzorka i odabir odgovarajućeg načina detekcije. U kvantitativnoj analizi primijenjena metoda mora biti prikladna za predviđenu koncentracijsku razinu analita, upotrijebljenu matricu i cilj analize [7]. Metode analiza primijenjene u biološkim uzorcima moraju imati nižu razinu detekcije i granicu kvantifikacije nego metode analize koje se izvode u farmaceutskim dozirnim oblicima ili vodenoj otopini lijekovite supstancije i zahtijevaju odgovarajuću složeniju pripremu uzorka (precipitacija proteina ili ekstrakcija) prije analize. Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) snažno ovise o matrici uzorka i primijenjenom detektoru. LOD i LOQ bile su čak reda veličine od 10^{-9} g/mL za fluorescencijsku detekciju. Fluorokinoloni treće i četvrte generacije su antibakterijska sredstva za koja su koncentracije u krvi i drugim biološkim tekućinama reda mg/L te stoga često nije potrebna vrlo niska razina detekcije ili kvantifikacije.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

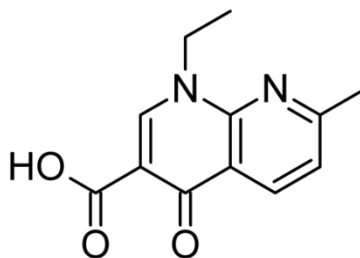
U ovom radu dat će se detaljan pregled i objašnjenje analitičkih metoda za određivanje koncentracije pojedinih fluorokinolona treće i četvrte generacije. Objasnit će se najčešće korištene metode određivanja koncentracija fluorokinolona u složenijim matricama (krv, serum, homogenati tkiva) kao i načela rada separacijskih metoda (HPLC i CE) s pripadajućim detektorima (UV, FLD, MS). U radu će se prikazati uspješnost provođenja analize u ovisnosti o odabranim sastavnicama mobilne faze, vrstama stacionarne faze, načina detekcije i ostalih instrumentalnih parametara metoda. Provest će se usporedba razvijenih metoda i validacijskih parametara te istaknuti prednosti i nedostaci pojedinih metoda.

3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1. FLUOROKINOLONI

Kinoloni su skupina sintetskih antibiotika sa širokim spektrom aktivnosti protiv mnogih klinički važnih patogena koji su odgovorni za različite infekcije, uključujući: infekcije mokraćnog sustava, gastrointestinalne infekcije, infekcije respiratornog trakta, spolno prenosive bolesti i infekcije kože. Primarno se koriste protiv infekcija mokraćnog sustava i također su klinički korisni kod prostatitisa, infekcija kože i kostiju te spolno prenosivih bolesti [8]. U početku su se kinoloni uglavnom koristili u liječenju gram-negativnih infekcija, ali su kasnije modificirani kako bi se poboljšala njihova farmakokinetička svojstva i proširio spektar antibakterijskog djelovanja, postajući učinkoviti protiv širokog spektra gram-negativnih i gram-pozitivnih patogena [1,3].

Kinoloni, lijekovi koji pripadaju naftidrinskoj skupini, dostupni su od šezdesetih godina prošlog stoljeća, a otkriveni su u procesu sinteze i purifikacije klorokina koji je djelovao protiv nekih gram-negativnih bakterija, a imao je ograničenu korisnost zbog visokog vezivanja proteina (približno 90%) i malog vremena poluživota (oko 1.5 h) [9]. Nažalost, bakterije su razvile brzu otpornost na ovaj lijek. Prvi predstavnik kinolona je nalidiksična kiselina, koja je 1962. godine uvedena u kliničku upotrebu za liječenje nekompliciranih infekcija mokraćnog sustava izazvanih crijevnim bakterijama (slika 1).



Slika 1 Nalidiksična kiselina

Nakon uvođenja nalidiksične kiseline 1962 godine, sintetizirano je više od 10.000 analoga, ali samo je nekoliko kinolona prve generacije: oksolinska kiselina, pipemidinska kiselina i cinoksacin, sintetizirano i uvedeno u kliničku praksu. Kinoloni su 1980-tih godina, razvojem druge generacije spojeva postali široko korištena klasa lijekova. Novija generacija fluorokinolona: norfloksacin, ciprofloksacin i ofloksacin, pokazivali su znatno poboljšanu aktivnost protiv DNA giraze, veće prodiranje u gram-pozitivne bakterije, te pojačana farmakokinetička i farmakodinamička svojstva [10].

Svi klinički važni spojevi klase fluorokinolona su sintetski fluorirani analozi nalidiksične kiseline, 1,8-naftiridina i posjeduju 4-kinolonsku jezgru. Najvažnije modifikacije kinolonske strukture bile su uvođenje fluora na položaju C-6 i glavni prstenasti supstituent (piperazin ili metil-piperazin) na položaju C-7 [1, 11]. Zbog uvođenja fluora, kinoloni se često nazivaju "fluorokinoloni". Prvi predstavnik ove generacije bio je norfloksacin, međutim, ciprofloksacin je bio prvi fluorokinolon koji je pokazao značajniju antibakterijsku aktivnost.

Nakon gotovo trideset godina u kliničkoj uporabi, ciprofloksacin ostaje jedan od najčešće propisivanih antimikrobnih lijekova, a Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) navodi ga kao bitan lijek i kritički važan antibiotik. Klinički uspjeh ciprofloksacina dovodi do razvoja kinolona

novije generacije (levofloksacin, moksifloksacin, gatifloksacin, itd.) s još širim i različitim spektrom aktivnosti i farmakokinetičkim svojstvima [10,12].

Zbog svoje djelotvornosti, širokog spektra aktivnosti, oralne biorasploživosti i općenito dobrog sigurnosnog profila, fluorokinoloni su se opsežno koristili za više kliničkih indikacija širom svijeta. Kinoloni kao jedna od najčešće korištenih klasa antimikrobnih lijekova propisivani su za liječenje infekcija mokraćnog sustava, infekcija dišnih puteva (npr. kronični bronhitis i tuberkuloza), infekcije kože i mekog tkiva, infekcije kostiju i zglobova, intraabdominalne infekcije, spolno prenosive bolesti i dr. Međutim, zbog široke uporabe (i prekomjerne upotrebe ovih lijekova) u humanoj i veterinarskoj medicini, unatoč propisivanju smjernica, danas se preporučuje korištenje kinolona s oprezom budući da broj bakterijskih sojeva rezistentnih na kinolon stalno raste [3, 10].

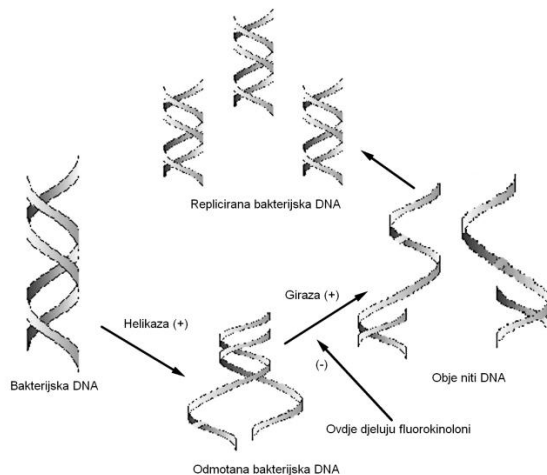
3.1.1. Mehanizam djelovanja fluorokinolona

Fluorokinoloni djeluju inhibicijom aktivnosti dvaju bitnih bakterijskih enzima topoizomeraze tipa II (DNA giraza) i topoizomeraze tipa IV, koje su potrebne za replikaciju bakterijske DNA, transkripciju, popravak i rekombinaciju. Topoizomeraze su enzimi koji održavaju DNA u replikacijskim i nereplikacijskim područjima bakterijskog kromosoma. Postoje četiri topoizomeraze: topoizomeraza I, topoizomeraza II (DNA giraza), topoizomeraza III i topoizomeraza IV. Fluorokinoloni djeluju inhibicijski na topoizomerazu II i IV, dok na topoizomerazu I i III ne djeluju [13]. Topoizomeraza IV vraća kovalentno zatvaranje DNA niti i uklanja nedostatke u molekuli dok DNA giraza osigurava superkoiling, uz održavanje čvrsto zapakirane spiralne strukture DNA. Dakle, DNA-giraza i topoizomeraza tipa IV osiguravaju

procesne neophodne za normalno funkcioniranje bakterijske stanice i održavanje stabilnosti njegovih staničnih struktura.

DNA giraza i topoisomeraza IV su A2B2 heterotetramer enzimi sastavljeni od dva para identičnih podjedinica, GyrA2 GyrB2 i ParC2 ParE2 (ili GrlA2GrlB2). Podjedinica ParC homologna je s podjedinicom GyrA, dok je podjedinica ParE homologna s podjedinicom GyrB [14]. Unatoč njihovim općim funkcionalnim i strukturnim sličnostima, DNA giraza i topoisomeraza IV imaju različite fiziološke funkcije. DNA giraza je enzim koji uvija prstenastu bakterijsku DNA na tisuću puta manju duljinu da bi se mogla smjestiti u bakteriju. Superuzvojnica DNA se pomoću DNA giraze također prevodi u relaksirani oblik, odnosno provodi se negativno superuvijanje odnosno rasplitanje dvostruke uzvojnice DNA pred replikacijskim rašljama, što je važno u početnoj fazi umnožavanja DNA. Bez djelovanja ovog enzima se jako uvijena bakterijska DNA ne bi mogla umnožavati [14,15]. Ovaj proces uključuje prekidanje dvolančane DNA, dovođenje segmenta DNA koji se razmata preko mjesta prekida, te reakcija završava ponovnim povezivanjem prekinutih lanaca. Fluorokinoloni djeluju tako da stabiliziraju kompleks između DNA giraze i DNA, odnosno stvaraju nepovratno povezane spojeve što dovodi do prekida umnožavanja DNA. Trenutni prekid umnožavanja DNA zbog djelovanja fluorokinolona može se potumačiti stvaranjem kovalentnih spojeva pred replikacijskim rašljama [15]. Srazom ovog kompleksa s replikacijskim rašljama započinje niz događaja, koji uključuju aktivaciju SOS sustava, koji u konačnici dovode do smrti stanice. Nakon završenog umnožavanja DNA, topoisomeraza IV odjeljuje DNA lance koji nastaju tijekom umnožavanja, što olakšava njihovu podjelu u stanice nakon diobe [14,15]. Fluorokinoloni djeluju na topoisomerazu IV i blokiraju razdvajanje novonastalih lanaca DNA, te tako inhibiraju umnožavanje DNA. Taj je proces spor jer topoisomeraza IV ima primarnu ulogu

iza replikacijskih rašlji, pa tako staničnim mehanizmima preostaje više vremena za popravak lezije DNA [15].



Slika 2 Mehanizam djelovanja fluorokinolona

Fluorokinoloni ciljaju DNA girazu i topoizomerazu IV s različitim učinkovitostima u različitim bakterijskim vrstama. Tako je kod gram pozitivnih bakterija više zahvaćena topoizomeraza IV, dok je kod gram negativnih više zahvaćena DNA giraza.

3.1.2. Otpornost bakterija na fluorokinolone

Pretjerana i nekontrolirana uporaba kinolona u kliničkoj i veterinarskoj medicini dovodi do sve veće otpornosti bakterija te smanjuje učinkovitost kinolona za buduću primjenu. Taj dugotrajni selektivni antimikrobni pritisak povezuje se s otpornošću bakterija na antibiotike [16]. Ova otkrića navode na potrebu kontinuiranog praćenja otpornosti na kinolone kod bakterijskih patogena. Mehanizam otpornosti na fluorokinolone je konzistentan među trenutno korištenim klasama lijekova i očekuje se da će tako biti i za novorazvijene lijekove. Pretjerana uporaba

jednog predstavnika kinolona dovodi do razvoja otpornosti na cijelu kinolonsku skupinu antibiotika [13].

Otpornost bakterija na kinolone nastaje raznolikim mehanizmima i ima značajan klinički utjecaj:

➤ Modifikacija ciljne molekule mutacijom

Najčešći mehanizam otpornosti na kinolone uočen kod mnogih bakterijskih vrsta je promjena ciljne molekule topoizomerase mutacijama koje smanjuju afinitet za kinolone bez ugrožavanja enzimske funkcije. Mutacije povezane s otpornošću smještene su u diskretne regije enzimskih podjedinica (eng. quinolone resistance determining regions – QRDRs). U većini slučajeva zamjene aminokiselina unutar QRDR uključuju zamjenu hidroksilne skupine s velikim hidrofobnim dijelom koji mijenja geometrijsku strukturu molekule enzima i na taj način sprječava vezanje molekule kinolona [16,17]. Kod gram-negativnih bakterija, DNA giraza je primarna ciljna molekula i prvi stupanj mutacija koji dovodi do otpornosti na kinolone obično se dešava na QRDR podjedinicama giraze GyrA ili GyrB. Iako se za kinolone smatra da primarno djeluju na A podjedinicu giraze, postoje mutacije i u B jedinici giraze koje također stvaraju otpornost na kinolone kod nekih vrsta, međutim one su rjeđe. Najčešće mutacije koje dovode do otpornosti na fluorokinolone su mutacije na genu GyrA na poziciji 248 koja dovodi do zamjene serina, dok ona na poziciji 249-250 dovodi do zamjene asparaginske kiseline. Mutacija koja dovodi do zamjene serina na poziciji 83 s leucinom ili triptofanom manifestira se kao visoki stupanj otpornosti na kinolone, dok zamjena s alaninom dovodi do niskog stupnja otpornosti na kinolone [16]. Općenito, primarna ciljna molekula svakog kinolona kod bakterijske vrste može biti određena mjestom mutacije prvog stupnja koje je odabrano prilikom izloženosti kinolonima. Kombinacije višestrukih mutacija na pojedinim ciljnim molekulama također mogu povećati razinu otpornosti. Na primjer uočeno je da su kombinacije višestrukih mutacija kod GyrA

proteina povezane sa višim vrijednostima minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za ciprofloksacin nego kod jednostrukih mutacija. O broju mutacija na genima ovisi da li će otpornost na kinolone biti vrlo niska - MIC od 0,125 do 0,5mg/L (jedna mutacija), umjerena – MIC 1 - 4 mg/L (dvije mutacije), visokog stupnja – MIC 8 - 64 mg/L (tri točkaste mutacije), odnosno najvišeg stupnja – MIC $128 \geq$ mg/L (četiri točkaste mutacije) [16]. Mutacije se mogu javiti brzo tijekom liječenja kinolonima i mogu biti značajan čimbenik koji ograničava uporabu ovih antibiotika.

➤ Otpornost na kinolone zbog smanjenog unosa/aktivnog izlučivanja

Drugi važan mehanizam otpornosti na fluorokinolone je aktivno izlučivanje lijeka iz stanice. DNA giraza i topoisomeraza IV se nalaze u citoplazmi bakterijske stanice. Da bi doprijeli do njihove ciljane molekule, kinolonski antibiotici moraju proći staničnu membranu. Kod gram-negativnih bakterija, fluorokinoloni moraju najprije proći vanjsku membranu. Ulaz u stanicu se odvija kroz porine [16]. Porini su kanali kroz koje molekule prolaze kroz staničnu membranu. Smanjena aktivnost porina bitan je mehanizam otpornosti antibiotika kod gram-negativnih bakterija. Ove mutacije podižu granice tolerancije antibiotika četverostruko i rezultiraju ili u smanjenom stvaranju proteina vanjske membrane ili u stimuliranom sustavu pumpe koji dovode do aktivnog izlučivanja lijeka. Ovaj tip otpornosti opisan je kod *E.coli*, *P.aeruginosa* te kod *S.aureus*, koji nema vanjsku membranu.

U posljednje vrijeme, plazmidsko-kodirani sustavi za izlučivanje kinolona su također uočeni kod *Enterobacteriaceae*, konkretno QepA i OqxAB. QepA je pumpa za izlučivanje koja spada u skupinu glavnih transportnih molekula (engl. Major Facilitator Superfamily – MFS) koja može izlučivati neke kinolone uključujući nalidiksičnu kiselinu, ciprofloksacin i norfloksacin povećavajući MIC do 64 puta. OqxAB je efluksna pumpa RND tipa koja može istisnuti neke

kinolone uključujući nalidiksičnu kiselinu i ciprofloksacin što dovodi do umjerenog povećanja MIC (8-16 puta) za ove spojeve.

➤ Otpornost na kinolone zaštitom ciljne molekule

Stečena otpornost na kinolone zaštitom ciljne molekule topoizomerase otkrivena je u kasnim 1990-im godinama i bila je prvi primjer plazmidski kodiranog prijenosnog mehanizma otpornosti na kinolone. Zaštita ciljne molekule je omogućena djelovanjem malih pentapeptidnih proteina koji se nazivaju Qnr proteini, koji su kodirani genom qnr i vežu se za ciljne molekule topoizomerase i štite ih od interakcije sa kinolonima.. Plazmid pMG252 koji nosi gen qnr nosi još čitav niz gena vezanih za otpornost bakterija, a kao posljedica toga potvrđena je povezanost otpornosti na kinolone i β -laktamske antibiotike [16]. Također su otkriveni novi plazmidni geni odgovorni za otpornost na kinolone, qnrB i qnrS koji kodiraju pentapeptide i sličnost u slijedu aminokiselina s bjelančevinom QnrA iznosi 40%. Plazmidi, odnosno geni porodice qnr odgovorni su za kinolonsku otpornost niskog stupnja, no klinički su značajni jer mogu pojačati ostale oblike otpornosti, nastale zbog kromosomskih mutacija te pojačane aktivnosti efluksne pumpe [18].

3.1.3. Antimikrobni spektar

Zabilježene su mnoge studije o aktivnosti fluorokinolona [11,19]. Noviji fluorokinoloni karakteristični su po povećanom spektru antimikrobne aktivnosti protiv klinički važnih patogena kao što je *S. pneumoniae*, *Enterococcus spp*, *S. pyrogenes*, *S. aureus* i izolati rezistentni na više lijekova [11]. Općenito, ovi lijekovi imaju izvrsnu aktivnost protiv *Enterobacteriaceae*, gram-negativnih bakterija i *Pseudomonas aeruginosa*, umjerenu aktivnost protiv stafilokoka,

mikobakterija, klamidije, mikoplazma i ureaplazma, te manju aktivnost na streptokoke (osobito skupina D. streptokoki) i anaerobne bakterije. Termin "post antibiotski učinak" opisuje kontinuirano suzbijanje rasta organizama nakon kratkotrajnog izlaganja antibakterijskom sredstvu tako da postoji inhibitorni učinak u odsutnosti antibiotika. Pokazalo se da takav učinak fluorokinolona iznosi 4-8 sati protiv *E. coli*, *Klebsiella*, *Serratia* i *Pseudomonas aeruginosa* [19].

→ Aktivnost protiv gram pozitivnih organizama

Streptococcus pneumoniae najčešći je uzrok infekcija respiratornog trakta, a sojevi koji su otporni na peniciline i makrolide postaju sve češći u svim dijelovima svijeta. Aktivnost protiv pneumokoka nedostajala je u ranijim kinolonima i bila je samo marginalna u prvoj generaciji fluorokinolona. Njihova aktivnost je bila poboljšana s novijim spojevima kao što je trovafloksacin i moksifloksacin. Istraživanjem je dokazano da je povećana aktivnost novijih fluokinolona protiv gram-pozitivnih bakterija ograničena na spojeve čija kemijska struktura na položaju 7 osnovnog prstena sadrži 3-amino-pirolidinilni ili 3-metil-piperazinilni prsten [11]. Iako je otpornost na ovu klasu antibiotika kod pneumokoka rijetka, nedavne studije ukazuju na povećanje otpornosti na ciprofloksacin i ofloksacin.

→ Aktivnost protiv gram negativnih organizama

U razvoju novijih analoga fluorokinolona, istraživanja su prvenstveno bila usmjerena na poboljšanje njihove sposobnosti protiv gram-pozitivnih organizama uz zadržavanje povoljne aktivnosti protiv gram-negativnih organizama [19]. Otpornost na ciprofloksacin je najčešće uočena kod sojeva *Escherichia coli*, *Enterobacter* i *Klebsiella spp* i također je uočena kod nekih pripadnika *Enterobacteriaceae*. Infektivni gram-negativni patogeni su uglavnom *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas* i *Burkholderia*. Djelovanje različitih

fluorokinolona znatno varira, naročito među sojevima *P. aeruginosa*. Ciprofloksacin je općenito aktivniji od novijih analoga ove klase prema većini vrsta *P. aeruginosa*. Međutim, klinafloksacin i sitafloksacin imaju aktivnost koja je jednaka ili bolja od ciprofloksacina. Vrste *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* su vrlo osjetljive na većinu fluorokinolona. Ciprofloksacin i ofloksacin su pokazali izvrsnu aktivnost i smanjenu minimalnu inhibicijsku koncentraciju protiv tih gram-negativnih bakterija. Noviji spojevi gatifloksacin i moksifloksacin nisu imali očite prednosti u odnosu na ciprofloksacin i levofloksacin, međutim ta je aktivnost zadržana u novijim spojevima.

→ Aktivnost protiv anaerobnih patogena

Do uvođenja novijih analoga fluorokinolona, ozbiljniji nedostatak kinolona bio je njihov nedostatak anaerobne aktivnosti. Ograničenu anaerobnu aktivnost pokazala je druga generacija fluorokinolona. Aktivnost ovih spojeva protiv važnih anaerobnih vrsta, kao što su *Bacteroides fragilis*, vrste *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas* i *Clostridium* bile su samo marginalne i varijabilne. Djelovanje većine novijih fluorokinolona protiv *Clostridium difficile* je dobro, pokazujući poboljšanja u odnosu na ciprofloksacin [19].

→ Aktivnost protiv atipičnih patogena

Značajno poboljšanje u većini novijih analoga je njihova pojačana aktivnost protiv atipičnih patogena respiratornog trakta kao što su *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* i *Legionella pneumophila*. Ovi spojevi također pokazuju svoje značajne aktivnosti protiv većine genitalnih patogena.

3.1.4. Farmakokinetika i farmakodinamika

Farmakokinetička i farmakodinamička svojstva različitih antimikrobnih spojeva ovise o obliku doziranja i dozi lijeka potrebnog za inhibiciju patogena. Fluorokinoloni, međutim, ubijaju patogene ovisno o koncentraciji. Stoga je važna njihova vršna koncentracija, a ne vrijeme iznad minimalne inhibicijske koncentracije. Općenito, farmakokinetički profil novijih analoga fluorokinolona znatno je poboljšán u odnosu na starije spojeve ove klase [20]. Njihovo duže vrijeme poluživota u serumu dozvoljava doziranje jednom dnevno, a veća koncentracija u plazmi pruža veću pokrivenost iznad minimalne inhibicijske koncentracije. Također, povećani volumen distribucije poboljšava njihovu penetraciju u tkiva [2]. Važni farmakokinetički parametri nekih fluorokinolona prikazani su u tablici 2. Fluorokinoloni se brzo i intenzivno distribuiraju u tkivima osim u mozgu.

→ Adsorpcija

Fluokinoloni se lako apsorbiraju, ali njihova potpuna adsorpcija ne postiže se uvijek oralnom primjenom. Oralna bioraspoloživost varira kod pojedinih spojeva fluorokinolona. Bioraspoloživost novih fluorokinolona nakon oralnih doza je jednaka ili veća od one kod ciprofloksacina, u rasponu od niske 70% kod grepafloksacina do visoke od 99% kod levofloksacina. Iako interakcije lijeka s hranom mogu produljiti vrijeme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije u plazmi (t_{max}) i na taj način utjecati na površinu ispod vremensko-koncentracijske krivulje, to ne utječe značajno na biodostupnost lijekova [2, 20].

→ Distribucija

Distribucija fluorokinolona u tkiva je veća nego kod većine drugih lijekova jer se neznatno vežu na proteine plazme. Nakon oralne primjene, fluorokinoloni imaju dobru penetraciju u različite

tekućine i tkiva tijela, osim u središnji živčani sustav. Noviji fluorokinoloni postižu veću koncentraciju u serumu nego što je potrebno za učinkovitost protiv infekcija. Značajna razina lijeka postiže se u bubrezima, prostati, jetri i plućima. Prodiranje u cerebrospinalnu tekućinu je slabo, osim kada su upaljene moždane ovojnice. Koncentracija lijeka u urinu je veća od minimalne inhibicijske koncentracije i stoga se fluorokinoloni uglavnom koriste u infekcijama mokraćnog sustava [1].

→ Metabolizam i eliminacija

Fluorokinoloni se jako razlikuju u stupnju do kojeg su eliminirani, metabolizmom u jetri ili izlučivanjem putem bubrega. Njihov metabolizam je deaktivirajući konjugacijom glukuronidima na 3-karboksilnoj skupini. Piperazinski prsten se lako metabolizira što dovodi do smanjene antimikrobne aktivnosti. Eliminacija se javlja i putem bubrežnih i ne bubrežnih putova, ali primarni put eliminacije većine fluorokinolona je putem bubrega glomerularnom filtracijom i tubularnim izlučivanjem [20]. Dakle, u bolesnika s oštećenjem bubrega i kod starije populacije potrebna je prilagodba doziranja. Sekundarni put eliminacije je putem jetre. Slabo se eliminiraju putem peritonealne dijalize i hemodijalize.

3.1.5. Klasifikacija fluorokinolona

Prva generacija fluorokinolona započela je nakon uvođenja nalidiksične kiseline 1962. godine za liječenje infekcija mokraćnog sustava. Nalidiksičnu kiselinu je otkrio George Lesher i suradnici u kemijskom destilatu tijekom pokušaja sinteze klorokinolinskog antimalarijskog agensa, klorokina. Naftiridon i kinolon sprječavaju bakterijsku DNA replikaciju inhibicijom DNA, a mogu biti i bakteriostatski i bakteriocidni [10,21]. Većina kinolona u kliničkoj uporabi pripadaju

klasi druge generacije fluorokinolona koji imaju pravi kinolinski prsten, sadrže C-3 karboksilnu skupinu i atom fluora, najčešće na položajima C-6 ili C-7.

Kinoloni se mogu razvrstati u generacije na temelju njihovog antibakterijskog spektra (Tablica 1). Kinoloni ranijih generacija općenito su imali uži spektar djelovanja, te ne postoji standard koji se koristi za određivanje koji lijek pripada kojoj generaciji. Nova klasifikacija kinolonskih antibiotika uzima u obzir prošireni antimikrobni spektar novijih fluorokinolona i njihovih kliničkih indikacija [21]. Uvedena 1997. godine, ova klasifikacija je korisno sredstvo koje liječnici koriste kada empirijski propisuju ove lijekove ili ocjenjuju nove lijekove koji su uvedeni na tržište. Lijekovi u svakoj skupini slični su po svom antimikrobnom djelovanju. Uz neke iznimke, lijekovi se također mogu grupirati u generacije pomoću njihovih kliničkih indikacija. Lijekovi se mogu dalje diferencirati na temelju dostupnih formulacija, prilagođavanju potrebnih doza kod bubrežnih ili jetrenih bolesti, značajnim štetnim učincima i značajnim interakcijama lijekova.

Tablica 1 Klasifikacija fluorokinolona

Generacija	Lijek	Karakteristična svojstva
Prva	Nalidiksična kiselina Oksolinska kiselina Pipemidinska kiselina Cinoksacin	Aktivnost protiv nekih gram negativnih bakterija. Visoko vezivanje za proteine. Kratko vrijeme poluživota.
Druga	Norfloksacin Enoksacin Ciprofloksacin Ofloksacin Lomefloksacin	Poboljšana aktivnost protiv gram negativnih bakterija kao i nekih gram pozitivnih i atipičnih patogena. Vezivanje za proteine (50%). Duže vrijeme poluživota od prethodnih agenata.
Treća	Levofloksacin Balofloksacin Pazufloksacin Sparfloksacin	Aktivni protiv gram negativnih bakterija. Poboljšana aktivnost protiv gram pozitivnih bakterija te atipičnih patogena.
Četvrta	Moksifloksacin Trovafloksacin Sitafloksacin Prulifloksacin Gemifloksacin Gatifloksacin	Najveća aktivnost protiv gram pozitivnih bakterija te poboljšana aktivnost protiv anaerobnih bakterija. Aktivni i protiv gram negativnih bakterija.

1. Generacija fluorokinolona

Kinoloni prve generacije uključuju nalidiksičnu kiselinu, pipemidinsku kiselinu i cinoksacin, koji su najstariji korišteni kinoloni. U današnje vrijeme rijetko se koriste jer imaju umjereno djelovanje na gram-negativne bakterije i minimalnu sistemska distribuciju. Zbog postizanja minimalnih razina u serumu, uporaba ovih lijekova ograničena je na liječenje nekompliciranih infekcija mokraćnog sustava. Cinoksacin i nalidiksična kiselina zahtijevaju češće doziranje od novijih kinolona te su osjetljiviji na razvoj bakterijske otpornosti. Ovi se lijekovi ne preporučuju za uporabu kod bolesnika s lošom funkcijom bubrega.

2. Generacija fluorokinolona

Kinoloni druge generacije imaju povećanu antibakterijsku aktivnost protiv gram-negativnih bakterija, kao i nekih gram-pozitivnih i atipičnih patogena. U usporedbi s lijekovima prve generacije imaju širu kliničku primjenu u liječenju složenih infekcija mokraćnog sustava i pijelonefritisa, spolno prenosivih bolesti, odabranih pneumonija i infekcija kože [22].

Lijekovi druge generacije uključuju ciprofloksacin, enoksacin, lomefloksacin, norfloksacin i ofloksacin. Norfloksacin se smatra prvim kinolonom širokog spektra djelovanja i korišten je u daleko većoj mjeri od nalidiksične kiseline. Nažalost, zbog niske razine u serumu i slabe penetracije u tkiva, norfloksacin je bio ograničen da se koristi za liječenje infekcija mokraćnog sustava i spolno prenosivih bolesti.

Ciprofloksacin je bio prvi kinolon koji je pokazao značajnu aktivnost izvan mokraćnog sustava. Nakon više od 20 godina u kliničkoj primjeni, ciprofloksacin ostaje jedan od najčešće propisanih antibakterijskih lijekova i koristi se za liječenje različitih gram-negativnih i u manjoj mjeri gram-

pozitivnih infekcija. Klinički uspjeh ciprofloksacina izazvao je niz novijih kinolona koji su pokazali još širi spektar aktivnosti, posebno protiv gram-pozitivnih vrsta [3, 21]. Ciprofloksacin je najmoćniji fluorokinolon protiv *P. aeruginosa*. Zbog svoje dobre penetracije u kosti, oralno primijenjen ciprofloksacin je korisna alternativa parenteralno primijenjenim antibioticima za liječenje osteomijelitisa izazvanih osjetljivim organizmima.

Iako je FDA imenovala neke kinolone druge generacije za liječenje infekcija donjeg dišnog sustava i akutnog sinusitisa, treba naglasiti da je *S. pneumoniae* često otporan na lijekove u ovoj klasi. Zbog toga, kinoloni druge generacije nisu lijekovi prvog izbora za infekcije donjeg dišnog sustava i akutnog sinusitisa.

Od lijekova druge generacije, ofloksacin ima najveću aktivnost protiv *Chlamydia trachomatis*. Ciprofloksacin i ofloksacin najčešće su korišteni kinoloni druge generacije zbog svoje dostupnosti u oralnim i intravenoznim formulacijama.

3. Generacija fluorkinolona

Treća generacija fluorokinolonskih antibiotika bila je biokemijski izmijenjena kako bi se poboljšala njihova aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija, naročito pneumokoka, bez gubitka njihove aktivnosti protiv gram-negativnih bakterija.

U kinolone treće generacije trenutno spadaju levofloksacin, balofloksacin, pazufloksacin i sparfloksacin. Ovi lijekovi se ubrajaju u treću generaciju zbog svoje proširene aktivnosti protiv gram-pozitivnih organizama, posebno penicilin osjetljivih i penicilin otpornih *S. pneumoniae*, te atipičnih patogena kao što su *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae*. Iako kinoloni treće generacije imaju širok spektar djelovanja protiv gram-negativnih bakterija, ipak su manje

aktivni od ciprofloksacina protiv *Pseudomonas* vrsta [10]. Zbog proširenog antimikrobnog spektra djelovanja, kinoloni treće generacije korisni su u liječenju pneumonije stečene u zajednici, akutnog sinusitisa i akutnih pogoršanja kroničnog bronhitisa, koje su njihove primarne indikacije.

4. Generacija fluokinolona

U četvrtu generaciju fluorokinolona spadaju: moksifloksacin, trovafloksacin, sitafloksacin, prulifloksacin, gemifloksacin i gatifloksacin koji pokazuju najmoćniju aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija, naročito pneumokoka, te imaju poboljšanu aktivnost protiv anaerobnih bakterija i dulje vrijeme poluživota što omogućava oralno doziranje jednom dnevno [22]. U nekim slučajevima oni su čak aktivni protiv dvostrukih mutanata u relevantnim organizmima, uključujući *S. pneumoniae*, *E. faecium* i *N. gonorrhoeae*. Neki od njih su imali više problema s toksičnošću za razliku od kinolona druge i treće generacije. Mather i suradnici otkrili su da fluorokinoloni četvrte generacije in vitro osiguravaju bolju aktivnost protiv bakterija koje su inače otporne na kinolone druge i treće generacije (ciprofloksacin, ofloksacin i levofloksacin). Ti su lijekovi bili snažniji od lijekova druge i treće generacije za gram-pozitivne i gram-negativne bakterije [17]. Općenito, moksifloksacin pokazao je veću potentnost od gatifloksacina za gram-pozitivne bakterije.

In vitro aktivnosti i farmakodinamička svojstva moksifloksacina i gatifloksacina bile su opsežno proučavane, osobito u beta-laktamima i fluorokinolonima druge generacije koji su otporni na sojeve respiratornih pneumokoka. Od onih lijekova koji se najčešće koriste protiv sojeva pneumokoka, studije su pokazale da je moksifloksacin dva puta jači od gatifloksacina, dok je

levofloksacin četiri do osam puta manje aktivan. Svi fluorokinoloni četvrte generacije imaju veliku primjenu u liječenju očnih infekcija i sprečavanju poslijeoperacijskog endoftalmitisa.

Tablica 2 Struktura, Farmakokinetika i kliničke indikacije fluorokinolona

Ime	Struktura	Farmakokinetika			Kliničke indikacije
		AUC (mg/h/L)	$t_{1/2}$ (h)	c_{max} (mg/L)	
Levofloksacin		9.33	6.78	0.24	Pneumonija stečena u zajednici Komplicirane infekcije mokraćnog sustava Gastroenteritis, Kronični prostatitis, Endokarditis
Balofloksacin		8.55	7.8	1.08	Nekomplicirane infekcije mokraćnog sustava Infekcije respiratornog sustava
Pazufloksacin		8.23	6.9	0.97	Pneumonije stečene u zajednici Akutno pogoršanje kroničnog bronhitisa
Sparfloksacin		8.35	20.06	0.34	Infekcije donjeg respiratornog sustava (akutni sinusitis i kronični bronhitis) Komplicirane infekcije mokraćnog sustava
Moksifloksacin		30.8	9.6	3.1	Infekcije dišnih puteva, antraks, intraabdominalne infekcije, endokarditis, meningitis, tuberkuloza, akutno pogoršanje kroničnog bronhitisa, akutni bakterijski sinusitis
Trovafloksacin		11.91	9.66	1.23	Komplicirane abdominalne infekcije, akutno pogoršanje kroničnog bronhitisa, komplicirane ginekološke infekcije, infekcije kože
Sitafloksacin		5.88	5.4	0.92	Akutno pogoršanje kroničnog bronhitisa, infekcije mokraćnog sustava, upala mokraćnog kanala, upala cerviksa
Prulifloksacin		4.52	6.8	0.72	Infekcije mokraćnog sustava, respiratorne infekcije, gastroenteritis
Gemifloksacin		3.02	6.65	0.56	Umjerene infekcije respiratornog sustava, akutno pogoršanje kroničnog bronhitisa, pneumonija stečena u zajednici
Gatifloksacin		7.87	7.46	0.9	Pneumonija stečena u zajednici, komplicirane infekcije mokraćnog sustava, gastroenteritis, bronhitis, infekcije kože

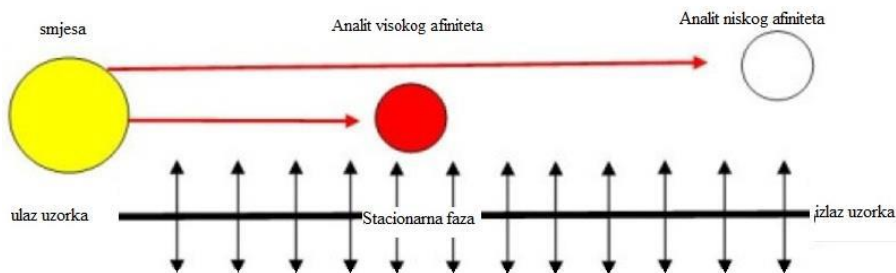
3.2 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) relativno je mlada tehnika koja je svoje mjesto našla u analitičkim laboratorijima velikog broja znanstvenih i gospodarskih grana. Njezine izvanredne separacijske sposobnosti, svestranost, tehnološka unaprijeđenost, te još nerazvijeni potencijali čine ju rado korištenom u razvojno-istraživačkim i kontrolno-analitičkim laboratorijima, uključujući i laboratorije visokoreguliranih djelatnosti [23]. Za razliku od mnogih drugih separacijskih metoda koje nisu pogodne za razdvajanje termički nestabilnih molekula (npr. plinska kromatografija, GC) ili onih koje se ne mogu direktno spregnuti (npr. izoelektrično fokusiranje, IEF), tekućinska kromatografija može uspješno poslužiti za razdvajanje širokog raspona molekula kao što su to polimeri, male molekule farmaceutika ili njihovih metabolita, kao i peptida i proteina. HPLC se počinje razvijati u kasnim 1960.-im kada i postaje komercijalno dostupna [24]. Nakon 1990. godine primjena HPLC-a naglo se širi te je danas jedna od široko prihvaćenih separacijskih tehnika za analizu različitih vrsta uzoraka zahvaljujući brzini i vrlo niskom pragu detekcije koji se kreće u nanomolima. Glavni cilj HPLC metode je separacija, identifikacija i kvantifikacija spojeva prisutnih u uzorcima koji su topljivi u tekućem mediju te separacija bioaktivnih spojeva od onečišćenja koja se mogu pojaviti kao posljedica razgradnje [25].

3.2.1 Mehanizam separacije u HPLC-u

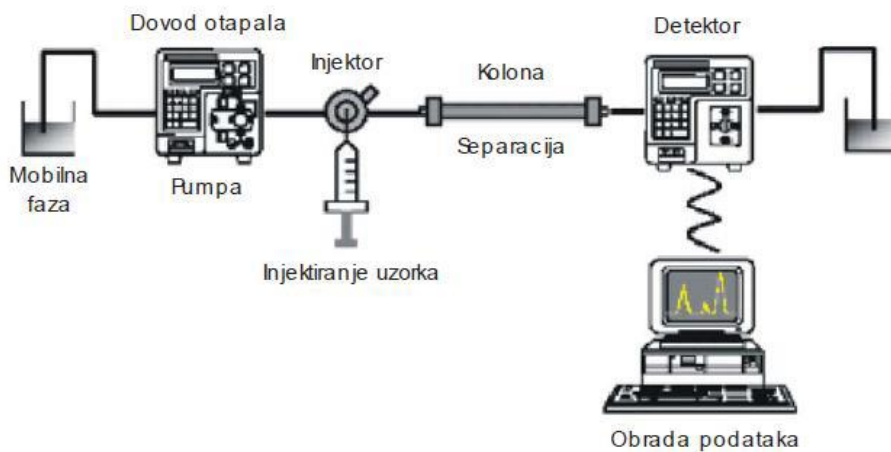
Svaki kromatografski postupak zahtijeva postojanje dvije faze, stacionarne i mobilne. Kod HPLC-a stacionarna se faza sastoji od finih čvrstih čestica malog promjera (3 do 10 μm), ravnomjerno raspodijeljenih unutar kromatografske kolone. Kao najčešće upotrebljavana stacionarna faza koristi se silikagel, ali se u tu svrhu koriste porozni polimeri i ionski izmjenjivači. Mobilna faza služi kao otapalo za prenošenje otopljenog uzorka kroz kolonu.

Sastav mobilne faze utječe na vrijeme zadržavanja sastavnica uzorka, razlučivanje, a samim time i djelotvornost metode. Kromatografsko odjeljivanje postiže se prolazom tekuće mobilne faze pod tlakom kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze noseći sastavnice uzorka za analizu [26]. Molekule uzorka putuju niz kolonu, pri čemu se uspostavlja ravnoteža između mobilne i stacionarne faze (Slika 3).



Slika 3 Grafički prikaz kromatografskog odjeljivanja

Tekućinski kromatograf na kojem se može provesti opisana analiza sastoji se od sustava za unošenje uzorka, spremnika mobilne faze i sustava za obradu otapala (uklanjanje otopljenih plinova), crpki za visoke tlakove, kolone, detektora te spremnika za sakupljanje otpada (Slika 4).



Slika 4 Shematski prikaz HPLC sustava

HPLC metoda uključuje injektiranje malog volumena tekućeg uzorka u tok mobilne faze, te pumpanjem tekućine (mobilne faze) pod visokim tlakom dolazi do premještanja uzorka kroz kromatografsku kolonu ispunjenu stacionarnom fazom [27]. Kolona je važan dio kromatografskog sustava jer se upravo u njoj odvija sam proces separacije. Kromatografska kolona zapravo je zatvorena cijev izrađena od nehrđajućeg čelika, koja je ispunjena stacionarnom fazom i u kojoj se uslijed različitih fizikalno-kemijskih interakcija odvija razdvajanje spojeva prisutnih u analiziranom uzorku [23, 27]. Cijeli sustav se može i grijati da bi se poboljšala učinkovitost separacije, ali rijetko na temperaturu višu od 60 °C zbog moguće razgradnje stacionarne faze ili hlapljivosti mobilne faze. Moguće je i postavljanje pretkolone za zaštitu analitičke kolone od zagađenja nečistim uzorcima.

Mehanizam separacije ovisi o vrsti stacionarne faze, a može se temeljiti na:

- razdiobi
- adsorpciji
- ionskoj izmjeni
- raspodjeli prema veličini čestica
- stereokemijskim interakcijama.

Vrijeme od injektiranja analita u tok mobilne faze do vremena kada pik analita izađe iz kolone i uđe u detektor naziva se vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (t_R). Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi komponente koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Spojevi koji su eluirani iz kromatografske kolone detektiraju se primjenom specifičnih detektora kojima se utvrđuje promjena sastava eluenta mjerenjem nekog njegovog fizikalnog ili kemijskog svojstva. Postoji više vrsta detektora koji se mogu koristiti za detekciju eluiranih spojeva, a neki

od njih su: spektrofotometrijski detektori koji rade na principu monokromatske ili polikromatske detekcije (detektor s nizom dioda); spektrofluorimetrijski (fluorescentni) detektori; detektori koji mjere indeks refrakcije (loma) svjetlosti (RI detektor) [28]. Nakon detekcije eluiranih spojeva kao rezultat kromatografske analize dobiva se kromatogram iz kojeg se mogu očitati sljedeći podaci: retencijsko vrijeme izlaženja pikova (spojeva), širina, visina i površina ispod pikova te udaljenost između pikova. Usporedbom vremena zadržavanja (t_R) (i apsorpcijskih spektara u slučaju UV/Vis detekcije) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja (i apsorpcijskim spektrima) vanjskih standarda, vrši se identifikacija izdvojenih pikova na kromatogramu, pri čemu svaki pik treba odgovarati jednom spoju. Položaj pika na vremenskoj osi služi za identifikaciju sastojka, odnosno, dokazivanje kvalitativnog sastava uzorka, dok se na temelju površine ispod pika ili njegove visine dobiva kvantitativna procjena sastojka u uzorku [29]. Kvantitativna analiza provodi se metodom kalibracije s vanjskim (eksternim) ili unutarnjim (internim) standardom. U svrhu kalibracije pripravi se niz poredbenih otopina poznatih koncentracija u očekivanom rasponu. Standardima se snime kromatogrami i površine (ili visine) pikova prikažu se u ovisnosti o koncentraciji. Tako se dobije kalibracijski pravac (krivulja) koji je temelj za kvantitativnu analizu.

3.2.2 Podjela HPLC metoda

Vrste tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koje se najčešće koriste u analizama:

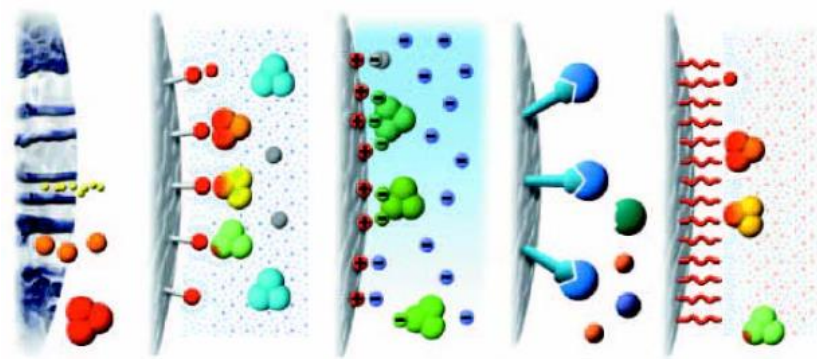
1) kromatografija normalnih faza – kod ove metode stacionarna faza je polarna dok je mobilna faza nepolarna. Odvajanje analita temelji se na polarnosti, a adsorpcijska snaga se povećava povećanjem polariteta analita i interakcijama između polarnog analita i polarne stacionarne faze čime se ujedno produžuje vrijeme elucije analita iz kolone.

2) kromatografija obrnutih faza – kod ove metode stacionarna faza je nepolarna dok je mobilna faza polarna. Odvajanje analita temelji se na hidrofobnim interakcijama koje su rezultat repulzije između polarnog eluenta, relativno nepolarnog analita i nepolarne stacionarne faze.

3) ionsko-izmjenjivačka kromatografija – kod ove metode razdvajanje analiziranih spojeva temelji se na naboju analiziranih spojeva. Razdvajanje analiziranih spojeva karakterizirano je prirodom i snagom kiselinskih ili bazičnih funkcionalnih skupina vezanih na nepokretnoj fazi te vrsti iona u analitu koji se razdvajaju.

4) kromatografija isključenjem (gel kromatografija) – kod ove metode razdvajanje analiziranih spojeva vrši se na temelju veličine analiziranih spojeva. Ova tehnika se koristi za određivanje molekularne mase polisaharida te je pogodna za određivanje tercijarne i kvarterne strukture proteina.

5) bioafinitetna kromatografija – razdvajanje analiziranih spojeva temelji se na reverzibilnim interakcijama između proteina i liganada. Odlika ove tehnike je što se već u jednom koraku može postići vrlo visoki stupanj čistoće analiziranih spojeva [30].



Slika 5 Mehanizmi separacije u različitim HPLC metodama

3.2.3 Detektori za HPLC sustave

Detektor ima važnu ulogu detekcije komponenti koje izlaze iz kolone nakon eluiranja. Detektor generira električni signal koji je razmjernan intenzitetu neke osobine mobilne faze ili tvari koja se eluira. Vrste detektora u HPLC-u su:

3.2.3.1 UV – VIS DETEKTOR

Mjerenjem apsorpcije svjetlosti uzorka na različitim valnim duljinama može se identificirati analit, a promjene u apsorpciji razmjerne su koncentraciji prema Lambert-Beerovom zakonu [24]. Ranije su ovi detektori mjerili apsorbanciju samo na 254 nm dok je danas omogućeno podešavanje bilo koje valne duljine u UV/Vis području. Postoje dvije vrste HPLC UV detektora: detektori jednostrukih i promjenjivih valnih duljina. Detektori jednostruke valne duljine mjere apsorpciju uzoraka jedne valne duljine, a detektori promjenjive valne duljine mjere apsorpciju višestrukih valnih duljina i stoga su osjetljiviji. Također, širok opseg linearnosti omogućava istovremeno određivanje određene supstancije u tragovima te visoke koncentracije druge supstancije što je od velikog značaja u istovremenoj analizi više lijekova. Ovim detektorima ne smetaju male fluktuacije protoka i temperature, ne uništavaju uzorak te su dovoljno osjetljivi za mnoge spojeve.

3.2.3.2 DAD DETEKTOR

DAD je detektor koji se u tekućinskoj kromatografiji najčešće koristi, budući da mnogi lijekovi apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje. To je UV-Vis detektor koji može snimati cijelo ultraljubičasto i vidljivo područje (190–800 nm), uz razlučivanje od 1 nm. DAD detektor omogućuje snimanje cijelog UV-Vis spektra svakoga razdvojenoga kromatografskog pika, što

pruža dodatnu dimenziju tijekom analize. Naime, dobiveni UV-Vis spektri daju dodatnu kvalitativnu informaciju, odnosno sigurnost u identifikaciji, pored vremena zadržavanja analita. Analizom dobivenih UV-Vis spektara DAD detektorom također je moguće procijeniti čistoću kromatografskog pika, odnosno utvrditi je li postignuto potpuno razdvajanje, drugim riječima utvrditi selektivnost analitičke metode, budući da sam oblik pika ne otkriva odgovara li on jednoj, dvije ili čak više sastavnica smjese [31]. Prednost pred običnim UV-Vis detektorom očituje se u tome što se za vrijeme jedne analize može istovremeno provoditi spektroskopsko skeniranje i precizno očitavanje vrijednosti apsorbancija. Dodatna prednost DAD detektora je što se može povezati s drugim detektorima, budući da, za razliku od masene spektrometrije, analit iz detektora izlazi nepromijenjen, a u svrhu dobivanja više informacija, bolje strukturne karakterizacije pojedinih sastavnica smjese ili osiguranja nižih granica dokazivanja i određivanja. Također prednosti ovog detektora su u tome što omogućuje istovremenu detekciju dviju valnih duljina i računanje apsorpcijskog omjera kojim se procjenjuje čistoću pika. Zahvaljujući poznavanju ciljanog spektra moguće je ukloniti interferirajući spektar te dobiti pouzdanu kvantifikaciju.

3.2.3.3 FLD DETEKTOR

Fluorescencijski detektor je iznimno osjetljiv i specifičan. Može postići vrlo dobru selektivnost i upravo zbog toga je pravi izbor kod analiza sastavnica koje se očekuju u vrlo malim količinama i kod složenih uzoraka. Pretpostavka za oba slučaja je da molekule analita fluoresciraju, što je ujedno glavno ograničenje primjene ovog detektora, budući da mali broj molekula lijekova pokazuje fluorescenciju. Detekcija komponente koja fluorescira zasnovana je na emisiji fluorescencije koja je praćena ekscitacijom na određenoj valnoj duljini. Vrlo je važno odabrati

dobru tekuću fazu te paziti na pH sustava jer neki spojevi fluoresciraju samo u određenim ionskim formama. Prednost fluorescencijskog detektora je velika osjetljivost, otprilike 10 – 1000 puta veća nego za DAD detektor, pa se njime redovito analiziraju sastavnice u koncentracijama ng/mL, čak i pg/mL. Ograničenje detektora je mali broj molekula lijekova koji se njime može analizirati [31].

3.2.3.4 MASENI SPEKTROMETAR

Spektrometrija masa ili masena spektrometrija (MS) je analitička tehnika kojom se analiziraju molekule na osnovi razlike u omjeru njihove mase i naboja (m/z). Molekule uzorka se najprije ioniziraju u ionizatoru, potom se ubrzavaju u električnom polju i uvode u analizator koji se sastoji od električnog i magnetnog polja. Metoda se koristi za kvantifikaciju atoma ili molekula i za dobivanje kemijske i strukturne informacije o analiziranim molekulama [32, 33]. Osnovni dijelovi spektrometra masa su: ionizator, analizator masa i ionski detektor.

U spektrometru masa analizirani uzorak se uvodi u izvor iona u tekućem ili plinskom stanju, gdje se fragmentira i ionizira. Nastali ioni potom prvo putuju u analizator masa gdje se razdvajaju prema njihovim omjerima m/z , a potom odlaze u detektor koji registrira broj iona pri svakoj vrijednosti m/z što rezultira stvaranjem spektra masa. Analizatori masa su ključna točka u MS – analizi. Analizator razdvaja dobivene ione analita prema omjeru mase i naboja. Četiri najčešće korištena analizatora u proteomskim istraživanjima su kvadrupol (engl. quadrupole), analizator vremena leta (engl. time-of-flight, TOF), ionska stupica (engl. ion trap) i Fourier transformirana ionska ciklotronska rezonancija (engl. Fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR). Masena spektrometrija primjenjuje se za vrlo točno određivanje relativnih atomskih i relativnih molekularnih masa, elementarnoga sastava i bruto-formule kemijskih spojeva, izotopnoga

sastava i strukture njihovih molekula, tragova primjesa, za studij ionskih i radikalskih reakcija u plinovitoj fazi, prijelaznoga stanja, fenomena ionizacije i dr. Za analizu složenih smjesa maseni se spektrometar izravno povezuje s plinskim ili tekućinskim kromatografom, u kojem se sastojci smjese, prije analize, prvo razdvajaju.

Ionizacija analita se može provoditi na nekoliko načina, pa tako razlikujemo ionizaciju elektroraspršenjem (engl. Electrospray Ionization, ESI), kemijsku ionizaciju (engl. Chemical Ionization, CI), kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (engl. Atmospheric-Pressure Chemical Ionization, APCI), ionizaciju fotonima pri atmosferskom tlaku (engl. Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI), matriksom potpomognutu ionizaciju laserskom desorpcijom (engl. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI), ionizaciju bombardiranjem brzim atomima (engl. Fast Atom Bombardment, FAB) i ionizaciju termoraspršenjem (engl. Thermospray).

Danas se sve više koristi tandemska masena spektrometrija (MS/MS), koja omogućuje dodatnu fragmentaciju iona. MS/MS analizatori na tržištu se dijele u tri osnovne skupine: spektrometre s više analizatora koji omogućuju analizu do MS^2 (engl. Triple Quadrupole, QqQ), instrumente s dva analizatora između kojih se nalazi kolizijska ćelija i također omogućuju analizu do MS^2 (engl. Quadrupole-Time of Flight, Q-TOF) te jedan analizator koji omogućuje analizu do MS^n , npr. stupica za ione [34]. Potrebno je istaknuti da je masena spektrometrija najprije korištena kao zasebna tehnika, zatim je povezana s plinskom kromatografijom, a krajem sedamdesetih godina prošlog stoljeća počelo je povezivanje s tekućinskom kromatografijom, dok je danas moguće povezivanje i s drugim separacijskim tehnikama, poput kapilarne elektroforeze.

- Vezni sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije:

LC – MS metoda

Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa do prije dvadesetak godina bile su dvije potpuno odvojene tehnike. Sedamdesetih i osamdesetih godina, međutim, došlo je do povezivanja LC i MS na područjima mehanizama desorpcije, otparavanja i ionizacije analita u tekućoj fazi, ionizacije pri atmosferskom tlaku i povezivanja ionizatora i analizatora, što je predstavljalo ogroman iskorak k rutinskoj upotrebi tzv. vezanog sustava LC-MS [34].

Povezivanje s masenom spektrometrijom unosi novu dimenziju, odnosno dodatnu sigurnost pri identifikaciji i strukturnoj karakterizaciji spoja te bolju osjetljivost kod određivanja sadržaja. Dakle povezivanje HPLC i MS omogućuje analizu najrazličitijih spojeva, uključujući termički nestabilne analite i analite s visokom molekulskom masom, gdje je analiza pomoću GC-MS nemoguća. Prema tome, LC-MS metoda obuhvaća separacijske mogućnosti tekućinske kromatografije, koje se temelje na razdjeljivanju, adsorpciji, ionskoj izmjeni ili isključenju prema veličini, s brojnim prednostima masene spektrometrije. Tekućinski kromatograf i spektrometar masa povezani su međuspojem (engl. interface) koji ima višestruku ulogu: otparavanje tekućine, ionizacije neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator. Međufazni prijelazi koji se događaju u međuspoju su otparavanje i desorpcija. Ova metoda može se koristiti za analizu biokemijskih, organskih i anorganskih spojeva koji se obično nalaze u složenim uzorcima biološkog porijekla. Stoga se LC-MS metoda može primijeniti u različitim područjima analitičke kemije, biokemije, farmaceutske analize, kliničke analize, forenzičke i toksičke analize, u kvalitativnoj i kvantitativnoj karakterizaciji složenih uzoraka [35]. U farmaceutskoj industriji, LC-MS tehnika se primjenjuje u različitim fazama razvoja novog lijeka, za identifikaciju, strukturnu karakterizaciju i određivanje sadržaja aktivne farmaceutske supstancije, ispitivanje

čistoće lijeka, za određivanje onečišćenja, za određivanje farmakokinetičkih parametara, za identifikaciju metabolita te općenito u kontroli kvalitete lijekova. Također je vrlo značajna u proteomici, gdje se koristi u razvoju peptidnih i proteinskih lijekova, karakterizaciji proteina i otkriću biomarkera [32].

- Vezni sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s tandemskom masenom spektrometrijom: *LC – MS/MS metoda*

Vezni sustav tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti - spektrometrija mase (HPLC-MS/MS, high pressure liquid chromatography - tandem mass spectrometry) predstavlja sustav koji omogućuje odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica. Prednost u odnosu na ostale sustave je mogućnost istovremenog praćenja analize korištenjem dvaju detektora: DAD i spektrometra mase (do 1650 Da). Ovom analitičkom metodom moguća je kvalitativna analiza: snimanje spektra uzorka, određivanje molekulske mase spoja, analiza fragmentacije određenog molekuskog iona (product ion) te određivanje prekursora određenog fragmenta (precursor ion). Također je moguća i kvantitativna analiza: koristeći standardne otopine analita i interni standard, MRM tehnikom izradi se kalibracijska krivulja na temelju koje se odredi koncentracija u uzorcima. Kombinacija tekućinske kromatografije s MS/MS-om osigurava odvajanje i pouzdanu identifikaciju analita iz smjese što se u tom stupnju ne može postići korištenjem samo jedne od navedenih metoda. Unutar analizatora i detektora, spektrometra masa održava se visoki vakuum kako bi se izbjegli slučajni sudari analita s molekulama zraka, pri čemu maleni analiti nikada nebi dospili do detektora [35]. Mogućnost ionizacije tvari, osnovni je uvjet za analizu u masenom spektrometru. Jedan od najzastupljenijih načina ionizacije u vezanom sustavu LC-MS je ESI, a ujedno je

kompatibilan sa svim analizatorima. Ionizacija može biti pozitivna i negativna (u ovisnosti o naponu na kapilari i kolektorskoj elektrodi), i odvija se pri atmosferskom tlaku uz optimalnu temperaturu iznad 100 °C u struji dušika [36].

LC-MS/MS metoda ima mnoge prednosti u odnosu na prethodne metode; poboljšana preciznost i točnost, bolja specifičnost i povećana osjetljivost posebno za niskomolekularne spojeve koje rezultiraju manjim potrebnim količinama uzorka te nižim granicama kvantifikacije, i jednostavnost standardizacije. Iz tih razloga, korištenje ove tehnologije u kliničkim aplikacijama povećalo se u posljednjih nekoliko godina i LC-MS/MS se sada rutinski koristi za mjerenje koncentracije lijekova i toksina te hormona u uzorcima bolesnika [37]. Može se koristiti za određivanje metabolita u biološkim tekućinama pri razvoju lijekova ili u farmakokinetičkim studijama. Također se koristi za određivanje herbicida u vodi i biološkim uzorcima te za određivanje metabolizma ksenobiotika. Postoje i razni literaturni navodi o primjeni metode kvantitativnog „screeninga— LC-MS/MS poput određivanja antimikrobnih agenasa u hrani životinjskog podrijetla uz ekstrakciju pomoću ultrazvuka s acetonitrilom i vodom te pročišćavanje ekstrakcijom na čvrstoj fazi [38]. Detektirani i kvantificirani su ovi antimikrobni agensi: kinoloni, makrolidi, β -laktami, nitroimidazoli, sulfonamidi, linkomicini, kloramfenikol, tetraciklini, polipeptidi i antibakterijski sinergisti.

3.2.4. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

HPLC se primjenjuje za odjeljivanje velikog broja organskih, anorganskih i bioloških spojeva, zatim polimera, kiralnih spojeva, termolabilnih spojeva, malih iona i makromolekula. Koristi se za kvantitativnu analizu ljekovitih tvari i gotovih proizvoda, praćenje stabilnosti i određivanje razgradnih produkata u ljekovitim tvarima i dozirnim oblicima, praćenje oslobađanja ljekovite

tvori iz farmaceutskog oblika te za određivanje onečišćenja u farmaceutskim tvarima. Koristi se i za određivanje sadržaja aminokiselina, nukleinskih kiselina i proteina u biološkim tekućinama, za određivanje koeficijenta razdjeljenja i pKa vrijednosti molekule lijeka, vezanja lijekova na proteine te lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama [39]. Također se koristi za praćenje sintetskih reakcija i u kontroli kvalitete.

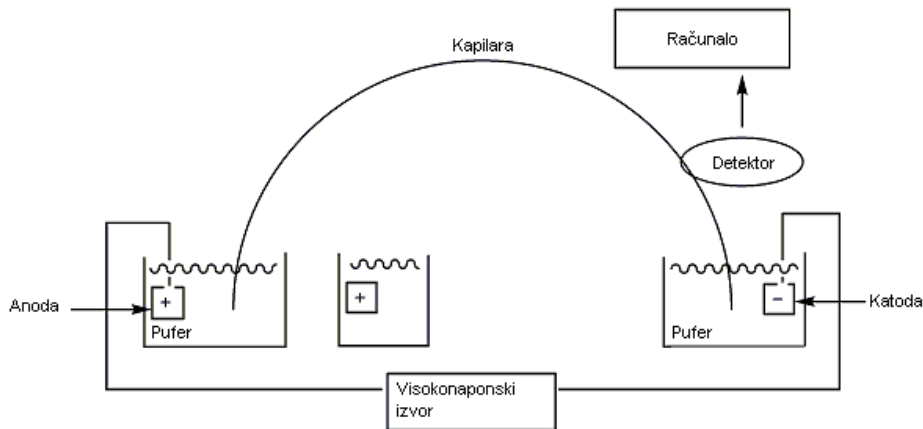
Nedostatak HPLC tehnike je velika potrošnja organskih otapala koja se koriste u analizi, nepostojanje univerzalnog detektora za sve analite i različite vrste analiza te visoka cijena. Za neke spojeve, bez obzira na tip detektora, osjetljivost je niska. HPLC ima i niz prednosti poput preciznosti, brzine, osjetljivosti, ponovljivosti i automatiziranosti. Zahvaljujući velikom izboru kolona i detektora mogu se podesiti uvjeti za analizu velikog broja supstanci. U usporedbi sa plinskom kromatografijom smanjen je rizik od degradacije uzorka jer se ne radi na visokim temperaturama.

3.3 KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Kapilarna elektroforeza je danas također primjenjivana separacijska tehnika. Zasniva se na razdvajanju iona na temelju njihove elektroforetske pokretljivosti. Elektroforetska pokretljivost ovisi o naboju samih iona (molekula), viskoznosti i o promjeru molekula. Brzina kojom se čestice gibaju direktno je ovisna o jačini električnog polja – što je veća jačina polja, čestice se brže gibaju. Od dvije čestice istog promjera, brže će se gibati ona koja ima veći naboj, te od dvije čestice istog naboja, brže će se gibati ona koja ima manji promjer zbog manjeg trenja. Neke od glavnih prednosti kapilarne elektroforeze su kratko vrijeme analize, visoka učinkovitost, separacija visoke razlučivosti, te mogućnost analize svih vrsta analita uključujući i neutralne molekule (bez naboja) koje inače nisu podložne gibanju u električnom polju [40]. Osim toga ova tehnika može se kombinirati s vrlo velikim brojem načina detekcije.

3.3.1. Mehanizam separacije u kapilarnoj elektroforezi

Uobičajena aparatura za kapilarnu elektroforezu sastoji se od istosmjernog izvora visokog napona, sustava za injektiranje (ubacivanje) uzoraka, kapilarne cijevi, detektora i izlazne jedinice (Slika 6). Većina instrumenata sadrži i sustav za kontrolu i održavanje temperature kako bi se osigurala ponovljivost eksperimenta jer pokretljivost čestica ovisi između ostaloga i o temperaturi (elektroforetska pokretljivost i viskoznost se smanjuju kako temperatura raste). Svaki pol izvora napona spojen je na jednu elektrodu između kojih se djelovanjem napona stvara električno polje. Između elektroda nalazi se kapilara u kojoj djeluje električno polje te kroz koju putuje uzorak (od anode prema katodi) [41]. Na kraju kapilare koji se nalazi vrlo blizu katode, nalazi se detektor (npr. UV-Vis).



Slika 6 Uobičajena aparatura za kapilarnu elektroforezu

Elektroforeza je proces pri kojem nabijena čestica putuje pod utjecajem električnog polja. Sila koja djeluje na nabijenu česticu jednaka je umnošku naboja čestice i jačine električnog polja. Na česticu prilikom gibanja također djeluje sila trenja koja je jednaka umnošku faktora trenja i brzine gibanja čestice [42]. Elektroforetska pokretljivost čestice u elektrolitu može se opisati slijedećom jednačinom:

$$\mu_{EP} = \frac{q}{f} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

gdje je sila na česticu opisana Stokesovim zakonom, η je viskoznost otopine elektrolita, a r je polumjer atoma (Stokesov polumjer). Brzina kojom čestice putuju opisana je izrazom:

$$v = \mu_{EP} E$$

gdje je v brzina čestice, a E jakost električnog polja, dok je μ_{EP} elektroforetska pokretljivost čestice. Jakost električnog polja ovisi o naponu i duljini kapilare:

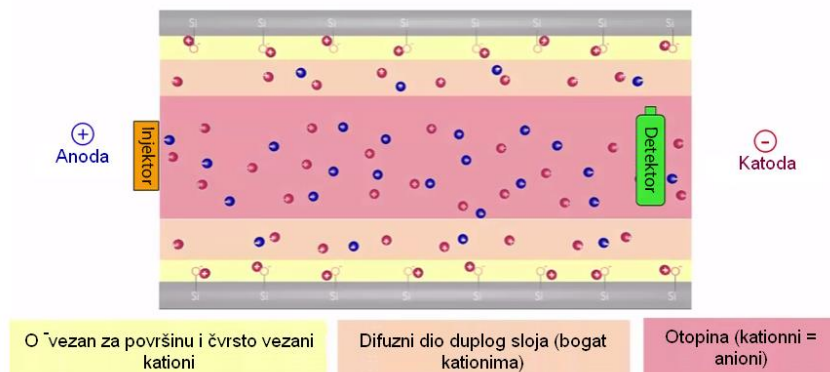
$$E = \frac{V}{L}$$

gdje je V napon u Voltima, a L duljina kapilare u cm. Povezivanjem prethodnih jednadžbi dobiva se izraz za brzinu putovanja analita:

$$v = v_{EP} = \mu_{EP}E = \frac{q}{6\pi\eta r} \cdot \frac{V}{L}$$

Ovaj izraz opisuje ovisnost brzine analita o naboju i ionskom radijusu.

Osim električni nabijenih analita, neutralni analiti također putuju kapilaram zbog elektroosmotskog (elektroendoosmotskog) toka. To je tok čistog pufera u kapilari, a posljedica je površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare. Površina unutrašnja stijenke kapilare negativno je nabijena. Kapilara se najčešće izvodi od izvučenog kvarca te sadrži brojne silanolne grupe koje se ovisno o pH vrijednosti elektrolita nalaze u anionskoj formi (imaju negativan naboj). Te negativno nabijene čestice privlače katione iz elektrolita te se uz samu stijenku stvara tzv. čvrsti sloj koji nastaje kada se kationi rasporede uz samu stjenku kapilare [43]. Osim čvrstog sloja, postoji tzv. difuzijski dio koji sadrži i katione i anione. Kada se na krajeve kapilare dovede napon koji stvara električno polje, kationi u difuzijskom dijelu su privučeni prema katodi, te svojim kretanjem prema anodi povlače sa sobom i okolnu tekućinu. Ovaj mehanizam prikazan je na slici 7.



Slika 7 Elektroosmotski tok

Kationi u čvrstom sloju su čvrsto vezani za negativno nabijene čestice u stjenki kapilare i ne miču se. U difuznom sloju koji je bogat kationima, kationi se kreću u smjeru djelovanja električnog polja kao i u samom otapalu.

Elektroosmotski tok otapala utječe na vremena zadržavanja ispitivanih čestica u kapilari jer se njegova elektroosmotska pokretljivost zbraja ili oduzima od elektroforetske pokretljivosti čestica. Ovo je iskazano u jednadžbi:

$$t = \frac{L}{v_{EP} \pm v_{EO}} = \frac{L}{(\mu_{EP} + \mu_{EO})V}$$

gdje je t vrijeme putovanja čestice cijelom dužinom kapilare.

Brzina elektroosmotskog toka u kapilari ovisi o elektroosmotskoj pokretljivosti otapala μ_{EO} koja je opisana jednadžbom:

$$\mu_{EO} = \frac{\epsilon}{4\pi\eta} E\zeta$$

gdje je ϵ dielektrična konstanta otapala, η je viskoznost otopine, ζ je zeta potencijal na površini kapilare, a E jakost električnog polja.

Jedna od glavnih odlika elektroosmotskog toka je ravan profil toka jer je električna sila koja pokreće tok jednoliko raspoređena duž cijele kapilare, nema pada tlaka uzduž kapilare kao kod sustava pokretanih tlakom (HPLC) i tlak je gotovo uniforman cijelom dužinom kapilare. U usporedbi sa laminarnim ili parabolnim tokom koji nastaje zbog trenja stijenke kod sustava pokretanih tlakom, ravan profil toka je dobar jer ne pridonosi disperziji zona analita što može otežati analizu.

Slijedeća prednost elektroosmotskog toka je kretanje svih analita u istom smjeru, neovisno o naboju [44]. Ovo uključuje i anione koji neovisno o svom negativnom naboju također putuju prema katodi jer je veličina elektroosmotskog toka višestruko veća od njihove elektroforetske pokretljivosti. Kationi putuju brže jer su njihovo elektroforetsko privlačenje i elektroosmotski tok usmjereni u istom smjeru (prema katodi). Neutralne molekule također se gibaju u istom smjeru jer su nošene snagom elektroosmotskog toka, ali se ne razdvajaju jedne od drugih. Anioni putuju najsporije.

Prilikom razvoja novih elektroosmotskih metoda, potrebno je optimirati parametre koji utječu na elektroosmotski tok i elektroforetsku pokretljivost analita. Ti parametri uključuju vrstu i koncentraciju pufera, pH pufera, dodavanje organskih otapala, vrstu i koncentraciju površinski aktivnih tvari, napon i temperaturu, te izbor kapilare [45].

Kapilarna elektroforeza može se kombinirati s više vrsta detektora. Najčešće se koriste UV detektor, fluorescencijski detektor, maseni spektrometar ili površinski poboljšana Ramanova spektroskopija.

3.3.2. Vrste kapilarne elektroforeze

Kapilarnoelektroforetske tehnike dijele se prema mehanizmu razdvajanja različitih analita. Vrste kapilarnoelektroforetskih tehnika prikazane su u tablici 3.

Tablica 3 Vrste kapilarne elektroforeze

Vrste kapilarne elektroforeze	Vrste analita
Kapilarna zonska elektroforeza (CZE)	Nabijeni analiti
Kapilarna gel elektroforeza (CGE)	DNA, RNA, proteini
Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC)	Neutralni i nabijeni analiti
Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF)	Proteini i peptidi
Kapilarna izotahoforeza (CITP)	Ioni
Kiralna kapilarna elektroforeza (CCE)	Kiralne molekule
Kapilarna elektrokromatografija (CEC)	Male molekule
Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (MEEKC)	Analiti slabo topljivi u vodi
Nevodena kapilarna elektroforeza (NACE)	Analiti netopljivi u vodi

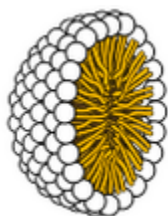
Kapilarna zonska elektroforeza (CZE)

Kapilarna zonska elektroforeza (CZE) je najjednostavnija tehnika kapilarne elektroforeze. Kod ove tehnike uzorak je ubačen kao tanka zona (pojas), koji je okružen puferom. Kada se primjeni električno polje, svaka komponenta u uzorku kreće se u skladu s njenom mobilnošću. U idealnom slučaju sve komponente će se razdvojiti jedne od drugih i formirati izolirane zone koje sadrže samo određenu komponentu. Neutralne komponente ne mogu se razdvojiti jer putuju brzinom elektroosmotskog toka. Najučinkovitije razdvajanje nabijenih molekula se postiže u uvjetima kada su razlike u brzinama različitih komponenti velike i kada je nasumična disperzija izoliranih zona minimizirana [41, 44].

Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC)

Ova elektroforetska tehnika kombinacija je elektroforeze i kromatografije. Ovo je jedina elektroforetska tehnika koja se može primjeniti za razdvajanje ne samo nabijenih već i neutralnih analita. Odjeljivanje neutralnih molekula kod ove tehnike postiže se dodavanjem površinski

aktivnih tvari (surfaktanata) u pufer. Pri koncentracijama surfaktanata većim od kritične micelarne koncentracije, formiraju se nakupine molekula surfaktanata sferičnog oblika koje nazivamo micide. Kao što je prikazano na slici 8, hidrofobni repovi molekula surfaktanata okrenuti su prema središtu micide da izbjegnu kontakt sa hidrofilnim puferom, dok su njihove polarne glave na površini micide i u kontaktu sa puferom.



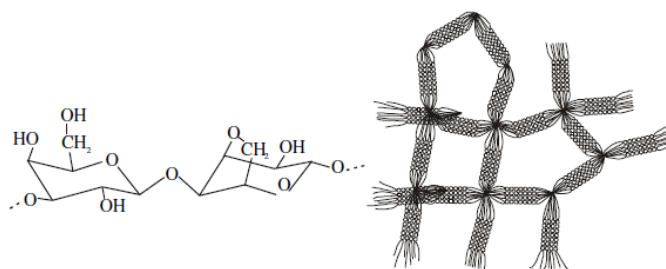
Slika 8 Micela

Micide najčešće imaju određeni naboj jer su molekule surfaktanta od kojih su izgrađene najčešće nabijene. Ovisno o naboju, micide putuju u smjeru ili suprotno od smjera elektroforetskog toka. Primjerice, micide natrijevog dodecil sulfata (SDS) koje su anionske putuju prema anodi tj. suprotno od smjera elektroosmotskog toka. Za vrijeme migracije, micide mogu ulaziti u interakcije s analitima putem hidrofobnih ili elektrostatskih interakcija kao kod kromatografije. S obzirom da se micide ipak gibaju kaže se da one tvore pseudostacionarnu fazu.

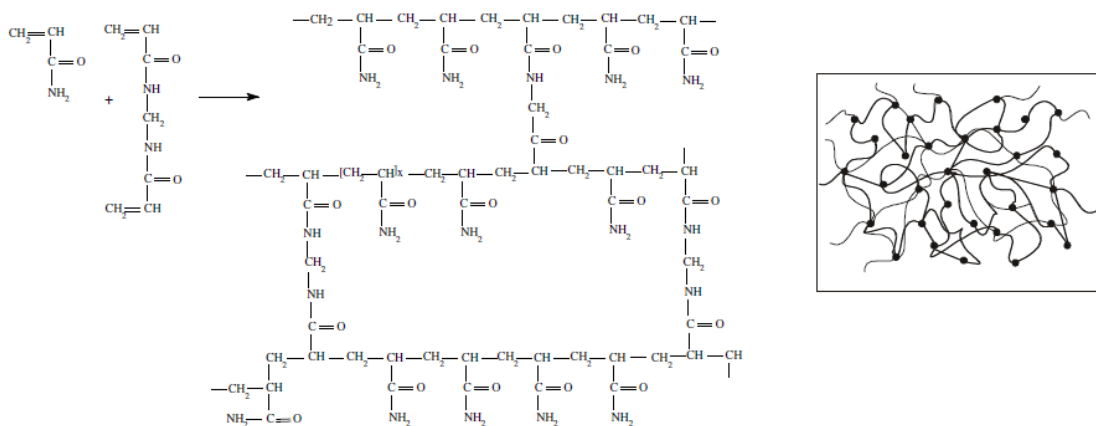
Brzina kretanja neutralnog analita ovisi samo o koeficijentu distribucije između micide i vodene otopine budući da neutralne čestice nemaju elektroforetsku pokretljivost. Ako analit ulazi više u interakcije s micelom, dulje je njegovo vrijeme zadržavanja s obzirom da ga micela vuče u smjeru suprotnom od elektroforetskog toka. Također, analit koji ne ulazi u interakciju sa micelom kreće se jer je pokrenut elektroosmotskim tokom. Što je veća hidrofobnost analita, to su intenzivnije interakcije s micelom i dulje je vrijeme zadržavanja u kapilari [45,46].

Kapilarna gel elektroforeza (CGE)

Kod ove tehnike koristi se kapilara ispunjena otopinom polimera koji stvaraju gel koji djeluje kao molekularno sito, razdvajajući analite na temelju njihove veličine. Najčešće se koriste linearno povezani gelovi (poliakrilamid ili metilceluloza), kovalentno unakrsno povezani (bis-poliakrilamid) ili gelovi vezani vodikovim vezama (agaroza). Najčešća primjena ove tehnike je za analizu DNA, RNA, peptida i proteina. Važna je za karakterizaciju rekombinantnih proteina prilikom njihove proizvodnje te u stabilitetnim studijama [47]. Kemijske i prostorne strukture agaroze i poliakrilamidnog gela prikazane su na slikama 9 i 10.



Slika 9 Agaroz



Slika 10 Poliakrilamidni gel

Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF)

Kapilarno izoelektrično fokusiranje je metoda koja se koristi za razdvajanje amfoteričnih substancija kao što su proteini, peptidi, aminokiseline i lijekova u polimernim matricama, kao i u slobodnim otopinama. Razdvajanje kod CIEF se temelji na tzv. izoelektričnim točkama analita (pI), a ne na razlici među brzinama. Kod ove metode koriste se zwitterioni (nazvani i amfoliti) pomoću kojih se kreira gradijentni pH unutar kapilare. Pozitivno nabijeni amfoliti putuju prema katodi dok negativno nabijeni putuju prema anodi. Stoga se pH povećava na strani katode i smanjuje na strani anode. Kada određeni amfolit dosegne svoju izoelektričnu točku i nije više nabijen, njegovo gibanje prestaje. Kao rezultat tog procesa formira se stabilan pH gradijent. Ako analit ima pozitivan naboj, putuje prema katodi. Za vrijeme njegova gibanja, nailazi na pH kod kojeg gubi naboj, te njegovo gibanje prestaje. Finiji pH gradijent je postignut ako se koristi veći broj amfolita. Da bi se spriječilo gibanje pufera iz puferskih spremnika u kapilaru, pH elektrolita kod katode mora biti veći od izoelektričnih točaka bazičnih amfolita, a pH elektrolita do anode mora biti manji od pH kiselih amfolita [41].

CIEF je najučinkovitiji kada ne postoji elektrosmotski tok ili kada je uvelike zaustavljen. CIEF se također može odvijati u uvjetima kada postoji elektroosmoza, međutim elektroosmotska brzina otopine unutar kapilare ne prelazi elektroforetske razine analita.

CIEF je fokusirajuća tehnika. Ako bi neka od molekula iz fokusiranog pojasa (zone) difundirala dalje od centra, odmah bi počela dobivati ili gubiti protone i time dobivati naboj čime se postiže da se vraća u centar. Stabilno stanje je postignuto kada su zone stacionarne i oštro fokusirane.

Širina zone analita karakterizirana je varijancom Gausove distribucije:

$$\sigma^2 = \frac{D}{E} \cdot \frac{d(pH)}{d\mu_{app}} \cdot \frac{dx}{pH}$$

Manja varijanca, koja rezultira oštrije fokusiranom zonom postiže se većom jakošću električnog polja (E), niskim koeficijantom difuzije (D) i visokim vrijednostima $d\mu_{app}/d(pH)$ (brzinom promjene mobilnosti sa pH) i $d(pH)/dx$ (brzinom promjene pH gradijenta). Za potpuno razdvajanje dvije komponente, razlika u njihovim izoelektričnim točkama mora biti veća od 4σ .

Kapilarna izotahoforeza (CITP)

Naziv izotahoforeza dolazi od grčke riječi *iso* (isto), *tacho* (brzina) i *phoresis* (elektroforeza). Ova metoda još se naziva i izmještajuća elektroforeza i multizonska elektroforeza. Uzorak je ubačen u kapilaru između dva različita elektrolita, vodećeg i terminalnog, bez prisustva električnog polja i bez elektroosmotskog toka. Vodeći elektrolit ima veću elektroosmotsku pokretljivost od iona u uzorku, dok terminalni elektrolit ima manju elektroosmotsku pokretljivost od iona u uzorku. Kod ove metode razdvajanje se temelji na razlici među brzinama iona analita u uzorku.

$$v_i = \mu_{ep,i} E_{sz}$$

gdje je v_i elektroforetska pokretljivost svake komponente (analita) (i) i E_{sz} je jakost električnog polja u uzorku prije razdvajanja. Kroz tranzijentni proces razdvajanja, svi ioni analita su razdvojeni u uzastopne pojaseve uz konstantnu električnu struju i temperaturu. Prema Ohmovom zakonu, jakost električnog polja raste kako pada pokretljivost pojedinog ionskog pojasa. Ionski pojas definiran je kao homogena otopina sa stacionarnim ili pokretnim granicama. Nakon razdvajanja, svaki od iona u različitim ionskim pojasevima putuje jednakom brzinom, v . Na taj

način postignut je stabilan niz ionskih pojaseva. Konačna brzina kojom putuju svi ionski pojasevi dana je slijedećom jednačbom:

$$v = \mu_{ep,i}E_i = \mu_{ep,j}E_j$$

gdje indeksi i i j predstavljaju različite analite. Koncentracija analita u svakom svakom od pojaseva je podešena u odnosu na koncentraciju vodećeg elektrolita prema Kohlraughovoj regulacijskoj funkciji opisanoj jednačbom:

$$C_i = C_l \frac{\mu_i(\mu_l + \mu_c)}{\mu_l(\mu_i + \mu_c)}$$

gdje je C_i koncentracija određenog analita i u ionskom pojasu i , a μ_i , μ_l i μ_c su elektroforetske pokretljivosti iona i , vodećeg elektrolita siprotnog iona u stabilnom stanju. Kod CTIP doći će do koncentracije onih iona kod kojih je koncentracija u uzorku niža od njihove koncentracije u stabilnom stanju definiranom prethodnom jednačbom [41, 44].

CTIP se ne može koristiti za razdvajanje kationa i aniona istovremeno. Tehnike detekcije kod CTIP su bazirane na provodljivosti, diferencijalnoj provodljivosti ili diskretnoj UV apsorpciji. Kod UV apsorpcije, između pojaseva analita umetnuti su spojevi za razdvajanje. To su spojevi koji ne apsorbiraju UV i njihova pokretljivost je između pokretljivosti ionskih pojaseva koje razdvajaju.

Kiralna kapilarna elektroforeza (CCE)

Kod ove tehnike kapilarne elektroforeze, koriste se kiralni selektori koji se dodaju u otopinu elektrolita. Kao kiralni selektori rabe se ciklodekstrini, krunski eteri, žučne soli, kompleksi bakar(II)-aspartata, itd.

Najčešće korištene tehnike za odjeljivanje kiralnih spojeva su tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti i plinska kromatografija. Spomenute tehnike mogu biti vrlo složene i skupe jer koriste kiralne stacionarne faze. U usporedbi sa spomenutim tehnikama koje koriste čitav niz kiralnih faza za mijenjanje selektivnosti, kod kiralne kapilarne elektroforeze razdvajanje se postiže upotrebom relativno malog broja kiralnih selektora [49]. Selektivnost se postiže upotrebom odgovarajuće vrste i koncentracije kiralnog selektora kao i modifikatora kao što su alkoholi, površinski aktivne tvari, urea i metalni ioni. Ova metoda se koristi kod analiza aminokiselina i kiralnih lijekova

Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (MEEKC)

Kod ove tehnike kapilarne elektroforeze dolazi do razdvajanja elektrolita između dvije faze emulzije, vodene i uljne [50]. Mikroemulzija se sastoji od kapljica vode raspršenih u ulju ili kapljica ulja raspršenih u vodi. Osim vode i organskog otapala najčešće se dodaju surfaktanti i kontrasurfaktanti. Kao organska otapala najčešće se koriste heptan ili oktan, a kao surfaktant najčešće SDS. Kontrasurfaktanti se dodaju radi stabilizacije emulzije. Različitim izborom otapala i različitim koncentracijama surfaktanata i organskih otapala postiže se različito razdvajanje između analita. Koristi se najčešće kod analiza lijekova teško topljivih ili netopljivih u vodi.

Nevodena kapilarna elektroforeza (NACE)

Kod ove metode koriste se samo organska otapala. Viskoznost i dielektrična konstanta otapala utječu izravno na elektroosmotski tok i elektroforetsku mobilnost analita, pa se kombiniranjem različitih vrsta i udjela elektrolita postiže razdvajanje [45].

Kapilarna elektrokromatografija (CEC)

Ova tehnika je kombinacija klasične kromatografije i kapilarne elektroforeze. Odlikuje se visokom učinkovitošću. Ovdje je kapilara ispunjena kromatografskom stacionarnom fazom. Razdvajanje analita postiže se na temelju različite elektroforetske pokretljivosti i na temelju različitih koeficijenata razdjeljenja između mobilne i stacionarne faze. Kapilara se puni *in situ* polimerizacijom (primjerice hidrolizom tetrametoksi silana) ili silanizacijom, ali postoje i komercijalno dostupne punjene kapilare [42].

3.3.3. Primjena kapilarne elektroforeze u farmaciji

Kapilarna elektroforeza (CE) je potentna tehnika razdvajanja koja se često koristi u istraživanju i razvoju, kontroli kvalitete i studijama stabilnosti lijekova. CE nudi nekoliko prednosti u odnosu na HPLC. Prednosti uključuju jednostavnost postupka, brzu analizu, automatizaciju, robusnost, različite mehanizme za selektivnost i niski trošak. Nadalje, nudi veću učinkovitost, a time i veću snagu rezolucije naspram HPLC, čak i ako je dostupna vrlo mala količina uzorka. Ove prednosti vjerojatno će dovesti do još češće upotrebe CE u istraživanju i razvoju, ispitivanju kakvoće i studijama stabilnosti lijekova. CE je naročito korisna metoda za razdvajanje peptida, proteina, ugljikohidrata, anorganskih iona, kiralnih spojeva, ali i za brojne druge farmaceutske primjene [51].

Iako se CE ne koristi u svakodnevnim rutinskim analizama, njezina primjena u farmaciji je vrlo široka. Zahvaljujući različitim mehanizmima razdvajanja mogu se analizirati sve vrste analita, od malih organskih molekula, iona i neutralnih molekula do velikih biomakromolekula, poput DNA i proteina.

U farmaciji se koristi za analizu različitih ljekovitih oblika, tableta, kapsula, krema, injekcijskih otopina, ali i složenih uzoraka poput bioloških tekućina i tkiva, otpadnih voda, stočne hrane i biljnih materijala [45]. U analitici lijekova kapilarna elektroforeza koristi se kao jednostavna i brza metoda za točno i precizno određivanje sadržaja aktivnih farmaceutskih supstancija u svim vrstama ljekovitih oblika. Zbog visoke moći razlučivanja koristi se za određivanje profila čistoće lijekova. U kontroli čistoće ljekovitih tvari često predstavlja odličnu alternativu tekućinskoj kromatografiji, jer je u mnogim slučajevima pogodnija za određivanje onečišćenja u lijekovima zbog velike selektivnosti i osjetljivosti [51]. Također se uspješno primjenjuje u analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama (urin, plazma, serum, likvor) i tkivima. Najveću prednost pokazuje u analizi peptidnih lijekova i proteina. Djelotvorna je metoda u separaciji i kvantifikaciji enantiomera i određivanju enantiomerne čistoće.

Najzastupljenije su kapilarna zonska elektroforeza koja se koristi za određivanje djelatne tvari u ljekovitom obliku, za provjeru čistoće, određivanje onečišćenja, farmakokinetičke studije, identifikaciju i određivanje metabolita lijekova u biološkim uzorcima, za analizu peptida i proteina i za razdvajanje anorganskih iona i organskih kiselina, te micelarna elektrokinetička kromatografija koja se koristi za analizu nabijenih i nenabijenih analita i za širok raspon tvari s hidrofilnim ili hidrofobnim karakteristikama (aminokiseline, nukleotidi, vitamini, velik broj lijekova, aromatski ugljikovodici) [45]. U farmaciji se MEKC uspješno koristi za određivanje aktivnih tvari i onečišćenja u tabletama, kremama i injekcijskim formulacijama. Primjenjuje se

za određivanje lijeka (vrlo često hidrofobnog) i njegovih polarnih metabolita u biološkim uzorcima te za stabilitetne studije.

Osim u farmaciji dosta se primjenjuje i u biotehnologiji za analizu DNA, RNA, proteina i ugljikohidrata, zatim u molekularnoj biologiji, genetici, biokemiji, mikrobiologiji, virologiji.

4. RASPRAVA

U analizi fluorokinolona primijenjene su mnoge HPLC metode s različitim načinima detekcije. Najčešći je HPLC s ultraljubičastom (HPLC-UV) ili detekcijom fluorescencije (HPLC-FLD). Druga vrsta detekcije u kombinaciji s HPLC sustavom je masena spektrometrija (HPLC-MS). Ove su metode česte za određivanje lijekova u serumu, međutim, masena detekcija omogućuje određivanje vrlo male koncentracije i u drugim složenim matricama. Druga tehnika razdvajanja za analizu fluorokinolona je CE kombinirana s UV ili FLD. Određivanje razine lijeka u farmaceutskoj formulaciji može se provesti pomoću HPLC tehnike, a i ostalih tehnika kao što su UV-spektroskopija, voltometrija ili čak nuklearna magnetska rezonancija (NMR). Sve gore navedene metode zahtijevaju pravilnu pripremu uzorka. Farmaceutske formulacije su najmanje složene matrice pa je potrebno samo razrjeđivanje. Fiziološke tekućine (krv, žuč, slina i urin) i homogenati tkiva zahtijevaju složeniju tehniku odvajanja. Razlog tomu je prisutnost endogenih supstancija koje se mogu pojaviti na kromatogramu ili elektroferogramu tijekom analize. Ključni faktori su optimizacija uvjeta analize (upotreba odgovarajućeg otapala ili pufera) i priprema uzoraka. Priprema uzorka može uključivati razrjeđivanje koje se može primijeniti za urin, precipitaciju proteina ili ekstrakciju koja se primjenjuje u složenijim matricama (krv, serum, homogenati tkiva). U ovom radu izneseni su podaci o metodama za određivanje predstavnika treće i četvrte generacije fluorokinolona u različitim matricama.

4.1 ODREĐIVANJE FLUOROKINOLONA TREĆE GENERACIJE

Levofloksacin

U literaturi su opisane mnoge analitičke metode za kvantitativnu analizu levofloksacina (LEVO) u različitim matricama (Tablica 4). Većina ih se temelji na reverznoj fazi HPLC-a. Ove su tehnike prikladne zbog topljivosti LEVO u vodi. Najčešći primijenjeni detektori su UV [5, 52-53] i FLD [5, 54-57]. Liang H. i sur. (2002) potvrdili su brzu metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za određivanje LEVO u ljudskoj plazmi i urinu. Za izoliranje levofloksacina iz biološke matrice prije kvantitativne analize korišten je postupak ekstrakcije tekuće-tekuće (LLE). Razdvajanje je provedeno na C18 koloni reverzne faze, a kvantifikacija je provedena UV detektorom na 330 nm. Kao interni standard korišten je ciprofloksacin. Metoda je bila linearna od 0,08 – 5,18 µg/mL levofloksacina u plazmi i od 23 – 1464 µg/mL u urinu. Prednost ove metode najbolje se odražava u njenoj brzini i jednostavnosti primjene za robotsku automatizaciju što ju čini prikladnom za farmakološke i farmakokinetičke studije LEVO [52]. Watabe S. i sur. (2010) su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz detekciju fluorescencije istodobno odredili tri fluorokinolona – levofloksacin, pazufloksacin i ciprofloksacin u ljudskom serumu. Kromatografija je provedena na C8 koloni s izokratnom mobilnom fazom koja se sastoji od 1% trietilamina (pH 3)/acetonitrila (86/14, v/v). Precipitacija proteina provedena je pomoću kiseline i metanola. Kalibracijske krivulje za sva tri fluorokinolona bile su linearne u koncentracijskom području od 0,1 – 20,0 µg/mL. Relativne standardne devijacije bile su od 1,6 – 9,3 %. Analitički prinos (eng. recovery) iz ljudskog seruma za pazufloksacin bio je 97%, za ciprofloksacin 88% i levofloksacin 90%. Ova metoda pokazala se jednostavnom i pouzdanom za određivanje sva tri fluorokinolona [54].

Ako je potrebna niža razina kvantifikacije, može se primijeniti masena detekcija [58-60]. U MS / MS analizi primjenjuju se slijedeći ioni u MRM (eng. multiple reaction monitoring) modu: m/z 362,7 \rightarrow 261,2, m/z 362,1 \rightarrow 318,1 [59] i m/z 362,2 \rightarrow 261,2 [60]. Za pojedinačni MS promatra se slijedeći RM: m/z 362 \rightarrow 318 [58].

Mobilna faza je smjesa vode ili vodenog pufera i organskog otapala. Kao dodatak mobilnoj fazi koristi se trietilamin (TEA). TEA je reagens ionskog para dodan u vodu koji poboljšava oblik kromatografskih vrhova. Njegov udio ne prelazi 1%, a pH mobilne faze je blago kiseli. Pravilna pH vrijednost je podešena s ortofosfornom kiselinom. Dodavanje reagensa ionskog para poboljšava kvalitetu odvajanja zbog prisutnosti negativno nabijene karboksilne skupine. Drugi polarni sastojak može biti fosfatni pufer koji se sastoji od natrijeva ili kalijeva fosfata u rasponu koncentracija 10-30 mM [61-62]. Najčešće organsko otapalo u HPLC separaciji je acetonitril (ACN). Udio je u rasponu od 14 do 43% za izokratnu eluciju i također se primjenjuje u gradijentnoj eluciji; međutim, u ovom slučaju udio ACN-a mijenja se s vremenom. Visoki udio ACN-a je karakterističan za odvajanje na HILIC stupcu gdje je udio organskog otapala veći od 80% [63]. Glavna prednost uporabe HILIC stupaca jest činjenica da se oni mogu koristiti za razdvajanje ioniziranih spojeva. HILIC kolone pogodne su za MS detekciju zbog visokog sadržaja organskog otapala. HILIC separacija je normalna vrsta razdvajanja, ali se koriste tipični eluentni reverzne faze. Metanol se često koristi uz ACN i može se koristiti i u izokraskoj [52] i gradijentnoj eluciji [52, 55-56]. Ji HY i sur. (2006) potvrdili su brzu i osjetljivu tekućinsku kromatografiju temeljenu na hidrofilnim interakcijama – tandemsku masenu spektrometriju (HILIC-MS/MS) za određivanje levofloksacina u ljudskoj plazmi. Levofloksacin i ciprofloksacin kao interni standard ekstrahirani su iz ljudske plazme diklormetanom i analizirani na HILIC koloni s mobilnom fazom acetonitril – amonijev format (100 mM, pH 6,5) (82:18 v/v). Analiti su

detektirani primjenom ionizacije elektroraspršivanjem tandem masene spektrometrije. Standardna krivulja bila je linearna u rasponu koncentracija 10 – 5000 ng/mL. Donja granica kvantifikacije za levofloksacin bila je 10 ng/mL koristeći 20 µL uzorka plazme. Analitički prinos levofloksacina i ciprofloksacina bio je 55,2% odnosno 77,3%. Ova metoda uspješno je primjenjena za farmakokinetičku studiju levofloksacina kod ljudi [63].

Najčešća vrsta kromatografske kolone koja se koristi u RP-HPLC metodama za analizu fluorokinolona je C18 kolona. Međutim, postoje i druge kolone, npr. C8 ili C4, na kojima se odvija razdvajanje (Tablica 4). Watabe i sur. (2010) su testirali različite vrste kolona, npr. C18 i C8, kod analize LEVO i pazufloksacina (PAZU) [54]. Primjećeno je da LEVO i PAZU bolje stupaju u interakciju s C8 kolonom jer ova stacionarna faza ima manje steričke smetnje od C18 kolone. LEVO sadrži 4-metilpiperazinilnu skupinu dok PAZU sadrži 1-aminociklopropilnu skupinu. Prisutnost ovih grupa može uzrokovati bolju interakciju s površinom stacionarne faze. Fang i sur. (2010) koristili su C4 kolonu za razdvajanje [59]. U ovoj analizi, osim LEVO-a, također su određivani izoniazid i rifampicin. Analizirani spojevi bili su u širokom rasponu polariteta, a ovaj tip kolone bio je prikladniji od C18. Stacionarna faza s butilom daje kraće vrijeme analize nepolarnih spojeva bez značajnog utjecaja na razdvajanje polarnih spojeva. Visoko razlučivanje je i dalje postignuto u usporedbi sa stacionarnom fazom dugog alkilnog lanca.

ACN, voda i metanol (i njihove smjese) uglavnom se koriste kao mobilne faze u analizi fluorokinolona [4]. Ostali sastojci mobilne faze mogu biti otopina kiralnog dodatka mobilne faze (CMPA) koja se sastoji od CuSO_4 i L-leucina, zatim mravlja kiselina (u MS detekciji), natrijev duodecilsulfat (SDS), tetrabutilamonijevev acetat (TBAA), limunska kiselina, amonijev acetat, tetrabutilamonijev bromid (TBAmBr) i L-izoleucin. Liang i sur. (2002) koristili su SDS u

mobilnoj fazi kao sredstvo koje povećava vrijeme zadržavanja, ne samo za LEVO, već i za gatifloksacin (GATI), moksifloksacin (MOXI) i trovafloksacin (TROVA) [5]. SDS se koristio kao dodatak 25 mM fosfatnom puferu i reagensu ionskog para (10 mM TBAA), što je poboljšalo oblik kromatografskih vrhova. Ovaj sastav mobilne faze omogućava prevladavanje sekundarnih interakcija između silanolnih skupina na stacionarnoj fazi i amino skupina na kinolonima.

Dodavanje CuSO_4 , L-leucina ili L-izoleucina omogućuje stereospecifično određivanje LEVO. Stereoselektivnost se postiže dodavanjem reagensa kiralnih liganada direktno u mobilnu fazu. Cu^{2+} ioni, L-leucin i voda tvore kompleks koji ulazi u interakciju s LEVO i njegovim R-enantiomerom. Ovi kompleksi imaju različite konfiguracije. Mogu se primijeniti za određivanje onečišćenja u farmaceutskim formulacijama. Korištene su i ostale aminokiseline (L-fenilalanin, L-serin i L-alanin); međutim, najbolje razdvajanje je bilo primjećeno za L-leucin [64].

Sljedeća tehnika razdvajanja koja se može primijeniti za LEVO analizu je CE. Ova metoda zahtijeva relativno malu količinu analita. Može se primijeniti za kvantifikaciju LEVO u različitim matricama kao što su urin, tablete ili u vodi. Razdvajanje se može provesti u vodenim [6] i u ne vodenim [65] uvjetima. Optimalni pH vodene otopine je oko 8.0. Promjena pH može utjecati na factor odgovora detektora i može uzrokovati interakciju sa stjenkom kapilare za pH niži od 2,5. U usporedbi s kromatografskim metodama, CE razdvajanje je složenije jer postoji više čimbenika koji utječu na razlučivanje (pH, napon, temperatura, duljina kapilara). Onečišćenja u uzorku se mogu adsorbirati na stjenku kapilare, čime se produljuje vrijeme analize.

Sve prethodno spomenute metode zahtijevaju odgovarajuću pripremu uzoraka. Obično se kod taloženja proteina primjenjuje ekstrakcija prije analize. Taloženje proteina uglavnom se provodi korištenjem otapala kao što su ACN, metanol, smjesa ACN i metanola, perklorne kiseline i

metanola, te trifluoroctene kiseline (TFA). Watabe i sur. (2010) koristili su smjesu metanola i 6% perklorne kiseline kao sredstvo za taloženje [54]. Upotreba ACN-a ili metanola rezultirala je širokim ili vrlo malim vrhovima. Metode ekstrakcija mogu biti ekstrakcija tekuće –tekuće (LLE) s diklormetanom, kloroformom, heksanom, ekstrakcija u čvrstoj fazi (SPE), disperzivno tekućinsko-tekuća mikroekstrakcija. Ostali postupci primjenjeni u pripremi uzorka su mikrodijaliza, ultrafiltracija, mikroekstrakcija i razrjeđivanje. Liang i sur. [2002] upotrijebili su smjesu SDS s ACN-om kod ultrafiltracijske metode kao zamjenski reagens u pripremi uzoraka kod analize LEVO, MOXI, GATI i TROVA kako bi se zamijenio lijek vezan za protein i odredio ukupnu koncentraciju lijeka koji je rezultirao s udjelom višim od 95% [5]. Xu i sur. [2011] testirali su različite uvjete LLE koji uključuju ACN/vodena otopina s heksanom [60]. Sloj bez heksana sadržavao je ACN, vodu i dodatak fosforne ili mravlje kiseline u različitim omjerima. Najbolji omjeri smjese bili su ACN koji sadrži 0,3% fosforne kiseline (70:30). Smjesa ACN i vodene otopine korištena je kako bi se spriječilo skrutnjavanje uzorka kada je za pripremu uzoraka korišten čisti ACN. S druge strane, preniski sadržaj ACN-a rezultira nepotpunim taloženjem proteina. Gore navedeni omjer rezultirao je optimalnim analitičkim prinosom i uklanjanjem proteina.

Tehnike ekstrakcije ili taloženja primjenjuju se uglavnom u biološkim matricama kao što su plazma, serum, homogenati tkiva i urin. Razrjeđivanje se često koristi kod pripreme uzoraka farmaceutskih formulacija. Analiza LEVO metodama razdvajanja zahtijeva i upotrebu internog standarda. Dodavanje internog standarda daje ponovljivost rezultata i poboljšava preciznost.

Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) ovise o korištenoj matrici i primijenjenom detektoru. LOD i LOQ za farmaceutske formulacije bile su čak reda veličine od 10^{-9} g/mL za fluorescentnu detekciju. Ograničenje detekcije bioloških matrica poput plazme,

urina i seruma bile su veće. MS detektor bio je osjetljiviji na analit nego UV ili FLD; međutim, za rutinsku kliničku praksu nije uvijek neophodno otkriti vrlo niske koncentracije jer su vršne koncentracije i prosječne koncentracije reda veličine mg/L.

Balofloksacin

Da bi se odredio balofloksacin (BALO), korištena je HPLC metoda s MS i UV detekcijom [66, 67]. Razdvajanje je provedeno na C18 koloni. Organska otapala bila su ACN i metanol. Anorganske komponente bile su vodene otopine amonijevog acetata [66] i kalijevog dihidrogen fosfata [67]. pH pokretne faze bio je slabo kiseli (Tablica 4). Odabir dihidrogenfosfata podešen na pH 6,5 rezultirao je dobrim razlučivanjem i smanjenjem razvlačenja kromatografskih vrhova [67]. Bian i sur. (2007) testirali su 10 mM amonijev acetat u različitim pH uvjetima (6,65 vs. 3,0) [66]. Primjena otopine s nižim pH rezultirala je boljim razlučivanjem.

Razlike mogu biti uzrokovane upotrebom različitih organskih otapala, ACN i metanola. Priprema uzorka uključivala je LLE za plazmu i razrjeđivanje za farmaceutsku formulaciju. U LLE se koristila smjesa diklormetana i etil acetata. U usporedbi s smjesom *n*-heksan-izopropanola pokazao je visoku učinkovitost i manje interferencije. Tijekom postupka ekstrakcije nije bilo poželjno koristiti kiselinu (1M HCl) ili bazu (1M NaOH) jer je to rezultiralo većom interferencijom [66]. LOD i LOQ bili su niži za MS detekciju.

Pazufloksacin

Metode za određivanje pazufloksacina (PAZU) obuhvaćaju i HPLC [68] i CE metodu [69, 70]. Analizirane matrice bile su farmaceutске formulacije (tablete) i biološke tekućine, tj. serum, plazma, urin, homogenati mišića i slina. Primjenjene kolone u HPLC metodama su C18 i C8. Sadržaj ACN-a u mobilnoj fazi nije premašio 15,5% [68]. Druge komponente bile su 0,5% fosforna kiseline koja sadrži 1% TEA ili 1% TEA otopine ili 0,1% mravlje kiseline pri pH 3,0 prilagođenoj s TEA. CE separacija provodi se na sobnoj temperaturi, a pozadinski elektrolit (BGE) je vodena otopina TRIS pufera i fosforne kiseline. Druge komponente bile su fosfatni pufer i β -ciklodekstrini [70]. pH je bio unutar raspona 5,04–9,00. Duljina kapilare ovisi o primijenjenom naponu. Primijenjen je niži napon i korištena je kraća kapilara (Tablica 4).

Priprema uzorka obuhvaća precipitaciju proteina s metanolom, ACN ili 6% perklornom kiselinom i metanolom, LLE s diklorometanom i razrjeđivanje. LOD je ovisio o pripremi uzorka bio unutar raspona od 0,01-0,3 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakciju, od 0,01 do 0,1 $\mu\text{g/mL}$ za precipitaciju proteina, a za razrijeđeni urin bio je najviši od 7 $\mu\text{g/mL}$ (Tablica 4).

Sparfloksacin

Metoda za analizu sparfloksacina (SPAR) obuhvaća spektroskopske i kromatografske metode. Metode razdvajanja obuhvaćaju HPLC [60, 71-73], tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC) [74] i CE [75]. Gupta i sur. [2010] usporedili su HPLC s UPLC [74]. Utvrđeno je da je simetrijski faktor smanjen, a vrijeme eluiranja za SPAR bilo je 10 puta niže kod UPLC analize. Broj teorijskih tavana je tri puta veći za UPLC nego za HPLC. Primjenjena detekcija u kromatografskoj analizi bila je UV i MS.

Kamberi i sur. (1999) opisali su jednostavnu i brzu metodu za određivanje sparfloksacina u ljudskoj plazmi i urinu. Korištena je HPLC metoda reverzних faza s UV detekcijom. Proteini plazme učinkovito su uklonjeni precipitacijom s perklornom kiselinom nakon dodavanja grepafloksacina kao internog standarda. Za uzorke urina, priprema uzorka bilo je razrjeđivanje. Razdvajanje je postignuto na C18 koloni reverzne faze. Granica kvantifikacije bila je 0,025 mg/L u plazmi i 0,5 mg/L u urinu [71].

MRM koji se upotrebljava u MS/MS analizi je: m/z 393,2 \rightarrow 349,3 i m/z 392,9 \rightarrow 348,7 [73]. Razdvajanje je provedeno na C18 koloni. Matrice koje su analizirane tom metodom bile su plazma, urin, serum i tkiva (mišića).

Organsko otapalo primijenjeno u analizi bio je ACN. U izokratnoj eluciji sadržaj ACN-a je bio do 80% [73]; međutim, u drugim analizama sadržaj je bio u rasponu od 12-20%. Uz ACN, također je korišten metanol. Druge tvari u mobilnoj fazi bili su 0,1% ortofosforna kiselina, 5% octena kiselina, NaH_2P_0_4 , 54 mM mravlja kiselina, 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ i 0,1% TFA. Dodavanje kiseline rezultiralo je blago kiselim pH mobilne faze.

CE je provedena s tetraboratnim i fosfatnim puferom s dodatkom nanočestica silicijevog dioksida. pH je bio oko 9,0. Utvrđen je utjecaj koncentracije nanočestica silicijevog dioksida na razlučivanje i selektivnost razdvajanja [75]. Priprema uzorka uključivala je precipitaciju proteina s 20% HClO_4 i ACN, LLE s etil acetatom, ekstrakciju s ACN uz dodatak fosforne kiseline/vode i heksana u mišićnom tkivu i razrjeđivanje. Dodavanje male količine fosforne kiseline povećalo je analitički prinos SPAR-a iz mišićnog tkiva. Također je korištena mravlja kiselina; međutim, analitički prinos u ovom slučaju bio je niži [60]. Granice detekcije uvelike ovise o primijenjenoj detekciji. Najniže su zabilježene za MS detekciju [73] (Tablica 4).

4.2. ODREĐIVANJE FLUOROKINOLONA ČETVRTE GENERACIJE

Moksifloksacin

Moksifloksacin (MOXI) se može analizirati pomoću mnogih analitičkih metoda. Najčešće su korištene HPLC metode reverznih faza s različitim detektorima kao što su UV [76, 77], FLD [78], MS [79] i DAD [7]. Također se koristi i CE [80]. Glavna komponenta mobilne faze u HPLC razdvajanju bio je fosfatni pufer. Koncentracija fosfatnog pufera bila je unutar raspona od 10-50 mM; međutim, postoji metoda s visokom koncentracijom natrijevog fosfata (0,25 M) [81]. Druga komponenta vodene faze može biti karboksilna kiselina kao što je limunska kiselina, mravlja kiselina, octena kiselina, TFA ili njegov anhidrid; organske soli kao što su amonijev acetat i SDS.

U mnogim je postupcima sastavni dio mobilne faze bio reagens ionskog para. Najčešći je bio TEA [76-77]. Koncentracija je bila u rasponu od 0,03-2,00%. Najniža koncentracija je primijenjena u metodi s MS detekcijom. Za ostale detektore minimalna koncentracija TEA bila je 0,1%. Drugi reagensi ionskih parova su bili TBAA, TBAmBr i tetrabutylamonijev klorid (TBA • Cl). Reagens ionskog para smanjuje asimetriju vrhova zbog interakcije s silanolnim skupinama. Smanjuje dostupnost slobodnih silanola u stacionarnoj fazi i interakcije analita s njima. Dodatak reagensa ionskog para trebao bi biti što je moguće niži. Visoka koncentracija uzrokuje dugo vrijeme uravnoteženja kolone i teško je isprati kolonu. Intenzivna asimetrija vrhova također se opaža pri pH 4,5 i 5,5. Za to su odgovorne negativno nabijene silanolne skupine iz stacionarne faze i pozitivno nabijene aminske skupine MOXI-a. Smanjenje pH vrijednosti na 3,5 rezultira boljom simetrijom kromatografskih vrhova. Silanolne skupine iznad pH 3,5 su ionizirane i djeluju u interakciji s primarnim i sekundarnim aminima. Sadržaj vodene faze u izokratnoj eluciji

bio je 57-95%. Organska otapala primijenjena u kromatografskoj analizi bili su ACN, metanol ili oboje. pH mobilne faze bio je kiseli od 2,5–6,0. Studiju koju su proveli Laban-Đurđević i sur. (2006) pokazala je da su najvažniji čimbenici koji utječu na vrijeme zadržavanja i razlučivanje bili koncentracija ACN i pH mobilne faze [81]. Pokazalo se da ionska jakost fosfatnog pufera ima manji utjecaj. Statističkom metodom utvrdili su da površina ima maksimum između 10 i 15% udjela ACN-a i pH unutar raspona od 3,0 – 4,5.

U MS/MS analizi primijenjeni su sljedeći MRM prijelazi: m/z 402,1 \rightarrow 260,0, m/z 402,0 \rightarrow 358,2 i m/z 402 \rightarrow 384, m/z 402 \rightarrow 358 [79].

Sljedeća tehnika razdvajanja primijenjena u MOXI analizi je CE. BGE u opisanom postupku sastojao se od pufera (i organskih i anorganskih), soli i TEA. Kako bi se poboljšalo razlučivanje za enantiomere, primijenjeni su sulfatirani γ - ciklodekstrin [82]. pH je ovisio o komponentama mobilne faze, a bio je u kiselom ili bazičnom području. Mjerenja su izvedena na sobnoj temperaturi.

Đurđević i sur. (2009) i Cruz i sur. (2005) opisali su metode koje su također bile prikladne za analizu onečišćenja [76, 82]. Temelje se na HPLC i CE tehnikama. Postupak HPLC bio je prikladan za analizu onečišćenja i produkata prisilne razgradnje [76]. Metoda CE bila je prikladna za određivanje S, S-, R, R-, R, S- i S, R-dijastereoizomera MOXI. Aktivni je bio S, S-izomer, a ostali su potencijalni kiralni razgradni produkti MOXI [82].

Priprema uzorka uključuje slijedeće tehnike kao što je ekstrakcija, precipitacija proteina i razrjeđivanje. Tehnike ekstrakcije obuhvaćaju klasičnu LLE s diklormetanom, etil acetatom i SPE. Precipitacija proteina provedena je pomoću ACN, metanola, smjese ACN i metanola i HClO₄. Analizirane matrice bile su plazma, serum, krv, slina, mišići i farmaceutski dozirni oblici.

Detekcija MOXI u biološkim matricama uključivala je uglavnom fazu ekstrakcije ili precipitacije proteina. Međutim, također je primijenjena ultrafiltracija s SDS-om i mikrofiltracija. Dodani reagens korišten je kao faktor za oslobađanje lijeka od proteina, povećavajući topljivost proteina i smanjuje vezanje s lijekom. Ispitivane su različite koncentracije SDS i otkriveno je da je najoptimalniji bio 10 mM SDS i fosforni pufer podešen na pH 3,0. Dodatak SDS također je povećao intenzitet fluorescencije [81]. Priprema uzorka u farmaceutskim dozirnima oblicima bilo je razrjeđivanje. U većini metoda korišteni su interni standardi. LOD i LOQ uglavnom su bili reda veličine $\mu\text{g/mL}$. Međutim, i MS i FLD ili UV detekcija omogućuju detekciju razine ng/mL (Tablica 4).

Trovafloksacin

Trovafloksacin (TROVA) se analizira pomoću HPLC s UV i FLD detekcijom [5, 55, 83]. Razdvajanje se provodi na C18 koloni. Organsko otapalo primijenjeno u analizi je ACN ili kao smjesa s metanolom. Reagensi ionskog para koji se koriste su TBA kao hidroksid, hidrogensulfat ili acetat i TEA. Anorganski sastojci su natrijev dihidrogen fosfat, natrijev fosfat ili 0,1% mravlja kiselina. Ostale tvari koje se nalaze u mobilnoj fazi su SDS i limunska kiselina. pH mobilne faze je slabo kiseli. Analizirane matrice su plazma, serum i urin. Priprema uzorka je precipitacija proteina sa smjesom ACN i perklorne kiseline (za serum) i s 20% perklorne kiseline (za plazmu), dok je urin prije analize razrijeđen s otopinom natrijeva fosfata. Druga tehnika je ultrafiltracija s pripremljenom 0,5% otopinom SDS. LOD-ovi su slični za spomenute kromatografske postupke s precipitacijom proteina. Granica detekcije je viša za urin nego za plazmu i serum (Tablica 4).

Sitafloksacin

Sitafloksacin (SITA) je analiziran pomoću kromatografskih metoda s masenom detekcijom [84, 85]. MS/MS analiza temelji se na sljedećim MRM: m/z 410,1 \rightarrow 392,1 i m/z 410,1 \rightarrow 392,2 [84]. Sastav korištene mobilne faze u opisanim metodama je sličan. To je smjesa metanola i 0,1% mravlje kiseline. Kod metode gdje je sadržaj otopine mravlje kiseline bio veći (54 vs. 62%) temperatura razdvajanja bila je također viša, tj. 35 do 40 ° C. U oba slučaja metoda za pripremu uzorka bila je precipitacija proteina. Otapalo je metanol s 0,1% dodatkom mravlje kiseline [85] ili izopropanola [84]. Kalibracijska krivulja bila je linearna u rasponu od 5–2500 ng/mL s donjom granicom kvantifikacije od 5 ng/mL [84].

Prulifloksacin

Prulifloksacina (PRULI) je prolijek ulifloksacina (ULI). Neki opisani postupci za određivanje PRULI također opisuju i određivanje ULI. ULI se također smatrao onečišćenjem prulifloksacina [86]. Oba spoja su analizirana HPLC metodom s UV [86] ili MS detekcijom [87] i CE [88]. U MS/MS analizi za PRULI zabilježeni su sljedeći MRM: m/z 462 \rightarrow 444; m/z 462 \rightarrow 418; m/z 460 \rightarrow 360; m/z 462 - 350. Ti prijelazi korisni su u analizi razgradnih produkata PRULI. U MS/MS detekciji za ULI korišten je MRM: m/z 350 \rightarrow 248 [87]. Analizirane matrice su bile tablete, plazma i urin. Odvajanje je provedeno na C18 i HILIC kolonama. Mobilna faza sastojala se od ACN i metanola. ACN se može zamijeniti alkoholom; međutim, u ovom slučaju njezin sadržaj mora biti veći da bi se postigao isti stupanj zadržavanja na HILIC koloni [86]. Ostale komponente mobilne faze bile su kalijev dihidrogen fosfat, amonijev acetat i mravlja kiselina.

BGE u CE sastoji se od natrijevog citrata, limunske kiseline i natrijevog sulfita. Priprema uzoraka je uključivala usitnjavanje i otapanje odgovarajućim otapalom u slučaju tableta, razrjeđivanje i precipitaciju proteina s metanolom. Granice detekcije ovise o primijenjenoj matrici i detektoru. Najniže su bile za MS detekciju za PRULI. Ista vrsta detekcije za ULI rezultirala je višim LOD vrijednostima [87]. U metodama gdje su detektirani PRULI i ULI istovremeno, granice detekcije bile su niže za PRULI [86] (Tablica 4).

Gemifloksacin

Gemifloksacin (GEMI) je analiziran pomoću HPLC i tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC). Metode HPLC uključuju UV i FLD detekciju [89-91]. HPTLC ploče su detektirane na UV svjetlu [91]. Korištene kolone bile su C18 i HILIC. Kao u prethodno navedenoj metodi primijenjena organska otapala su ACN i metanol. Vodene otopine sadržavale su 10 mM amonijevog acetat, 0,1% TFA, natrijev acetat i ortofosfornu kiselinu. Etil acetat i amonijak korišteni su u HPTLC razdvajanju [91]. Analizirane matrice su krv i plazma. Priprema uzorka uključuje ekstrakciju s metanolom, ultrafiltraciju i LLE s smjesom kloroforma i octene kiseline. Granice kvantifikacije su bile niže za FLD detekciju nego za UV detekciju (Tablica 4).

Gatifloksacin

U analizi gatifloksacina (GATI) primijenjene su HPLC i CE tehnike. HPLC metode uključivale su FLD [92], UV detekciju [93] i MS detekciju [93]. Detekcija u CE uključivala je detekciju UV zračenja [6, 70, 75], kapacitivno uparenu detekciju beskontaktno provodljivosti [80] i elektroluminescenciju.

Kromatografska analiza provedena je na C18 koloni. Organsko otapalo je bio ACN i metanol. Reagensi ionskog para su TBAA, TEA i TBAmBr. Ostale komponente su fosfati, SDS, limunska kiselina, 0,1% FA, amonijev acetat i fosforna kiselina. pH mobilne faze je kiseli. Kromatografska analiza je izokratna [92] i gradijentna [93]. CE razdvajanje je provedeno na TRIS/hidrokloridu, tetraboratnom puferu, fosfatnom puferu s ciklodekstrinima, dinatrijevom tetraboratnom puferu s nanočesticama silicijevog dioksida. U MS-MS analizi korišteni su slijedeći MRM: m/z 375,9 \rightarrow 332,0 i m/z 375,9 \rightarrow 260,9 [93].

Analizirane matrice su tablete, serum, plazma, krv, urin, mišići i uzorci hrane. Priprema uzoraka uključivala je usitnjavanje i otapanje, ultrafiltraciju, precipitaciju proteina s ACN ili metanolom ili smjesom ACN i metanola, razrjeđivanje s odgovarajućim otapalom, LLE, SPE i ASE (ubrzana ekstrakcija otapalom) [93]. Granice detekcije i kvantifikacije ovise o primijenjenoj detekciji i niže su za MS detekciju (Tablica 4).

Tablica 4 Metode za određivanje fluorokinolona u različitim matricama

ANALIZIRANI FLUOROKINOLON	UZORAK	METODA	PRIPREMA UZORKA	LOD/LOQ
LEVO	Plazma	HILIC-MS/MS, kolona: HILIC Silica kolona, mobilna faza: ACN-amonij format (100 mM pH 6.5) 82:18 (v/v) izokratna elucija, T 30°C	LLE s diklormetanom	LLOQ - 10 ng/mL
LEVO	Farmaceutske formulacije	HPLC-UV; kiralna separacija, kolona: C18, mobilna faza: CMPA - MeOH (88:12), izokratna elucija	Razrjeđivanje	LLOQ - 0.5 mg/L
LEVO	Homogenati tkiva	LC-MS, kolona: C18, mobilna faza A: ACN, voda, mravlja kiselina; B:ACN ,mravlja kiselina, gradijentna elucija	SPE	LOQ - 0.02 µg/g
LEVO	Tkiva, plazma	HPLC-MS/MS, kolona: C4, mobilna faza: A: 0.05% mravlja kiselina, B: metanol, gradijentna elucija	Precipitacija proteina s metanolom	LOD - 0.05 µg/g (tkiva) 6.6 ng/mL (plazma) LLOQ - 0.13 µg/g (tkiva) 21.8 ng/mL (plazma)
LEVO	Plazma	HPLC-FLD, kolona: C18; mobilna faza: A: MeOH : 1M NH ₄ OAc : H ₂ O - 10:5:85 v/v/v) B: MeOH : 1M NH ₄ OAc : H ₂ O - 40:5:55 v/v/v) gradijentna elucija	Precipitacija proteina s 50% TFA	LLOQ - 0.1 µg/mL
LEVO	Plazma, urin	HPLC-UV; kolona: C18; mobilna faza: (5mM CuSO ₄ , 10 mM L-izoleucin) : metanol 87.5:12.5 izokratna elucija; temperatura 35°C	LLE s diklormetanom	LLOQ - 0.08 µg/mL (plazma) 23 µg/mL (urin)
LEVO	Krv, žuč	HPLC-FLD; kolona: C18; mobilna faza: ACN 1mM 1-oktansulfonska kiselina (40:60 v/v, pH: 3.0)	Mikrodijaliza	LOD - 50 ng/mL LLOQ - 0.1 µg/mL
LEVO	Plazma	HPLC-FLD; kolona: C18; mobilna faza: ACN - 0.4% TEA pH 3.0 (24:76 v/v), izokratska elucija	Precipitacija proteina s ACN	LOD - 0.03 mg/L LLOQ - 0.15 mg/L
LEVO	Urin	CE sa detekcijom elektroluminescence, kapilara: silikatna kapilara; 18kV; pufer: 20 mM PBS pH 8.0	Precipitacija proteina s ACN	LOD - 6.4 x 10 ⁻⁷ M LOQ - 1.4 x 10 ⁻⁶ M
LEVO	Voda	CE sa UV detekcijom; kapilara: silikatna kapilara; BGE (3 M octena kiselina, 49 mM amonij acetat u 55:45 v/v metanol: ACN), 30kV, temperatura 20°C	Disperzivna mikroekstrakcija tekuće - tekuće	LOD - 5.74 µg/mL LOQ - 19.1 µg/mL
LEVO/PAZU	Serum	HPLC-FLD; kolona: C8-3; mobilna faza: 1% TEA pH 3.0: ACN (86:14 v/v), izokratna elucija	Precipitacija proteina s 6% HClO ₄ i metanol	LLOQ - 0.1 µg/mL (LEVO i PAZU)
LEVO/MOXI/GATI	Tablete	CE sa UV detekcijom; kapilara: silikatna kapilara, 25 kV, pufer: 25 mM TRIS/hidroklorid i 15 mM natrij tetraborat, pH 8.87, temperatura 25 °C	Otapanje	LOD - 1.02 mg/L, LOQ - 3.40 mg/L (LEVO) LOD - 1.53 mg/L, LOQ - 5.11 mg/L (MOXI) LOD - 1.51 mg/L, LOQ - 5.03 mg/L (GATI)
LEVO/MOXI/GATI/TROVA	Plazma	HPLC-UV/FLD; kolona: C18; mobilna faza: A: 10 mM SDS, 10 mM TBAA, 25 mM imunska kiselina, B: ACN pH 3.5 (57:43 v/v), izokratna elucija	Ultrafiltracija pripremljenog uzorka sa SDS 0.5% otopinom	LLOQ - 50 ng/mL za UV detekciju i 20 ng/mL za FLD detekciju (LEVO, MOXI, GATI, TROVA)
LEVO/MOXI/PAZU/GATI/TROVA	Plazma	HPLC-FLD; Kolona: C18; mobilna faza: A: 0.1% mravlja kiselina podešena na pH 3.0 sa TEA, B: ACN i C: MeOH, gradijentna elucija	Precipitacija proteina s ACN	LOD - 0.01 µg/mL (LEVO, PAZU, MOXI), 0.02 µg/mL (TROVA), 0.0025 µg/mL (GATI) LOQ - 0.02 µg/mL (LEVO, PAZU, MOXI), 0.04 µg/mL (TROVA), 0.005 µg/mL (GATI)
LEVO/MOXI/GATI	Plazma	HPLC-UV; Kolona: C18; mobilna faza: 20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 3.2: ACN (75:25 v/v), izokratska	Precipitacija proteina smjesom ACN i metanola (1:1)	LLOQ - 0.1 µg/mL (LEVO, MOXI i GATI)
LEVO/SPAR	Mšić	HPLC-MS/MS, kolona: C18, mobilna faza: A: 54 mM mravlja kiselina, 10 mM CH ₃ COONH ₄ , B: ACN, gradijentna elucija, temperatura 30 °C	Ekstrakcija ACN-om s 0,3 % udjela otopine fosoforna kiselina/voda (70:30 v/v) i	LOD - 3.6 ng/g . LLOQ - 11.9 ng/g (LEVO) LOD - 2.7 ng/g, LLOQ - 8.9 ng/g (SPAR)
BALO	Plazma	HPLC-MS; kolona: C18; mobilna faza: metanol: voda (10 mM CH ₃ COONH ₄ , pH 3.0) (40:60 v/v), izokratska elucija, temperatura 40°C	LLE sa smjesom diklormetana i etil acetata (20:80 v/v)	LOD - 0.02 µg/mL LLOQ - 0.03 µg/mL
BALO	Tablete	HPLC-UV; kolona C18; mobilna faza: 0.01M KH ₂ PO ₄ : ACN, pH 6.5 (40:60 v/v), izokratna elucija, temperatura 30 °C	Razrjeđivanje	LOD - 0.85 µg/mL LOQ - 2.58 µg/mL
PAZU	Slina, serum	HPLC-UV, kolona: C18; mobilna faza: ACN: 0.5% fosforna kiselina koja sadrži 1% TEA (155:850 v/v), izokratna elucija	Precipitacija proteina metanolom	LOD - 10 ng/mL
PAZU	Tablete	CE sa detekcijom promjene potencijala; kapilara: silikatna kapilara; 3 kV; pufer: 30 mM Tris i 4 mM fosforna kiselina sa pH 8.9; temperatura 20 °C	LLE s diklormetanom	LOD - 39 ng/mL LOQ - 130 ng/mL
PAZU	Mšić	CE sa detekcijom promjene potencijala; kapilara: silikatna kapilara; 3 kV; pufer: 30 mM Tris i 3 mM fosforna kiselina sa pH 9.0; sobna temperatura	LLE s diklormetanom	LOD - 0.3 ng/L
PAZU/GATI	Urin	CE sa UV detekcijom; kapilara: silikatna kapilara, 10 kV; pufer: 70 mM fosfatni pufer i 40 mM hidroksipropil β-ciklodekstrin pH 5.04 za pazifloksacin i 20 mM hidroksipropil β-ciklodekstrin pH 3.90 za gatifloksacin; temperatura 20 °C	Razrijedivanje s vodom	LOD - 7 µg/mL za PAZU

ANALIZIRANI FLUOROKINOLON	UZORAK	METODA	PRIPREMA UZORKA	LOD/LOQ
SPAR	Farmaceutske formulacije	UPLC-UV; kolona: C18; mobilna faza: A: 0.1 % ortofosforna kiselina, B: ACN, gradijentna elucija, temperatura 50 °C	Otapanje	LOD - 0.2 µg/mL LOQ - 0.6 µg/mL
SPAR	Plazma, urin	HPLC-UV; kolona: C18; mobilna faza: 5% octena kiselina: ACN: metanol (76:12:12) sa 1% dodavanjem TEA u mobilnu fazu; izokratska elucija; temperatura 50°C	Precipitacija proteina s 20% perklorom kiselinom za uzorke plazme. Uzorci urina razrijeduju se vodom	LOQ - 0.025 mg/L (plazma) 0.5 mg/L (urin)
SPAR/MOXI/GATI	Plazma	HPLC-UV; Kolona: C18; mobilna faza: NaH ₂ PO ₄ (pH 2.5):ACN(80:20 v/v); izokratska elucija; temperatura 35°C	LLE s etil-acetatom	LOQ - 100 ng/mL (za svaki)
SPAR	Plazma	HPLC-MS/MS; Kolona: C18; mobilna faza: 10 mM CH ₃ COONH ₄ (pH 4.0) : ACN (20:80 v/v), izokratska elucija	Precipitacija proteina s ACN	LLOQ - 10 ng/mL
SPAR/PAZU/GATI	Serum	CE sa UV detekcijom; kapilara: silikatna, 10 kV; pufer: 12 mM dinatrijev tetraborat pH 9.08 sa dodavanjem silikatnih nanočestica (5.2 µg/mL), temperatura 25°C	Razrijedivanje s otopinom pufera	LOD - 2 µg/mL (GATI, PAZU), 2.5 µg/mL (SPAR) LOQ - 5 µg/mL (GATI, SPAR) 6 µg/mL (PAZU)
MOXI	Plazma	LC-MS/MS; kolona: C18; mobilna faza: metanol: 0.03% TA (85:15 v/v), izokratna elucija, temperatura 30°C	Precipitacija proteina s metanolom	LLOQ - 0.1 µg/mL
MOXI	Slina	HPLC-FLD; kolona: C18; mobilna faza: 50 mM fosfatni pufer (KH ₂ PO ₄) pH 2.6 :ACN(80:20 v/v); izokratska elucija	Precipitacija proteina s 7% HClO ₄	LOD - 0.03 µg/mL LOQ - 0.1 µg/mL
MOXI	Krv	LC-MS/MS; kolona: C18; mobilna faza: A: (amonij acetat 10g/L, octena kiselina 35 mg/L, trifluorocteni anhidrid 2 mL/L vode), B: voda, C: ACN, gradijentna elucija	Ekstrakcija s cijanoimipraminom u smjesi metanola i vode	LLOQ - 0.05 ng/L
MOXI	Farmaceutske formulacije	HPLC-UV; kolona C18; mobilna faza: 2% TEA, pH 6.0 i ACN (90:10 v/v), izokratna elucija	Razrijedivanje	LOD - 0.05 µg/mL LOQ - 0.2 µg/mL
MOXI	Plazma	HPLC-UV; kolona: C8; mobilna faza: ACN:metanol: (20 mM, 1% TEA pH 3.0) KH ₂ PO ₄ (15:20:65 v/v/v); izokratska elucija; temperatura 30°C	LLE s diklormetanom	LOD - 0.015 µg/mL LLOQ - 0.05 µg/mL
MOXI	Plazma	LC ESI-MS/MS; kolona: C18; mobilna faza: 0.1% mravlja kiselina i ACN (60:40 v/v)	SPE	LOD - 50 pg/mL LOQ - 1 ng/mL
MOXI	Plazma	HPLC-FLD; kolona: LC-Hisep; mobilna faza: ACN : 0.25M Na ₃ PO ₄ pH 3.0 (5:95 v/v), izokratna elucija	Mikrofiltracija	LOD - 1 µg/L, LOQ - 3 µg/L (plazma) LOD - 0.1 µg/L, LOQ - 1 µg/L (voda)
MOXI/SPAR	Plazma	HPLC-DAD/FLD; kolona: C18; mobilna faza: ACN i 0.1% TFA, gradijentna elucija	Precipitacija proteina s ACN	LOQ - 0.04 µg/mL (MOXI) FLD detekcija, 0.3 µg/mL (SPAR) DAD detekcija
MOXI/GATI	Mišić	CE sa kapacitivno uparenom beskontaktnom detekcijom provodljivosti; kapilara: silikatna, 13 kV; pufer: BGE 85% /10 mM vinska kiselina, 14 mM natrij acetat i 15% metanol (v/v) pH 3.8, sobna temperatura	LLE s diklormetanom, odmaščivanje homogenata sa n-heksanom	LOD - 0.33 µg/mL (MOXI), 0.45 µg/mL (GATI) LOQ - 1.4 µg/mL (MOXI), 2.1 µg/mL (GATI)
TROVA	Plazma	HPLC-UV; kolona: C18; mobilna faza: A: 17.5 mM NaH ₂ PO ₄ , 1.5 mM tetrabutilamonij hidroksid pH 3.0, B: ACN i metanol (1:1 v/v); gradijentna elucija	Precipitacija proteina s 20% HClO ₄	LOD - 2 ng/mL LLOQ - 10 ng/mL
TROVA	Serum, urin	HPLC-FLD; kolona: C18; mobilna faza: za serum: ACN i 14.3mM tetrabutilamonijev hidrosulfat: ACN-fosforna kiselina/voda, pH 3.68, za urin: ACN:otopina natrij fosfata, pH 3.6, izokratna elucija	Precipitacija proteina sa smjesom ACN i HClO ₄ za serum, Razrijedivanje s otopinom natrij	LOD - 0.02 mg/L (serum), 0.1 mg/L (urin) LLOQ - 0.07 mg/L (serum), 0.5 mg/L (urin)
SITA	Urin	HPLC-MS/MS; kolona: C18; mobilna faza: metanol: 0.1% mravlja kiselina (38:62 v/v), izokratska elucija; temperatura 40°C	Precipitacija proteina s 0.1% otopinom mravlje kiseline i metanola	LLOQ - 0.025 µg/mL
SITA	Plazma	HPLC-MS/MS; kolona: C18; mobilna faza: metanol: 0.1% mravlja kiselina (46:54 v/v), izokratska elucija; temperatura 35°C	Precipitacija proteina s izopropanolom	LLOQ - 5 ng/mL
PRULI	Tablete	HPLC-UV; kolona: C18; mobilna faza: ACN : KH ₂ PO ₄ pufer pH 7.30 podešena sa TEA (10:90 v/v), izokratska	Ustnjanje i otapanje u mobilnoj fazi	LOD - 0.1404 µg/mL LOQ - 0.4255 µg/mL
PRULI (ULI)	Tablete	HPLC-UV; kolona HILIC; mobilna faza: ACN : amonijev acetat (5mM, pH 5.8) (88:12 v/v)	Mrvljenje i otapanje metanolom	LOD - 0.15 µg/mL (PRULI), 3.0 µg/mL (ULI) LLOQ - 0.25 µg/mL (PRULI), 5.0 µg/mL (ULI)
PRULI (ULI)	Plazma	HPLC-MS/MS; kolona: C18; mobilna faza: metanol : voda : mravlja kiselina (70:30:0.2), izokratska elucija	Precipitacija proteina s metanolom	LLOQ - 0.025 µg/mL (ULI)
PRULI	Urin	CE sa elektroluminescencijom; silikatna kapilara; pufer 20 mM natrij citrat, 4 mM limunska kiselina, 10 mM natrij sulfat pH 6.1	Razrijedivanje vodom	LOD - 0.084 µg/mL
GEMI	Krv	HPLC-FLD; kolona HILIC; mobilna faza: ACN i 10mM amonijev acetat pH 3.5 (80:20 v/v), izokratska elucija	Ekstrakcija s metanolom	LLOD - 10 ng/mL LLOQ - 25 ng/mL
GEMI	Plazma	HPLC-FLD; kolona: C18; mobilna faza 0.1% TFA : ACN (80:20 v/v), izokratska elucija	Ultrafiltracija	LLOD - 10 ng/mL LLOQ - 25 ng/mL
GEMI	Plazma	HPLC-UV; kolona: C18; mobilna faza: metanol : 1% natrij acetat : ortofosforna kiselina (65:35:0.5 v/v/v) pH 2.1, izokratska elucija	LLE sa smjesom kloroforma i octene kiseline	LLOQ - 0.3 µg/mL
GEMI	Plazma	HPTLC; mobilna faza: etil acetat : metanol : amonijak, detekcija pri 254 nm	LLE sa smjesom kloroforma i octene kiseline	LLOQ - 0.5 µg/mL
GATI	Urin, krv	CE sa elektroluminescencijom; silikatna kapilara 12 kV; pufer 10 mM PBS pH 5.0	SPE	LOD - 0.2 ng/mL LOQ - 0.5 ng/mL
GATI	Uzorci hrane	HPLC-MS/MS; mobilna faza: A: metanol, B: ACN, C: 5mM amonijev acetat i 0.2 % mravlja kiselina, gradijentna elucija	ASE s ACN	LOD - 0.3 µg/kg LOQ - 1.0
GATI	Plazma	HPLC-UV; kolona: C18; mobilna faza: 0.025 M Na ₂ HPO ₄ (pH 3.0) : ACN (80:20 v/v), izokratska elucija	Ultrafiltracija	LOQ - 0.1 µg/mL
GATI	Plazma	HPLC-FLD; Kolona: C18; mobilna faza: 2.5 mM fosforna kiselina : metanol : ACN : TEA (64.8:15:200.2), pH 2.8, izokratska elucija; temperatura 28°C	SPE	LLOQ - 20 ng/mL

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu opisane su različite separacijske metode koje se koriste za određivanje antimikrobnih lijekova iz skupine fluorokinolona. Fluorokinoloni sadrže amino i karboksilnu skupinu koje su podložne ionizaciji. Njihova zwitterionska priroda može dodatno otežati razdvajanje i analizu. Glavni problemi koji se susreću prilikom analize fluorokinolona su loša simetrija kromatografskih vrhova i slabo razlučivanje na koloni. Najčešće korištena organska otapala su ACN i metanol u gradijentnoj ili izokratnoj eluciji. Razdvajanje fluorokinolona često se provodi na reverznoj fazi. Kolone koje se najčešće koriste su C18, C8 i C4. Ostale kolone koje se mogu koristiti u analizi fluorokinolona su HILIC kolone koje predstavljaju alternativu za razdvajanje ioniziranih spojeva. U ovom slučaju potrebno je najmanje 80% organskog otapala (uglavnom ACN). Ova vrsta kolone je poželjna za razdvajanje kod MS analize. Jedan od sastojaka mobilne faze u analizi fluorokinolona je otopina reagensa ionskog para (TEA, TBAA, SDS ili drugi) koji uzrokuju bolju interakciju analita s nepolarnom stacionarnom fazom. Reagens ionskog para treba dodati u mobilnu fazu kada dodavanje pufera s odgovarajućom pH vrijednošću ne rješava problem simetrije vrhova ili ne pruža dobro razlučivanje analita. Primijenjena stacionarna faza, dodavanje organskih ili anorganskih soli u mobilnu fazu, reagens ionskog para, kao i odgovarajuća pH vrijednost utječu na oblik vrhova i mogu imati utjecaj na LOD i LOQ vrijednosti.

Ostale parametre koje treba razmotriti u analizi fluorokinolona su priprema uzorka i odabir detektora. Kod kvantitativne analize primijenjena metoda mora biti prikladna za predviđenu koncentracijsku razinu analita, upotrijebljenu matricu i cilj analize. Analize koje se provode u biološkim uzorcima zahtijevaju odgovarajuću pripremu. LOD i LOQ su viši kod metoda koje uključuju precipitaciju proteina nego one koje uključuju LLE ili SPE ekstrakciju. Ekstrakcijske

tehnike su zahtjevnije kod pripreme uzoraka, ali su korisne za detekciju nižih koncentracija analita u uzorku. Kada je potrebno ukloniti proteine najmanja složena procedura je precipitacija proteina. LLE ili SPE su složenije tehnike, postupci su dugotrajniji i skuplji jer uključuju upotrebu dodatnih reagensa i opreme, a često su moguće i greške pri ekstrakciji. Druga prednost precipitacije proteina je da je analitički prinos analita veći nego kod tehnika ekstrakcije (SPE i LLE). Priprema uzorka trebala bi biti što jednostavnija i prilagođena matrici. Postoje matrice koje zahtijevaju složeniju pripremu uzorka poput homogenata tkiva. U ovom slučaju ne samo da bi trebali biti uklonjeni proteini, već i lipidi. Kod analize farmaceutskih dozirnih oblika fluorokinolona nema potrebe za primjenom navedenih koraka pripreme uzoraka, dovoljno je razrjeđivanje.

Metode koje primjenjuju fluorescentnu ili masenu detekciju karakteriziraju niži LOD i LOQ. Kombinacija masene detekcije s ekstrakcijskim korakom rezultira LOD-om reda veličine pg/mL. MS analiza zahtijeva organsku kiselinu kao sredstvo za protoniranje. Najčešća su mravlja kiselina, octena kiselina, sama ili u smjesi s amonijevim acetatom. Primijenjena MS detekcija je u većini slučajeva bila tandem MS/MS. Analiza koncentracije antibakterijskih lijekova bitna je s kliničkog stajališta kako bi se izbjegla otpornost mikroorganizama na terapiju. Kod kliničke analize, gdje je potreban brzi rezultat za poboljšanje liječenja antimikrobnim lijekom, treba primijeniti precipitaciju proteina u kombinaciji s HPLC metodom. Ako nije moguće primijeniti MS detekciju, može se primijeniti FLD ili UV detekcija uz dodatak internog standarda. Fluorokinoloni treće i četvrte generacije su antibakterijska sredstva za koja su koncentracije u krvi i drugim biološkim tekućinama reda mg/L, a prikladne metode su HPLC s FLD ili UV detekcijom. Korištenje internih standarda nadoknađuje gubitak analita tijekom koraka ekstrakcije i osigurava ponovljivost rezultata.

6. LITERATURA

1. Sharma PC, Jain A, Jain S (2009) Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm* 66:587–604
2. Wispelwey B (2005) Clinical implications of pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 41:S127–S135
3. Ferrara AM (2005) New fluoroquinolones in lower respiratory tract infections and emerging patterns of pneumococcal resistance. *Infection* 33:106–114
4. Sousa J, Alves G, Fortuna A, Falcão A (2012) Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. *Anal Bioanal Chem* 403:93–129
5. Liang H, Kays MB, Sowinski KM (2002) Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cinoxacin by high-performance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human plasma. *J Chromatogr B* 772:53–63
6. Faria AF, de Souza MVN, de Almeida MV, de Oliveira MAL (2006) Simultaneous separation of five fluoroquinolone antibiotics by capillary zone electrophoresis. *Anal Chim Acta* 579:185–192
7. Cavazos-Rocha N, Carmona-Alvarado I, Vera-Cabrera L, Waksman-de-Torres N, Salazar-Cavazos L (2014) HPLC method for the simultaneous analysis of fluoroquinolones and oxazolidinones in plasma. *J Chromatogr Sci* 52:1281–1287
8. Patrick G.L., *Antibacterial agents, Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, 2003
9. Dollery C., *Norfloxacin in therapeutic drugs*, Churchill Livingstone, 1999.

10. Appelbaum PC, Hunter PA (2000) The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Ag* 16:5–15
11. Blondeau J.M., *Clin. Ther.* 21, 3 (1999)
12. Turnidge J (1999) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs* S2:29–36
13. Hawkey PM (2003) Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemoth* 51:29–35
14. Hooper DC. Expanding uses of fluoroquinolones: opportunities and challenges. *Ann Intern Med.* 1998;129:908-10.
15. Khodursky AB, Cozzarelli NR. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem.* 1998;273:27668-77.
16. Chen FJ, Lo HJ. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003;36:1-9.
17. Drlica K., Hiasa H., Kerns R., Malik M., Mustaev A., Zhao X. (2009) Quinolones: Action and resistance updated. *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 981-998
18. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:559-62.
19. Da Silva AD, De Almeida MV, De Souza MVN, Couri MRC (2003) Biological activity and synthetic methodologies for the preparation of fluoroquinolones, a class of potent antibacterial agents. *Curr Med Chem* 10:21–39
20. Martindale (2009) *The complete drug reference*, 36th edn. The Pharmaceutical Press, London, pp 302 and 1526

21. Higgins PG, Fluit AC, Schmitz FJ. Fluoroquinolones: structure and target sites. *Curr Drug Targets*. 2003;4:181-90.
22. Sarkozy G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Vet Med Czech*. 2001;46:257-74.
23. Kazakevich Y, LoBrutto R. Introduction-Chromatography in the pharmaceutical world. U: *HPLC for pharmaceutical scientists*. Kazakevich Y, LoBrutto R, urednici, New Jersey, John Wiley & Sons, 2007, str. 3
24. Sutlović D i sur. *Toksikologija hrane*. Split: Redak, 2011
25. Bhardwaj, S.K., Dwivedi, K., Agarwal, D.D. (2015) A Review: HPLC Method Development and Validation. *Int. J. Anal. Bioanal. Chem.* 5, 76-81.
26. Lalić, M. (2013) Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje sadržaja 10-hidroksi-2-decenske kiseline u proizvodima s matičnom mliječi. Rektorova nagrada, Farmaceutsko biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <www.unizg.hr/ректорова/upload_2013/Sazetak.doc>. Pristupljeno 12.5.2017.
27. Nesek, B. (2004) Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni. <https://bib.irb.hr/datoteka/185110.Diplomski_rad.pdf>. Pristupljeno 24. travnja. 2016.
28. Nigović B., Jurišić Grubišić R., Vuković J. (2007) *Praktikum iz analitike lijekova II.dio*. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko- biokemijski fakultet. Zagreb, str. 30-33.
29. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, H.F. (1999) *Osnove analitičke kemije*, prvo izd. (preveli Kujundžić, N., Živčić-Alegratti, V., Živković, A.) Školska knjiga, Zagreb.
30. Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P., Sharma, P.K. (2010) High Performance Liquid Chromatography: A Short Review. *J. Global Pharm.Technol.* 2, 22-26.

31. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J. L. (1997) Practical HPLC method development. Wiley, New York.
32. Mornar, A., Sertić, M., Nigović, B. (2013c) Quality assessment of liquid pharmaceutical preparations by HSS-GC-FID. *J. Anal. Chem.*
33. Niessen, Wilfried M. A (2006). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, Third Edition. Boca Raton: CRC Taylor & Francis. pp. 50–90
34. Cindrić, M., Marković, A., Horvatić, A. (2009) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina* 42: 218–232.
35. Holčapek, M., Jirasko, R., Lisa, M. (2012) Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A* 1259: 3–15.
36. Stachniuk, A. i Fornal E. (2016) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food*. *Food Anal. Methods* 9, 1654–1665. (objavljeno online 28.studenog 2015.). doi: 10,1007 / s12161-015-0342-0
37. Grebe, S.K., Singh, R.J. (2011) LC-MS/MS in the Clinical Laboratory—Where to From Here? *Clin. Biochem. Rev.* 32, 5–31.
38. Chen, D., Yu, J., Tao, Y., Pan, Y., Xie, S., Huang, L., Peng, D., Wang, X., Wang, Y., Liu, Z., Yuan, Z. (2016) Qualitative screening of veterinary anti-microbial agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1017, 82-88.
39. Nigović B. *Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)*. U: *Analitika lijekova*. Zagreb, 2014d.

40. M.L. Marina, A. Rios, and M. Valcarcel. *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 2005.
41. J.P. Landers and R.P. Oda. *Introduction to Capillary Electrophoresis*. J.P. Landers, Ed. CRC Press, New York, NY, 1997, pp. 1–47.
42. D. G. Watson, *Pharmaceutical Analysis*, Elsevier Limited, 2005.
43. T. G. Morzunova. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (A review). *Pharm. Chem. J.* 40: 158–170 (2006).
44. Kuhn, R.; Hoffstetter-Kuhn, S. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*; Springer-Verlag: Berlin, 1993.
45. M. Damić, B. Nigović: Kapilarna elektroforeza u farmaciji, *Farmaceutski glasnik* 66, 4/2010
46. Deeb, S., El-Hady, D. A., Albishri, H. M., de Griend, C. S. van, & Scriba, G. K. E. (2014). Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis. *Electrophoresis*, 35(1), 170–189.
47. Z. Xu, T. Esumi, N. Ikuta, T. Hirokawa, *J. Chromatogr. A* 17 (2009) 3602–3605.
48. Lauer, H. H., & Rozing, G. P. (2009). *High Performance Capillary Electrophoresis. A primer* (2nd ed.). Agilent Technologies.
49. H. Shintani, J. Polonsky, *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications*, Blackie Academic and Professional, London 1997.
50. M. Broderick, S. Donegan, J. Power, K. Altria, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 877–884.
51. Satinder, A., Ilias Jimidar, M. *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*, Volume 9, Pages 1-529 (2008)

52. Wong FA, Juzwin SJ, Flor SC (1997) Rapid stereospecific highperformance liquid chromatographic determination of levofloxacin in human plasma and urine. *J Pharm Biomed Anal* 15:765–771
53. Santoro M, Kassab N, Singh A, Kedor-Hackmam E (2006) Quantitative determination of gatifloxacin, levofloxacin, lomefloxacin and pefloxacin fluoroquinolonic antibiotics in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 40:179–184
54. Watabe S, Yokohama Y, Nakazawa K, Shinozaki K, Hiraoka R, Takeshita K, Suzuki Y (2010) Simultaneous measurement of pazufloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 878:1555–1561
55. Sousa J, Alves G, Campos G, Fortuna A, Falcão A (2013) First liquid chromatography method for the simultaneous determination of levofloxacin, pazufloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and trovafloxacin in human plasma. *J Chromatogr B* 930:104–111
56. Siewert S (2006) Validation of a levofloxacin HPLC assay in plasma and dialysate for pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal* 41:1360–1362
57. Czyrski A, Szalek E (2016) An HPLC method for levofloxacin determination and its application in biomedical analysis. *J Anal Chem* 71:874–877
58. Bao D, Truong TT, Renick PJ, Pulse ME, Weiss WJ (2008) Simultaneous determination of rifampicin and levofloxacin concentrations in catheter segments from a mouse model of a device-related infection by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 46:723–727

59. Fang PF, Cai HL, Li HD, Zhu RH, Tan QY, Gao W, Xu P, Liu YP, Zhang WY, Chen YC, Zhang F (2010) Simultaneous determination of isoniazid, rifampicin, levofloxacin in mouse tissues and plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 878:2286–2291
60. Xu H, Chen L, Sun L, Sun X, Du X, Wang J, Wang T, Zeng Q, Wang H, Xu Y, Zhang X, Ding L (2011) Microwave-assisted extraction and in situ clean-up for the determination of fluoroquinolone antibiotics in chicken breast muscle by LC-MS/MS. *J Sep Sci* 34:142–149
61. Helmy SA (2013) Simultaneous quantification of linezolid, tinidazole, norfloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and gatifloxacin in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies in human volunteers. *Ther Drug Monit* 35:770–777
62. Nguyen HA, Grellet J, Ba BB, Quentin C, Saux MC (2004) Simultaneous determination of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in serum by liquid chromatography with column switching. *J Chromatogr B* 810:77–83
63. Ji HY, Jeong DW, Kim YH, Kim HH, Sohn DR, Lee HS (2006) Hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of levofloxacin in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 41:622–627
64. Yan H, Row KH (2007) Rapid chiral separation and impurity determination of levofloxacin by ligand-exchange chromatography. *Anal Chim Acta* 584:160–165
65. Herrera-Herrera AV, Hernández-Borges J, Borges-Miquel TM, Rodríguez-Delgado M (2010) Dispersive liquid–liquid microextraction combined with nonaqueous capillary

- electrophoresis for the determination of fluoroquinolone antibiotics in waters. *Electrophoresis* 31:3457–3465
66. Bian Z, Tian Y, Zhang Z, Xu F, Li J, Cao X (2007) High performance liquid chromatography—electrospray ionization mass spectrometric determination of balofloxacin in human plasma and its pharmacokinetics. *J Chromatogr B* 850:68–73
67. Bhimanadhuni C, Garikapati D (2014) RP–HPLC method for the determination of balofloxacin in bulk and pharmaceutical dosage form. *Int J PharmTech Res* 6:376–382
68. Jiang Y, Li H, E L, Wu X, Liu H (2013) Determination of pazufloxacin concentration in saliva, gingival crevicular fluid and serum of healthy adults using high-performance liquid chromatography. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 33:53–56
69. Fan Y, Gun X, Li S, Qin W (2007) A rapid CE-potential gradient detection method for determination of quinolones. *Electrophoresis* 28:4101–4107
70. Zhou S, Ouyanga J, Baeyens W, Zhaoa H, Yang Y (2006) Chiral separation of four fluoroquinolone compounds using capillary electrophoresis with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector. *J Chromatogr A* 1130:296–301
71. Kamberi M, Kamberi P, Hajime N, Uemura N, Nakamura K, Nakano S (1999) Determination of sparfloxacin in plasma and urine by a simple and rapid liquid chromatographic method. *Ther Drug Monit* 21:411–415
72. Srinivas N, Narasu L, Shankar P, Mullangi R (2008) Development and validation of a HPLC method for simultaneous quantitation of gatifloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin using levofloxacin as internal standard in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* 22:1288–1295

73. Noh K, Kwon K, Jeong T, Kang W (2010) Quantitative determination of sparfloxacin in rat plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 24:1199–1202
74. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Sharma A, Chander P (2010) Development and validation of a stability-Indicating RP-UPLC method for the quantitative analysis of sparfloxacin. *J Chromatogr Sci* 48:1–6
75. Wang Y, Baeyens W, Huanga C, Fei G, Hed L, Ouyanga J (2009) Enhanced separation of seven quinolones by capillary electrophoresis with silica nanoparticles as additive. *Talanta* 77:1667–1674
76. Djurdjevic P, Ciric A, Djurdjevic A, Stankov MJ (2009) Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 50:117–126
77. Xu YH, Li D, Liu XY, Li YZ, Lu J (2010) High performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for moxifloxacin: validation and application to a pharmacokinetic study in Chinese volunteers. *J Chromatogr B* 878:3437–3441
78. Kumar AKH, Sudha V, Srinivasan R, Ramachandran G (2011) Simple and rapid liquid chromatography method for determination of moxifloxacin in saliva. *J Chromatogr B* 879:3663–3667
79. Vishwanathan K, Bartlett MG, Stewart JT (2002) Determination of moxifloxacin in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 30:961–968
80. Yang Z, Qin W (2009) Separation of fluoroquinolones in acidic buffer by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Chromatogr A* 1216:5327–5332

81. Laban-Djurdjević A, Jelikić-Stankov M, Djurdjević P (2006) Optimization and validation of the direct HPLC method for the determination of moxifloxacin in plasma. *J Chromatogr B* 844:104–111
82. Cruz LA, Hall R (2005) Enantiomeric purity assay of moxifloxacin hydrochloride by capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 38:8–13
83. Borner K, Hartwig H, Lode H (1999) Determination of trovafloxacin in human body fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 846:175–180
84. Hang K, Yang J, Zhang J, Ding Y, Chen L, Xu W, Xu X, Duan R, He Q (2014) Determination of sitafloxacin in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry method: application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B* 957:36–40
85. Wang Y, Liu Y, Zhang H, Wang Y, Liu Y, Wang L, Ou N (2014) A simple LC–MS/MS method for determination of sitafloxacin in human urine. *J Chromatogr B* 967:219–224
86. Locatelli M, Lutiis F, Carlucci G (2013) High performance liquid chromatography determination of prulifloxacin and five related impurities in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 78–79:27–33
87. Guo L, Qi M, JinX Wang P, Zhao H (2006) Determination of the active metabolite of prulifloxacin in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 832:280–285
88. Yang Z, Wang X, Qin W, Zhao H (2008) Capillary electrophoresis–chemiluminescence determination of norfloxacin and prulifloxacin. *Anal Chim Acta* 623:231–237
89. Al-Hadiya B, Khady A, Mostafa G (2010) Validated liquid chromatographic–fluorescence method for the quantitation of gemifloxacin in human plasma. *Talanta* 83:110–116

90. Nageswara Rao R, Gangu Naidu C, Guru Prasad K, Padiya R, Agwane S (2012) Determination of gemifloxacin on dried blood spots by hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detector: application to pharmacokinetics in rats. *Biomed Chromatogr* 26:1534–1542
91. Rote A, Pingle S (2009) Reverse phase-HPLC and HPTLC methods for determination of gemifloxacin mesylate in human plasma. *J Chromatogr B* 877:3719–3723
92. Tasso L, Costa T (2007) High performance liquid chromatography for quantification of gatifloxacin in rat plasma following automated on-line solid phase extraction. *J Pharm Biomed Anal* 44:205–210
93. Yu H, Tao Y, Chen D, Pan Y, Liu Z, Wang Y, Huang L, Dai M, Peng D, Wang X, Yuan Z (2012) Simultaneous determination of fluoroquinolones in foods of animal origin by a high performance liquid chromatography and a liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 15:885–886

7. POPIS KRATICA

KRATICA	ENGLJSKI	HRVATSKI
ACN	Acetonitrile	Acetonitril
ASE	Accelerated solvent extraction	Ubrzana ekstrakcija otapalom
AUC	Area under the curve	Površina ispod krivulje
BALO	Balofloxacin	Balofloksacin
BCE	Background electrolyte	Pozadinski elektrolit
Cmax	Maximum concentration	Maksimalna koncentracija
CCE	Chiral Capillary Electrophoresis	Kiralna kapilarna elektroforeza
CE	Capillary electrophoresis	Kapilarna elektroforeza
CEC	Capillary Electrochromatography	Kapilarna elektrokromatografija
CGE	Capillary Gel Electrophoresis	Kapilarna gel elektroforeza
CIEF	Capillary Isoelectric Focusing	Kapilarno izoelektrično fokusiranje
CITP	Capillary Isotachopheresis	Kapilarna izotahoforeza
CMPA	Chiral mobile phase additive	Kiralni dodatak mobilne faze
CZE	Capillary Zone Electrophoresis	Kapilarna zonska elektroforeza
DAD	Diode array detector	Detektor s diodnim nizom
EOF	Electroosmotic Flow	Elektroosmotski tok
ESI	Electrospray Ionization	Ionizacija elektroaspršenjem
FLD	Fluorescence detector	Detektor fluorescencije
GATI	Gatifloxacin	Gatifloksacin
GEMI	Gemifloxacin	Gemifloksacin
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography	Tekućinska kromatografija hidrofilnih interakcija
HPLC	High performance liquid chromatography	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HPTLC	High performance thin layer chromatography	Tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti
LEVO	Levofloxacin	Levofloksacin
LOD	Limit of detection	Granica detekcije
LOQ	Limit of quantification	Granica kvantifikacije
LLE	Liquid-liquid extraction	Ekstrakcija tekuće-tekuće
MEEKC	Microemulsion Electrokinetic Chromatography	Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija
MEKC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography	Micelarna elektrokinetička kromatografija
MIC	Minimum inhibitory concentration	Minimalna inhibicijska koncentracija
MOXI	Moxifloxacin	Moksifloksacin
MRM	Multiple reaction monitoring	Praćenje višestrukih reakcija
MS	Mass spectrometry	Masena spektrometrija
NACE	Nonaqueous Capillary Electrophoresis	Nevodena kapilarna elektroforeza
PAZU	Pazufloxacin	Pazufloksacin
PDA	Photodiode array	Detektor s diodnim nizom
PRULI	Prulifloxacin	Prulifloksacin
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	Natrijev dodecil sulfat
SITA	Sitafloxacin	Sitafloksacin
SPAR	Sparfloxacin	Sparfloksacin
SPE	Solid-Phase Extraction	Ekstrakcija na čvrstoj fazi
TBAA	Tetrabutylammonium acetate	Tetrabutilamonijev acetat
TBA · Cl	Tetrabutylammonium chloride	Tetrabutilamonijev klorid
TBAmBR	Tetrabutylammonium bromide	Tetrabutilamonijev bromid
TEA	Triethylamine	Trietilamin
TFA	Trifluoroacetic acid	Trifluoroctena kiselina
TROVA	Trovafloxacin	Trovafloksacin
ULI	Ulfloxacin	Ulfloksacin
UPLC	Ultra performance liquid chromatography	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
UV	Ultraviolet	Ultraljubičasto
VIS	Visible	Vidljivo