



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AMİNOGLİKOZİDLERİN ALTIN VE GÜMÜŞ
NANOPARÇACIKLAR KULLANILARAK
SPEKTROSKOPİK TAYİNLERİ**

Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Feyyaz ONUR**

2014- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AMİNOGLİKOZİDLERİN ALTIN VE GÜMÜŞ
NANOPARÇACIKLAR KULLANILARAK
SPEKTROSKOPİK TAYİNLERİ**

Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Feyyaz ONUR

**Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 14B0237001 proje numarası ile desteklenmiştir**

2014- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Doktora Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 27/08/2014

Prof. Dr. Feyyaz ONUR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sibel Aysıl ÖZKAN
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Uğur TAMER
Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Eda ŞÁTANA
Gazi Üniversitesi
(Raportör)

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Antibiyotikler	1
1.1.1. Aminoglikozidler	2
1.1.1.1. Gentamisin	3
1.1.1.2. Tobramisin	5
1.1.1.3. Amikasin	7
1.2. Nanoteknoloji ve Nanomateryaller	8
1.2.1. Tarihçe	8
1.2.2. Nanoteknolojinin Uygulamaları	9
1.2.3. Nanoparçacıklar	9
1.2.3.1. Metal Nanoparçacıklar ve Spektroskopide Kullanımı	12
1.3. Üzerinde Çalışma Yapılan Etken Maddelerin Tayinleri Konusunda Günümüze Kadar Yapılmış Çalışmalar	20
1.3.1. Spektrofotometrik Çalışmalar	20
1.3.2. Spektroflorimetrik Çalışmalar	23
1.3.3. Sıvı Kromatografisi Çalışmaları	25
1.3.4. Diğer kromatografik yöntemler	27
1.3.5. Kapiler elektroforez yöntemleri	28
1.3.6. Elektroanalitik Yöntemler	29
1.3.7. İmmünolojik yöntemler	29
1.3.8. Rezonans Rayleigh Saçılımı Spektroskopisi	30
1.3.9. Çip çalışmaları	30
1.4. Amaç	30
2. GEREÇ ve YÖNTEM	33
2.1. Gereç	33

2.1.1. Kimyasallar	33
2.1.2. Kullanılan Farmasötik Preparatlar	34
2.1.3. Cihazlar	34
2.2. Yöntem	35
2.2.1. Spektrofotometrik çalışmalar	35
2.2.1.1. Giriş	35
2.2.1.2. Etken maddelerin saflık kontrolleri	36
2.2.1.3. Gümüş nanoparçacık (AgNP) sentezi	37
2.2.1.4. AgNP'ların karakterizasyonları	37
2.2.1.4.1. AgNP'ların UV-GB ile karakterizasyonları	37
2.2.1.4.2. AgNP'ların TEM ile karakterizasyonları	37
2.2.1.5. Yöntem optimizasyonu için yapılan çalışmalar	38
2.2.1.6. Yöntem validasyonu için yapılan çalışmalar	38
2.2.1.7. Yöntemin süt analizlerinde kullanımı için yapılan çalışmalar	42
2.2.2. Spektroflorimetrik çalışmalar	43
2.2.2.1. Giriş	43
2.2.2.2. Öropyum nanoparçacıkların sentezi	44
2.2.2.3. Floresans sönümlenmesi çalışmaları	47
2.2.2.4. Yöntem optimizasyonu için yapılan çalışmalar	48
2.2.2.4.1. pH optimizasyonu	48
2.2.2.4.2. İyonik şiddet optimizasyonu	49
2.2.2.4.3. Altın nanoparçacık sentezi	49
2.2.2.4.4. Öropyum ve altın nanoparçacıkların karakterizasyonları	51
2.2.2.5. Yöntem validasyonu için yapılan çalışmalar	51
2.2.2.6. Yöntemin süt analizlerinde kullanımı için yapılan çalışmalar	53
3. BULGULAR	55
3.1. Etken Maddelerin Kontrolleri	55
3.2. Spektrofotometrik Çalışmalar	58
3.2.1. Gümüş Nanoparçacık Karakterizasyonu	58
3.2.2. AgNP ile GEN, AMİ ve TOB'un etkileşimi	62
3.2.3. Spektrofotometrik Metot Optimizasyonu Çalışmaları	64
3.2.3.1. pH Optimizasyonu	65
3.2.3.2. Tuz konsantrasyonu (iyonik şiddet)	66
3.2.3.3. Zaman	69

3.2.4. Spektrofotometrik Miktar Tayinleri	71
3.2.4.1. Tobramisin'in spektrofotometrik miktar tayini	71
3.2.4.1.1. Yöntemin tobramisin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması	74
3.2.4.1.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması	74
3.2.4.1.1.2. Yöntemin süte uygulanması	76
3.2.4.2. Gentamisin'in spektrofotometrik miktar tayinleri	77
3.2.4.2.1. Yöntemin gentamisin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması	80
3.2.4.2.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması	80
3.2.4.2.1.2. Yöntemin süte uygulanması	82
3.2.4.3. Amikasin'in spektrofotometrik miktar tayinleri	83
3.2.4.3.1. Yöntemin amikasin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması	86
3.2.4.3.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması	86
3.2.4.3.1.2. Yöntemin süte uygulanması	88
3.3. Spektroflorimetrik Çalışmalar	88
3.3.1. Floresans Sönümlenme Türünün Belirlenmesi	89
3.3.2. Altın ve Öropyum Nanoparçacıkların Karakterizasyonları	95
3.3.3. Metot Optimizasyonu	104
3.3.3.1. TOB için metot optimizasyon deneyleri	104
3.3.3.1.1. pH	104
3.3.3.1.2. İyonik Şiddet	105
3.3.3.1.3. Altın nanoparçacık boyutu	105
3.3.3.1.4. Altın nanoparçacık konsantrasyonu	106
3.3.3.2. AMİ ve GEN için metot optimizasyonu	108
3.3.3.2.1. pH	108
3.3.3.2.2. İyonik şiddet	110
3.3.3.2.3. Altın nanoparçacık boyut ve şekilleri	111
3.3.3.2.4. Altın nanoparçacık konsantrasyonu	113
3.3.4. Seçicilik Çalışmaları	114
3.3.5. Spektroflorimetrik Miktar Tayini Çalışmaları	116
3.3.5.1. Tobramisin'in spektroflorimetrik miktar tayini	116
3.3.5.1.1. Yöntemin tobramisin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması	119
3.3.5.1.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması	119

3.3.5.1.1.2. Yöntemin süte uygulanması	121
3.3.5.2. Gentamisinin spektrofotometrik miktar tayini	122
3.3.5.2.1. Yöntemin gentamisin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması	125
3.3.5.2.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması	125
3.3.5.2.1.2. Yöntemin süte uygulanması	127
3.3.5.3. Amikasinin spektrofotometrik miktar tayini	128
3.3.5.3.1. Yöntemin amikasin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması	131
3.3.5.3.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması	131
3.3.5.3.1.2. Yöntemin süte uygulanması	133
4. TARTIŞMA	135
4.1. Spektrofotometrik Çalışmalar	135
4.2. Spektrofotometrik Çalışmalar	143
4.3. Yöntemlerin Karşılaştırılması	151
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	157
ÖZET	159
SUMMARY	160
KAYNAKLAR	161
ÖZGEÇMİŞ	188

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında halk sağlığını ilgilendiren bir konuda analitik kimya alanından bir katkı sunmaya çalıştım. Sütte antibiyotik kalıntılarının analizleri için iki basit ve uygulanabilir metot geliştirdiğimiz bu çalışmada gümüş ve altın nanoparçacıkların optik özelliklerinden yararlanılmıştır. Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan spektrofotometrik ve spektrofotometrik yöntemlerin süt ve farmasötik preparatlara uygulaması yapılmıştır.

Tezin hazırlanmasında ve Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki akademik çalışmalarım sırasında bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Feyyaz ONUR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmasının bir bölümü Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Ofisi tarafından "14B0237001" proje numaralı "aminoglikozidlerin, metalle zenginleştirilmiş floresans yöntemiyle sütte ve farmasötik preparatlarda tayinleri" isimli bağımsız proje desteği ile desteklenmiştir.

Tez çalışmalarım ve araştırma görevliliğim sırasında verdikleri motivasyon, öneriler ve fiili destekleri için Prof. Dr. Sibel Aysıl ÖZKAN ve Prof. Dr. Bengi USLU'ya teşekkürlerimi sunmak isterim.

Doç. Dr. Uğur TAMER'e tez süresince hem laboratuvar desteği hem de tezle ilgili değerli önerileri nedeniyle teşekkür ederim. Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi araştırma görevlilerine, özellikle de Araş. Gör. Hilal TORUL'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışması sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. İsmail Murat PALABIYIK'a teşekkür ederim.

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarım Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ, Dr. Burcu DOĞAN TOPAL, Araş. Gör. Mehmet GÜMÜŞTAŞ, Araş. Gör. Burçin BOZAL PALABIYIK, Araş. Gör. Nurgül KARADAŞ, Araş. Gör. Sevinç TUNÇAĞIL, Araş. Gör. Zehra Ceren ERTEKİN ve Esra ÜNLÜ'ye destekleri için teşekkür ederim. Araş. Gör. Engin ER'e IR ölçümlerindeki yardımları, Dr. Çiğdem KARAASLAN'a erime noktası tayinindeki yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Görsellerin hazırlanmasındaki yardımlarından dolayı Onur Alp ULUÇAY'a teşekkür ederim.

Bütün yaşantım ve görevim sırasında maddi ve manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bana her türlü konuda destek olan aileme ve özellikle de sevgili eşim Hacer SELAMOĞLU ÇAĞLAYAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Çok büyük desteğiyle yazdığım bu tez için ona minnettarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AgNP	Gümüş nanoparçacıklar
AMİ	Amikasin
AuNP	Altın nanoparçacıklar
BSS	Bağıl standart sapma
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
DDQ	2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokinon
DLS	Dinamik ışık saçılımı
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]karbodiimid hidroklorür
EuNP	Öröpyum nanoparçacıklar
FRET	Floresans rezonans enerji transferi
GEN	Gentamisin
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi-tandem kütle dedektörü
MEF	Metalle zenginleştirilmiş floresans
NBD-Cl	4-kloro-7- nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol
NHS	N-hidroksisüksinimid
RET	Rezonans enerji transferi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEF	Yüzeyde zenginleştirilmiş floresans
SEIRA	Yüzeyde zenginleştirilmiş kızılötesi absorban
SERS	Yüzeyde zenginleştirilmiş raman saçılımı
SPR	Yüzey plazmon rezonans
SS	Standart sapma
TAS	Tayin alt sınırı
TCNE	Tetrasiyanoetilen
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TOB	Tobramisin
UV	Ultraviyole
UV-GB	Ultraviyole-görünür bölge
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
YS	Yakalama sınırı

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Gentamisin	3
Şekil 1.2. Tobramisin	5
Şekil 1.3. Amikasin	7
Şekil 1.4. Lycurgus'un kadehi ve 1364 yılında inşa edilen St. Vitus katedralinden bir mozaik cam örneği	9
Şekil 1.5. Aşağıdan-yukarıya nanoparçacık sentezinin şematik gösterimi	12
Şekil 1.6. Nanoparçacıkların analitik işlemlerde kullanımı	123
Şekil 1.7. Metal nanoparçacıkların yüzey plazmonlarını gösteren örnek çizim	15
Şekil 1.8. Altın nanoparçacık için (50 nm) saçılım, absorpsiyon ve toplam spektrum	16
Şekil 2.1. Lipoik asit	44
Şekil 2.2. Öropyum nanoparçacık üzerindeki lipoik asitin EDC/NHS reaktifleri ile aktifleştirilmesi ve ardından tobramisin ile reaksiyonunun şematik gösterimi	46
Şekil 3.1. Amikasinin IR spektrumu	56
Şekil 3.2. Gentamisinin IR spektrumu	56
Şekil 3.3. Tobramisinin IR spektrumu	57
Şekil 3.4. Gümüş nanoparçacıklar	58
Şekil 3.5. Gümüş nanoparçacıkların 200—800 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumu	59
Şekil 3.6.a. Gümüş nanoparçacıkların TEM mikrografisi	60
Şekil 3.6.b. Gümüş nanoparçacıkların TEM mikrografisi	60
Şekil 3.7. Gentamisin eklenmiş gümüş nanoparçacıkların TEM mikrografisi	61
Şekil 3.8. Tobramisin eklenmiş gümüş nanoparçacıkların TEM mikrografisi	61
Şekil 3.9. Amikasin eklenmiş gümüş nanoparçacıkların TEM mikrografisi	62
Şekil 3.10. Artan konsantrasyonlarda (0 – 2 µg/mL) tobramisin eklenmiş gümüş nanoparçacıklar.	63
Şekil 3.11. Artan konsantrasyonlarda (0 – 2 µg/mL) amikasin eklenmiş gümüş nanoparçacıklar.	63
Şekil 3.12. Artan konsantrasyonlarda (0 – 2 µg/mL) gentamisin eklenmiş gümüş nanoparçacıklar.	63
Şekil 3.13. Amikasin eklenmiş gümüş nanoparçacıkların 200-800 nm arasındaki absorpsiyon spektrumları [a)0 ng/mL, b)60 ng/mL, c)65 ng/mL, d)70 ng/mL, e)75 ng/mL, f) 80 ng/mL, g) 85 ng/mL, h) 90 ng/mL, i) 95 ng/mL, j)100 ng/mL]	64
Şekil 3.14. Amikasin (90 ng/mL) için pH'a karşı ΔA grafiği	65
Şekil 3.15. Gentamisin (70 ng/mL) için pH'a karşı ΔA grafiği	66
Şekil 3.16. Tobramisin (80 ng/mL) için pH'a karşı ΔA grafiği	66
Şekil 3.17. Amikasin (80 ng/mL) için NaCl konsantrasyonuna karşı ΔA (394 nm'de)'nin değişim grafiği	67
Şekil 3.18. Tobramisin (50 ng/mL) için NaCl konsantrasyonuna karşı ΔA (394 nm'de)'nin değişim grafiği	68
Şekil 3.19. Gentamisin (50 ng/mL) için NaCl konsantrasyonuna karşı ΔA (394 nm'de)'nin değişim grafiği	68

Şekil 3.20. Tobramisin (60 ng/mL) eklenmiş gümüş nanoparçacıkların 0-80 dakika aralığında alınan spektrumları	69
Şekil 3.21. Gentamisin (30 ng/mL) eklenmiş gümüş nanoparçacıkların 0-80 dakika aralığında alınan spektrumları	70
Şekil 3.22. Amikasin (70 ng/mL) eklenmiş gümüş nanoparçacıkların 0-70 dakika aralığında alınan spektrumları	70
Şekil 3.23. Tobramisin eklenmiş gümüş nanoparçacık çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları [a)0 ng/mL b)22,50 ng/mL c)26,25 ng/mL d)30,00 ng/mL e)33,75 ng/mL f)37,50 ng/mL g)45,00 ng/mL h)52,50 ng/mL i)60,00 ng/mL]	72
Şekil 3.24. Validasyon çalışmalarında hazırlanan gümüş nanoparçacık gentamisin [a)0 ng/mL, b)30 ng/mL, c)40 ng/mL, d)50 ng/mL] çözeltilerinin spektrumları	78
Şekil 3.25. Gentamisin içeren süt numunelerinin gümüş nanoparçacıklara eklendikten sonraki spektrumları [a)0 ng/mL, b)30 ng/mL, c)40 ng/mL, d)50 ng/mL]	83
Şekil 3.26. Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların emisyon spektrumu	89
Şekil 3.27. Öropyum nanoparçacıkların tobramisin a) eklenmemiş ve b) eklenmiş haldeki spektrumları	90
Şekil 3.28. Öropyum nanoparçacıkların a)kör çözelti b) amikasin sülfat eklenmiş c)gentamisin sülfat eklenmiş haldeki spektrumları	91
Şekil 3.29. NHS/EDC aktive edilmiş lipoik asitle modifiye öropyum nanoparçacıkların a)kör çözelti b) amikasin eklenmiş c)gentamisin eklenmiş haldeki spektrumları	92
Şekil 3.30. Amikasin konsantrasyonuna karşı F_0/F grafiği (Stern-Volmer eğrileri)	93
Şekil 3.31. Gentamisin konsantrasyonuna karşı F_0/F grafiği(Stern-Volmer eğrileri)	93
Şekil 3.32. Tobramisin konsantrasyonuna karşı F_0/F grafiği(Stern-Volmer eğrileri)	94
Şekil 3.33. Sentezlenen altın nanoparçacıklar	95
Şekil 3.34. Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların UV spektrumu	96
Şekil 3.35. Altın nanoparçacıkların UV-GB spektrumları	97
Şekil 3.36.a. Öropyum nanoparçacıkların Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü	98
Şekil 3.36.b. Öropyum nanoparçacıkların Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü	99
Şekil 3.37.a. Küre ve çubukların karışımı halinde sentezlenen altın nanoparçacıkların Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü	100
Şekil 3.37.b. Küre ve çubukların karışımı halinde sentezlenen altın nanoparçacıkların Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü	101
Şekil 3.37.c. Küre ve çubukların karışımı halinde sentezlenen altın nanoparçacıkların Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü	102
Şekil 3.37.d. Küre ve çubukların karışımı halinde sentezlenen altın nanoparçacıkların Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü	103
Şekil 3.38. Lipoik asit modifiye öropyum nanoparçacıkların tobramisin (30 $\mu\text{g/mL}$) ile etkileşimi sonucu floresans azalmasının pH'a karşı değişimi ($\lambda_{\text{ex}}=280\text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}}=315\text{ nm}$).	104

- Şekil 3.39.** Lipoik asit modifiye öropyum nanoparçacıkların tobramisin (10 µg/mL) ile etkileşimi sonucu floresans azalmasının iyonik şiddete karşı değişimi (pH 5,0 λ_{ex} =280 nm λ_{em} =315 nm). 105
- Şekil 3.40.** Tobramisin için altın nanoparçacık boyutuna ve şekline bağlı lipoik asit kaplı öropyum nanoparçacıkların floresansındaki artış 106
- Şekil 3.41.** Tobramisin için altın nanoparçacıkların (37 nm küre ve 17-200 nm çubuk karışımı) miktarına karşı floresans sönümlenmesinin grafiği (λ_{ex} =280 nm λ_{em} =315 nm). 107
- Şekil 3.42.** Öropyum nanoparçacıklarının floresansının altın nanoparçacıklar kullanılarak zenginleştirilmesini gösteren emisyon spektrumları. a) altın nanoparçacık eklenmiş b)altın nanoparçacık eklenmemiş haldeki spektrumlar 108
- Şekil 3.43.** Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların amikasin (30 µg/mL) ile etkileşimi sonucu floresans şiddeti azalmasının pH'a karşı değişimi (λ_{ex} =280 nm λ_{em} =315 nm). 109
- Şekil 3.44.** Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların gentamisin (30 µg/mL) ile etkileşimi sonucu floresans şiddeti azalmasının pH'a karşı değişimi (λ_{ex} =280 nm λ_{em} =315 nm). 109
- Şekil 3.45.** Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların amikasin (12,5 µg/mL) ile etkileşimi sonucu floresans sönümlenmesinin iyonik şiddete karşı değişimi (pH 5,0; λ_{ex} =280 nm λ_{em} =315 nm) 110
- Şekil 3.46.** Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların gentamisin (12,5 µg/mL) ile etkileşimi sonucu floresans şiddeti azalmasının iyonik şiddete karşı değişimi (pH 5,0; λ_{ex} =280 nm λ_{em} =315 nm). 111
- Şekil 3.47.** Amikasin için altın nanoparçacık boyutuna ve şekline göre lipoik asit kaplı öropyum nanoparçacıkların floresansındaki artış 112
- Şekil 3.48.** Gentamisin için altın nanoparçacık boyutuna ve şekline göre lipoik asit kaplı öropyum nanoparçacıkların floresansındaki artış 112
- Şekil 3.49.** Amikasin için altın nanoparçacıkların (37 nm küre ve 17-200 nm çubuk karışımı) miktarına karşı floresans sönümlenmesinin grafiği (λ_{ex} =280 nm λ_{em} =315 nm). 113
- Şekil 3.50.** Gentamisin için altın nanoparçacıkların (37 nm küre ve 17-200 nm çubuk karışımı) miktarına karşı floresans sönümlenmesinin grafiği (λ_{ex} =280 nm λ_{em} =315 nm). 114
- Şekil 3.51.** Artan tobramisin konsantrasyonuna [a)0 µg/mL, b)0,20 µg/mL, c)0,75 µg/mL, d)2,0 µg/mL, e)4,0 µg/mL, f)6,0 µg/mL, g)10 µg/mL, h)15 µg/mL, i)17,5 µg/mL, j)20 µg/mL, k)25 µg/mL] karşı öropyum nanoparçacıkların floresans sönümlenmesini gösteren spektrumlar 117
- Şekil 3.52.** Tobramisinin validasyon çözeltilerinin [a)0 µg/mL, b)10 µg/mL, c)15 µg/mL, d)20 µg/mL] analizlerinden elde edilen emisyon spektrumları 117
- Şekil 3.53.** Artan gentamisin konsantrasyonuna [a)0 µg/mL, b)0,40 µg/mL, c)2,5 µg/mL, d)5,0 µg/mL, e)7,5 µg/mL, f)10 µg/mL, g)12,5 µg/mL, h)15 µg/mL, i)20 µg/mL, j)24 µg/mL, k)26 µg/mL] karşı öropyum nanoparçacıkların floresans sönümlenmesini gösteren spektrumlar 123
- Şekil 3.54.** Gentamisinin validasyon çözeltilerinin [a)0 µg/mL, b)10 µg/mL, c)15 µg/mL, d)20 µg/mL] analizlerinden elde edilen emisyon spektrumları 124

- Şekil 3.55.** Amikasin konsantrasyonuna [a)0 µg/mL, b)0,75 µg/mL, c)5,0 µg/mL, d)7,5 µg/mL, e)10 µg/mL, f)12,5 µg/mL, g)15 µg/mL, h)20 µg/mL, i)22,5 µg/mL, j)25 µg/mL, k)27,5 µg/mL] karşı öropyum nanoparçacıkların floresans sönümlenmesini gösteren spektrumlar 129
- Şekil 3.56.** Amikasinin validasyon çözeltilerinin analizlerinden elde edilen emisyon spektrumları [a)0 µg/mL, b)10 µg/mL, c)15 µg/mL, d)20 µg/mL] 130
- Şekil 4.1.** Amingolikozidlerin spektrofotometrik analizlerinin şematik gösterimi 1457
- Şekil 4.2.** Amingolikozidlerin spektroflorimetrik tayininin şematik gösterimi 145

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1.	Tobramisinin spektrofotometrik analizinden elde edilen regresyon verileri	71
Çizelge 3.2.	Tobramisinin standart çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları	73
Çizelge 3.3.	Tobramisin için spektrofotometrik dayanıklılık testi sonuçları	74
Çizelge 3.4.	TOBRASED® göz merhemi (% 0,3 TOB içermektedir; Parti no: 1041039B)'ne standart ilavesinden sonra TOB için yapılan deneylerin sonuçları	75
Çizelge 3.5.	TOBRASED® göz merhemi (% 0,3 TOB içermektedir; Parti no: 1041039B)'ne yöntem uygulandığında elde edilen sonuçlar	76
Çizelge 3.6.	TOB için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları	77
Çizelge 3.7.	Gentamisinin spektrofotometrik analizinden elde edilen regresyon verileri	78
Çizelge 3.8.	Gentamisinin standart çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları	79
Çizelge 3.9.	Gentamisin dayanıklılık testi sonuçları	80
Çizelge 3.10.	BELOGENT® merheme (1 mg GEN / 1 g merhem; Parti no: 25063101) standart ilavesinden sonra GEN deneylerinin sonuçları	81
Çizelge 3.11.	BELOGENT® merhem (1 mg GEN / 1 g merhem; Parti no: 25063101) miktar tayini sonuçları	82
Çizelge 3.12.	Gentamisin için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları	83
Çizelge 3.13.	Amikasinin spektrofotometrik analizinden elde edilen regresyon verileri	84
Çizelge 3.14.	Amikasinin standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası analiz sonuçları	85
Çizelge 3.15.	Amikasin dayanıklılık testi sonuçları	85
Çizelge 3.16.	DRAMIGEL® (%5 AMİ içermektedir; Parti no:C0681) jele standart ilavesinden sonra AMİ için yapılan deneylerin sonuçları	86
Çizelge 3.17.	DRAMIGEL® (%5 AMİ içermektedir; Parti no:C0681) miktar tayini sonuçları	87
Çizelge 3.18.	Amikasin için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları	88
Çizelge 3.19.	Farklı sıcaklıklardaki Stern-Volmer sabitleri	95
Çizelge 3.20.	Spektroflorimetrik metodun bazı maddelere karşı tolerans limitleri	115
Çizelge 3.21.	Tobramisinin spektroflorimetrik analizinden elde edilen regresyon verileri	116
Çizelge 3.22.	Tobramisinin standart çözeltileri için spektroflorimetrik yöntemden elde edilen gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları	118

Çizelge 3.23.	Tobramisin için pH'a bağlı olarak spektrofotometrik dayanıklılık testi sonuçları	118
Çizelge 3.24.	TOBRASED® göz merhemi (% 0,3 TOB içermektedir; Parti no: 1041039B)'ne standart ilavesinden sonra TOB için yapılan spektrofotometrik deneylerin sonuçları	120
Çizelge 3.25.	TOBRASED® göz merhemi (% 0,3 TOB içermektedir; Parti no: 1041039B)'ne spektrofotometrik yöntem uygulandığında elde edilen sonuçlar	121
Çizelge 3.26.	Tobramisin için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları	122
Çizelge 3.27.	Gentamisin spektrofotometrik analizinden elde edilen regresyon verileri	123
Çizelge 3.28.	Gentamisin standart çözeltileri için spektrofotometrik yöntemden elde edilen gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları	124
Çizelge 3.29.	Gentamisin için pH'a bağlı olarak spektrofotometrik dayanıklılık testi sonuçları	125
Çizelge 3.30.	BELOGENT® merheme (1mg GEN/g ; Parti no: 25063101) standart ilavesinden sonra GEN için yapılan spektrofotometrik deneylerin sonuçları	126
Çizelge 3.31.	BELOGENT® merhem'in (1 mg GEN / 1 g merhem) miktar tayini sonuçları	127
Çizelge 3.32.	Gentamisin için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları	128
Çizelge 3.33.	Amikasin spektrofotometrik analizinden elde edilen regresyon verileri	129
Çizelge 3.34.	Amikasin standart çözeltileri için spektrofotometrik yöntemden elde edilen gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları	130
Çizelge 3.35.	Amikasin için pH'a bağlı olarak spektrofotometrik dayanıklılık testi sonuçları	131
Çizelge 3.36.	DRAMIGEL® jelle (%5 AMİ; Parti No: C0681) standart ilavesinden sonra AMİ için yapılan spektrofotometrik deneylerin sonuçları	132
Çizelge 3.37.	DRAMIGEL® (%5 AMİ; Parti No: C0681) miktar tayini sonuçları	133
Çizelge 3.38.	Amikasin için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları	134
Çizelge 4.1.	Gümüş nanoparçacıkların partikül büyüklüğü ve spektral özellikleri	136
Çizelge 4.2.	Geliştirilen yöntemlerin duyarlılık açısından karşılaştırılması	151
Çizelge 4.3.	Yöntemlerin yakalama sınırları ve çalışma aralıkları açısından karşılaştırılması	153
Çizelge 4.4.	t ve F testi sonuçları	155

1. GİRİŞ

1.1. Antibiyotikler

Antibiyotik kelimesi Yunancadan gelmekte ve karşı anlamına gelen “anti” ve yaşam (bakteri bir yaşam formudur) anlamına gelen “bios” kelimelerinden oluşmaktadır. Antibiyotikler mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonları tedavi etmede kullanılan ilaçlardır. Mikroorganizmaların hepsi zararlı değildir, hatta bir kısmı insanlar için yararlı fonksiyonlara sahiptir. Ancak bazı bakteriler insana zarar verebilir yani patojendirler. Patojenler, çoğalmadan ve semptomlara neden olmadan önce bağışıklık sistemindeki akyuvarlar tarafından yok edilirler. Ancak sayıları çok fazla olduğunda ve bağışıklık sistemi tarafından yok edilmekte zorlanıldığında insan vücudu yardıma, yani antibiyotiklere ihtiyaç duyar (Nordqvist, 2009).

1929 yılında Sir Alexander Fleming bakterilerle yaptığı çalışma sırasında küf mantarlarının bakterileri öldürdüğünü ve bunun nedeninin küf mantarlarının ürettiği penisilin olduğunu bulunmuştur. Penisilin, tarihte bulunan ilk antibiyotiktir ve o tarihten bu yana birçok yeni antibiyotik keşfedilmiştir. Bu keşif aynı zamanda insanlık için antibiyotik-bakteri savaşının da başlangıcı olmuştur, çünkü bakteriler zamanla antibiyotiklere karşı savunma mekanizmalarını güçlendirmekte ve antibiyotik direnci geliştirmektedirler. Günümüzde antibiyotiklerin gereğinden fazla kullanılmaması ve bakterilerin antibiyotik direnci geliştirmelerinin önüne geçilmesi için çeşitli farkındalık çalışmaları yürütülmektedir. Örneğin 18 Kasım günü 2011 yılında Avrupa antibiyotik farkındalık günü olarak ilan edilmiştir. Gereksiz antibiyotik kullanımı ve bakteri direnci toplumsal bir sorun olarak görülmektedir.

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler. Bakterileri öldüren antibiyotik sınıfına bakterisit etkili antibiyotik, bakterilerin gelişimini durduran antibiyotik sınıfına ise bakteriyostatik etkili antibiyotik denir (Buynak, 2012). En çok hedef alınan bakteriyel fonksiyon büyümedir (Calderon ve Sabundayo, 2007). Bakteri hücre duvarını hedef alanlar (penisilinler ve sefalosporinler), hücre membranını hedef

alanlar (polimiksinler) ve temel bakteri enzimleriyle girişim yapanlar (kinolonlar ve sülfonamidler) bakterisit sınıfındadırlar. Protein sentezini hedef alanlar (aminoglikozidler, makrolidler ve tetrasiklinler) ise bakteriyostatik sınıfındadırlar (Finberg ve ark., 2007).

1.1.1. Aminoglikozidler

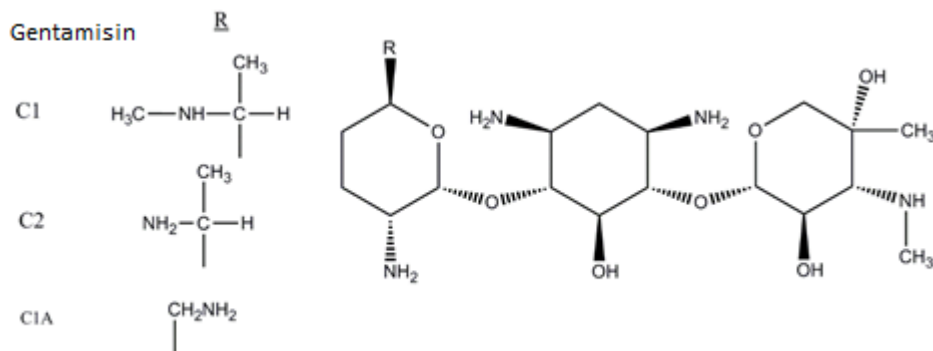
Aminoglikozidler *streptomyces* ve *micromonospora* türü mikroorganizmalardan elde edilen, iki veya daha fazla amino şekerinin glikosidik bağlarla bir aminosiklitol bileşenine bağlanmasından oluşan ve çok sayıda bileşen içeren büyük bir antibiyotik grubudur. Bu gruptaki antibiyotikler şunlardır: kanamisin, neomisin, apramisin, amikasin, arbekasin, bekanamisin, dibekasin, tobramisin, streptomisin, spektinomisin, higromisin B, paromomsin, gentamisin, netilmisin, sisomisin, izepamisin, verdamisin ve astromisin. (McGlinchey, 2008)

Büyük ve eski bir antibiyotik sınıfı olan aminoglikozidler, 1943 yılında ilk sentezlenen aminoglikozid olan streptomisinin bulunuşundan beri insanlar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. Aminoglikozidlerin bakır, nikel, kobalt ve demir gibi metallere şelatlar oluşturduğu bilinmektedir (Foye ve ark. 1955; Priuska ve ark. 1998). Priuska ve ark.ları (1998) gentamisinin demir ile kompleksinin böbrek ve iç kulakta toksik yan etkiler gösterdiğini kanıtlamışlardır. Bu gruptaki anitibiyotikler nefrotoksik ve ototoksik özellikler göstermektedir. Aminoglikozidler, veterinerlikte ve hayvan çiftliklerinde özellikle meme iltihabı gibi bakteriyel infeksiyonların tedavisinde veya koruma amaçlı olarak veteriner ilaçlarında kullanılırlar. Bazen yüksek oranlarda gıda takviyesi olarak ya da içme suyuna katılarak hastalıkların önlenmesi veya hayvanların taşınması sırasında su kaybı yaşanmaması için kullanılırlar (Fedeniuk ve Shand, 1998). Bakterilerin antibiyotik direnci geliştirmesinde insan kullanımının yanında hayvancılık amaçlı kullanım da dikkate alınmaktadır. Bu yüzden hayvansal kaynaklı gıdalarda düşük miktardaki antibiyotiklerin tayini çok önemlidir (McGlinchey, 2008).

Türkiye’de küçük çaplı üretimin ve dolayısıyla kayıt ve kontrol dışı gıda işletmelerinin fazla olması gıda güvenliğini tehdit etmektedir. Özellikle son yıllarda Avrupa Birliği’ne uyum çabalarıyla birlikte yeni mevzuatlar hazırlanmaktadır. Bu uygulamalarla birlikte gıda güvenliğini izleyen laboratuvarların da bu mevzuatlara uygun çalışması gerekmektedir. Bu alanda yapılan analizlerin güvenilir, hassas, hızlı ve maliyetinin uygun olması, gıda güvenliğini ve kalitesini sağlamada çok önemlidir (Kara ve Kolaylı, 2010). Bu hedefleri sağlayacak alternatif analiz yöntemleri geliştirmek de analitik kimya açısından önem taşımaktadır.

Bu gruptaki antibiyotiklerin analizleri zordur, çünkü hem kromofor grupları içermezler hem de ilaç analizlerinde en çok kullanılan metod olan ters faz kromatografi kolonlarında alıkonmaları zayıftır. Bu sorunlardan dolayı aminoglikozidlerle ilgili çalışmaların büyük çoğunluğu türevlendirme işlemi içerir. Türevlendirme işlemi dedeksiyon için olabildiği gibi, kütle spektrometri dedektörü kullanıldığında alıkonmayı geliştirmek için de kullanılmıştır. (Plozza ve ark. 2011)

1.1.1.1.Gentamisin



Şekil 1.1. Gentamisin

Gentamisin (GEN), beyazdan kahverengi-sarıya değişen renkte ve toz halindedir. Suda çözüürken alkolde çözümez (European Pharmacopoeia 5, 2005). Ana bileşenleri gentamisin C1, C1A ve C2 formlarıdır. Molekül ağırlığı içerdiği formların oranına göre değişir:

Gentamisin C1: 477,6 g/mol

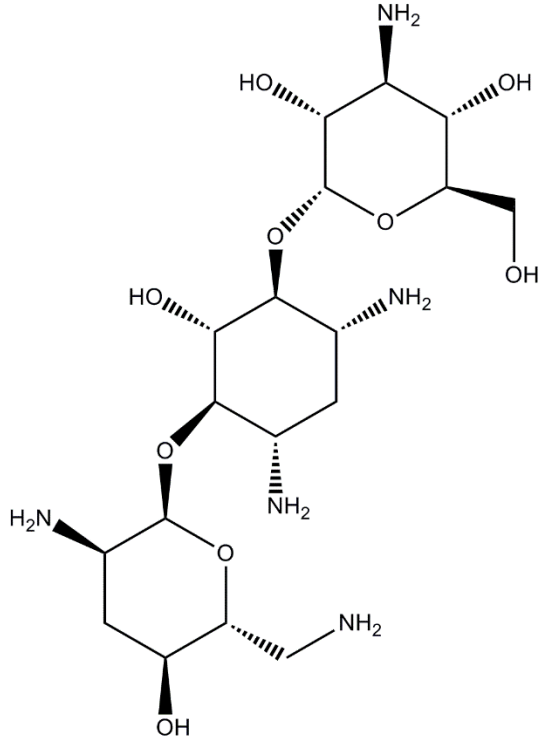
Gentamisin C1A: 449,5 g/mol

Gentamisin C2: 463,6 g/mol

GEN, *Micromonospora purpurea* kùltürlerinden elde edilen aminoglikozid yapılı bir antibiyotiktir. 1964’de keşfedilen gentamisin 1971 yılında kullanıma sunulmuştur ve günümüzde hala yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunun nedeni birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilmiş bakterilerin GEN’e karşı hala duyarlı olmalarındandır. GEN solunum veya idrar yolları enfeksiyonlarında ve özellikle de sepsiste temel ilaç olarak kullanılmaktadır. Diğer aminoglikozidler gibi gram negatif bakteriler üzerinde etkili olsa da, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* ve *Legionella pneumophila* üzerinde etkisizdir. Gram-negatifler dışında, bazı antibiyotiklerle kombine halde *Staphylococcus aureus* ve belirli bazı streptokok türlerine karşı da etkilidir. Penisilin ile kombine halde endokardit tedavisinde kullanılır. GEN, klinikte yukarıda sayılanların dışında üriner kanal enfeksiyonları, piyelonefrit, jinekolojik enfeksiyonlar, peritonit, pnömoni, bakteriyemi, kistik fibrozis ile iliőkili olanlar da dahil olmak üzere solunum yolu enfeksiyonları, osteomyelit, diyabetik ayak ve diğer yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (Üstüneş, 2012).

GEN’in klinik kullanımında karşılaşılan en büyük sorun ototoksik ve nefrotoksik olmasıdır (Moulds ve Jeyasingham, 2010).

1.1.1.2. Tobramisin



Şekil 1.2. Tobramisin

M.A: 467,51 g/mol

6-O-(3-Amino-3-deoksi-alfa-D-glukopiranozil)-2-deoksi-4-O-(2,6-diamino-2,3,6-trideoksi-alfa-D-ribo-hegzopiranozil)streptamin

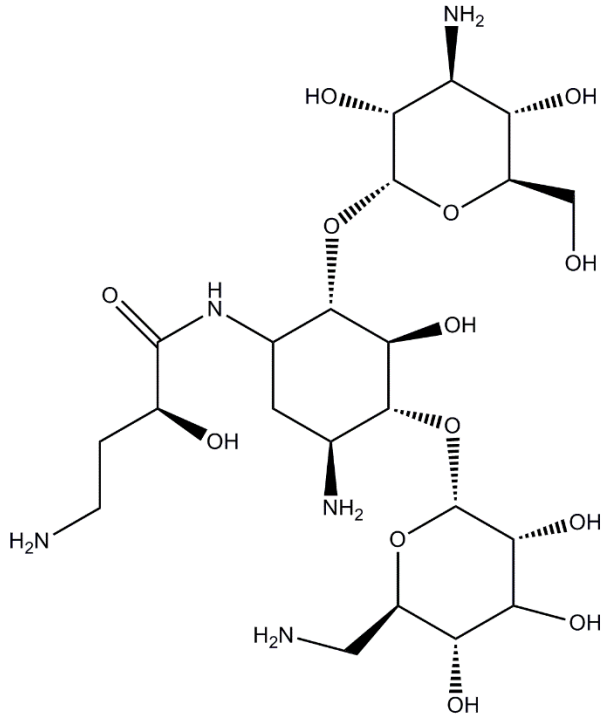
Tobramisin (TOB), beyaz veya beyaza yakın renkte higroskopik bir tozudur. Suda serbestçe çözünür; alkolde çok hafif çözünür; kloroform ve eterde pratik olarak çözünmez (Üstüneş, 2012).

TOB, *streptomyces tenebrarius* kültürlerinden elde edilen aminoglikozid türevi bir antibiyotiktir. En yüksek aktivitesini aerobik gram-negatif basillere karşı gösterir.

GEN’de olduğu gibi diğer antibiyotiklerle kombine olarak *Staphylococcus aureus* ve belirli bazı *Streptococcus* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde ve penisilin ile birlikte endokardit tedavisinde kullanılır. TOB belirli *mycobacterium* türlerine karşı da etkili olmasına karşın, anaerobik bakterilere karşı etkili değildir. Bazı araştırmalar TOB’in GEN’e göre daha az nefrotoksik olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte, her iki ilacın nefrotoksisite insidansları arasında net bir farklılık saptanamamıştır. TOB, enjektabl olarak ve oftalmik preparatları şeklinde göze topikal olarak uygulanır. Duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu gözün ve komşu dokuların dış kaynaklı enfeksiyonlarının tedavisinde etkilidir. Son yıllarda kistik fibrozisli hastalarda görülen *pseudomonas* enfeksiyonlarına karşı aerosol formunda da kullanılmaktadır (Üstüneş, 2012).

TOB, bakteriyel 30S ve 50S ribozomundaki bir boşluğa bağlanarak 70S kompleksinin oluşumunu önleyerek etki eder. Sonuç olarak; mRNA’nın proteine translasyonu gerçekleşmez ve hücre ölümü ile sonuçlanır.

1.1.1.3.Amikasin



Şekil 1.3. Amikasin

M.A: 585,60 g/mol

D-Streptamine, *O*-3-amino-3-deoxy- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*-[6-amino-6-deoxy- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-*N*¹-[(2*S*)-4-amino-2-hydroxy-1-oxobutyl]-2-deoxy-

Amikasin (AMİ), kanamisin A'dan elde edilir. En çok aerobik gram-negatif basilere karşı etkilidir. GEN ve TOB gibi AMİ de diğer antibiyotiklerle kombine olarak *Staphylococcus aureus* ve belirli streptokok türlerine karşı kullanılır. Mycobacterium türlerine karşı da etkili, anaerobik bakterilere karşı etkisizdir. AMİ'in yararlı olduğu klinik durumlar şunlardır: Piyelonefrit gibi üriner kanal enfeksiyonları, jinekolojik enfeksiyonlar, peritonit, endokardit, pnömoni, bakteremi ve sepsis, kistik

fibrozis de dahil solunum yolu enfeksiyonları, osteomyelit, diyabetik ayak, diğer yumuşak doku enfeksiyonları ve bazı mikobakteriyel enfeksiyonlar (Üstüneş, 2012).

1.2. Nanoteknoloji ve Nanomateryaller

1.2.1. Tarihçe

Nanomateryaller en basit ifadeyle nanoskaladaki maddeler, nanoteknoloji ise nanoskaladaki teknoloji olarak tanımlanabilir. Nanomateryaller, aşağı yukarı 1-100 nm aralığında boyutlara sahip maddelerdir. Nanoteknoloji maddelerin ne olduğundan çok ne kadar küçük olduklarıyla ilgilidir. Nanoteknoloji çağı insanlık tarihindeki diğer bütün materyal çağlarından çok farklıdır (Colvin ve Mittleman, 2013). Tarih; taş devri, bakır çağı, bronz çağı, demir çağı, enformasyon çağı diye daha çok çağa damgasını vuran materyallerle adlandırılmaktaydı. Ancak çağımız materyalin ne olduğundan çok ne kadar küçük olduğuyula ilgili olduğu için diğer çağlardan farklıdır.

Nanoteknoloji ve nanobilim ilk defa fizikçi Richard Feynman tarafından 1959 yılında Amerikan Fizik Topluluğu'nun (American Physics Society) bir toplantısında ortaya atılmıştır. Feynman konuşmasında tekil olarak atomları ve molekülleri kontrol ve manipüle edebilecek işlemlerden bahsetmiştir. Nanobilimin babası sayılan Feynman bir konuşmasında “neden 24 ciltlik Brittanica ansiklopedisini bir raptiyenin ucuna yazamayalım” demiştir. (United States National Nanotechnology Initiative, 2014)

Tarihte insanlar nanomateryaller üretseler de bunun farkında değillerdi. Örneğin; IV. yüzyılda yaşayan Lycurgus'un cam kadehinde 50-100 nm boyutunda altın nanoparçacıklar olduğu bilinmektedir (Şekil 1.4). Bu kadehin ışığa göre rengi değişmektedir. Gün ışığında yeşil renkte olan kadeh, içine bir ışık kaynağı konulduğunda kırmızı olarak görülmektedir (Leonhardt, 2007).



Şekil 1.4. Lycurgus'un kadehi (solda) ve 1364 yılında inşa edilen St. Vitus katedralinden bir mozaik cam örneği (sağda)

1.2.2. Nanoteknolojinin Uygulamaları

Nanoteknoloji uygulamalarına günlük hayatta uzun zamandır rastlanmaktadır. Nanomateryallerin birçok özellik kattığı malzemeler çok değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Karbon nanotüplerden yapılan hafif ve dayanıklı bisikletlerden, nanoskopik TiO_2/ZnO içeren ve geçirgenlik sağlayan güneş kremlerine; antimikrobiyal etkisi için altın nanoparçacık içeren gıda takviyelerinden, lekeler ve kırışıklara dayanıklılık sağlaması için nanoselüloz katılan giysilere kadar günlük hayatın birçok alanında nanomateryallere rastlamak mümkündür (Nanotechnology Consumer Products Inventory, 2014). Nanoteknoloji kişiye özel ilaçlar, kendi kendini temizleyen giysiler, daha hafif araçlar, daha az kirleten fabrikalar, daha hızlı bilgisayarlar ve yeni kanser tedavileri gibi birçok şeyi mümkün kılmakta ve hızla yeni uygulama alanları bulmaktadır.

1.2.3. Nanoparçacıklar

Bir saç telinin veya bir kağıt parçasının 80.000-100.000 nm kalınlığında olduğu düşünülürse, nano skalasının ne kadar küçük olduğu tahmin edilebilir (United States National Nanotechnology Initiative, 2014). Peki, skalanın bu denli küçük olması neden önemlidir ve bu skalada materyallerde değişen şey nedir? Bu sorunun cevabı

basitçe nanomateryallerin yüzey alanlarının aynı hacimdeki ve/veya kütledeki materyallere göre çok daha büyük olmasında yatar. Kimyasal işlemler yüzeyde gerçekleşir ve yüzey alanının büyümesi materyallerin özelliklerini büyük oranda değiştirir (Colvin ve Mittleman, 2013). Maddelerin boyutu küçüldükçe sadece yüzey alanı artmaz aynı zamanda aynı hacime giren parçacık sayısı da artar. Yüzey alanındaki ve parçacık sayısındaki bu artışlar aşağı yukarı hesaplanabilir. Örneğin küre biçimindeki bir maddenin hacmi $4/3\pi r^3$ formülünden hesaplandığına göre, bu maddenin çapı 10 kat düşürüldüğünde aynı miktardaki madde için aşağı yukarı 10.000 kat daha fazla sayıda maddeye sahip olunacaktır. Yüzey alanı ise boyut ile birebir oranında ters orantılı olur. Maddenin çapı 10 kat düşürülürse, yüzey alanı 10 kat artacaktır. Örneğin; 1 cm kenarlı bir küpte yüzeydeki atom yüzdesi % 10^{-5} iken, 10 nm kenarlıda % 10, 1 nm kenarlıda bütün atomlar yüzeydedir. Bu bilgi; büyüklükte yapılacak birkaç nanometrelik değişimlerin, nanoparçacıklarda büyük fiziksel ve kimyasal değişimleri nasıl tetiklediğini açıklayabilir (Link ve El Sayed, 2000).

Nanomateryaller boyutlarına göre şöyle sınıflandırılırlar: 0D (nanoparçacıklar ve kuantum dotlar), 1D (nanotüpler, fiberler ve rodler), 2D (ince filmler, yüzeyel quantum kuyuları) ve 3D (nanokompozitler, kütleli nanokristal filmler) (Haick, 2014).

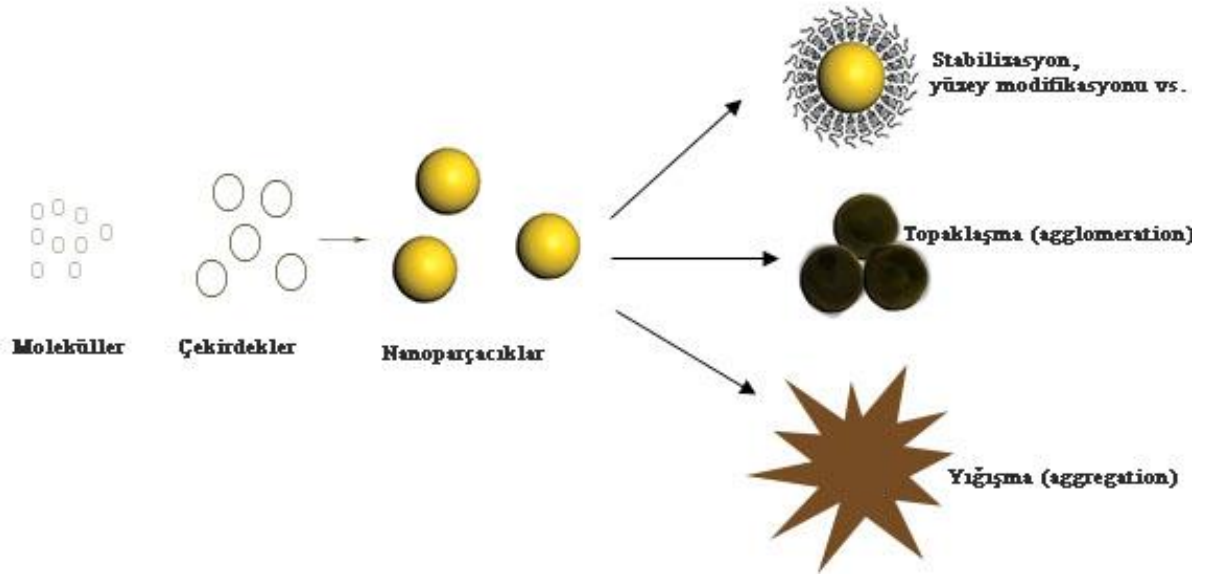
Nanoparçacıklar, 0-boyutlu, çapları 1-100 nm aralığında, her bir parçacıkta 10^6 atomdan daha az atom içeren ve kuantum fiziğinin kurallarının geçerli olduğu parçacıklardır (Schmid, 2004).

Nanoparçacıklar değişik metotlarla üretilebilirler ve bu metotlar maddelerin gaz, sıvı veya katı fazları kullanılarak yapılabilir. Bu metotlar arasında, gaz fazı işlemlerinden olan alev pirolizi, yüksek sıcaklık uçurması ve plazma sentezi; mikrodalga ışınlanması; fiziksel ve kimyasal buhar tortulaşması sentezi; çözeltide gerçekleşen kimyasal reaksiyonların kolloid oluşturduğu sıvı veya kolloidal faz metotları ya da boyut küçültme için yapılan mekanik metotlar sayılabilir (Nagajaran, 2008; s.:7).

Nanoparçacık sentezini stratejik olarak aşağıdan-yukarıya (bottom-up) ve yukarıdan-aşağıya (top-down) şeklinde sınıflandırmak da mümkündür. Yukarıdan-aşağıya yönteminde, büyük boyutlardaki ham materyal küçültülerek nanoparçacık elde edilir. Kesme, öğütme, oyma gibi tekniklerle büyük boyutlardaki materyaller istenilen şekil ve boyuttaki nanomateryallere dönüştürülebilir. Bu tekniklerden bazıları odaklanmış iyon demeti, fotolitografi ve elektron ışınları litografisidir. Odaklanmış iyon demeti ile materyallerin oyulması mümkündür. Fotolitografi, UV ışınlarının materyal yüzeyinde, materyalin korunması istenen kısmının UV ışınlarına dirençli bir materyalle maskelendiği, oyulması istenen kısmın ise UV ışığına maruz bırakıldığı bir tekniktir. Elektron ışınları litografisi, yüksek miktarda elektron kullanarak nanomateryallerin üretildiği bir tekniktir.(Haick, 2014)

Aşağıdan-yukarıya sentez yönteminde ise atom ve moleküllerin kendiliğinden biraraya gelmeleri (self-assembly) ile nanoparçacıklar sentezlenebilir. Kendiliğinden biraraya gelme geri döndürülebilir bir işlemdir ve doğada spontane bir şekilde görülebilir. Kendiliğinden biraraya gelmede Van der Waals, kapiler, hidrojen bağları gibi zayıf kuvvetler etkilidir. Aşağıdan-yukarıya tekniği, yukarıdan aşağıya tekniğine göre çok daha fazla kullanılır, çünkü maliyeti çok daha düşük ve daha kolay bir tekniktir. (Haick, 2014)

Aşağıdan-yukarıya nanoparçacık sentezi şu şekilde şematize edilebilir:



Şekil 1.5. Aşağıdan-yukarıya nanoparçacık sentezinin şematik gösterimi

Nanoparçacıklar sentezlendikten sonra çeşitli amaçlarla yüzeyleri modifiye edilir. Bu amaçlar:

1. Çok reaktif olan nanoparçacıkları pasifleştirmek,
2. Kümelenebilmeye meyilli nanoparçacıkları stabilize ederek ortamda dağıntık halde kalmalarını sağlamak,
3. Moleküler tanıma gibi sensör amaçlı olarak fonksiyonel hale getirmek,
4. Nanoparçacıkların oluşmasını desteklemek,

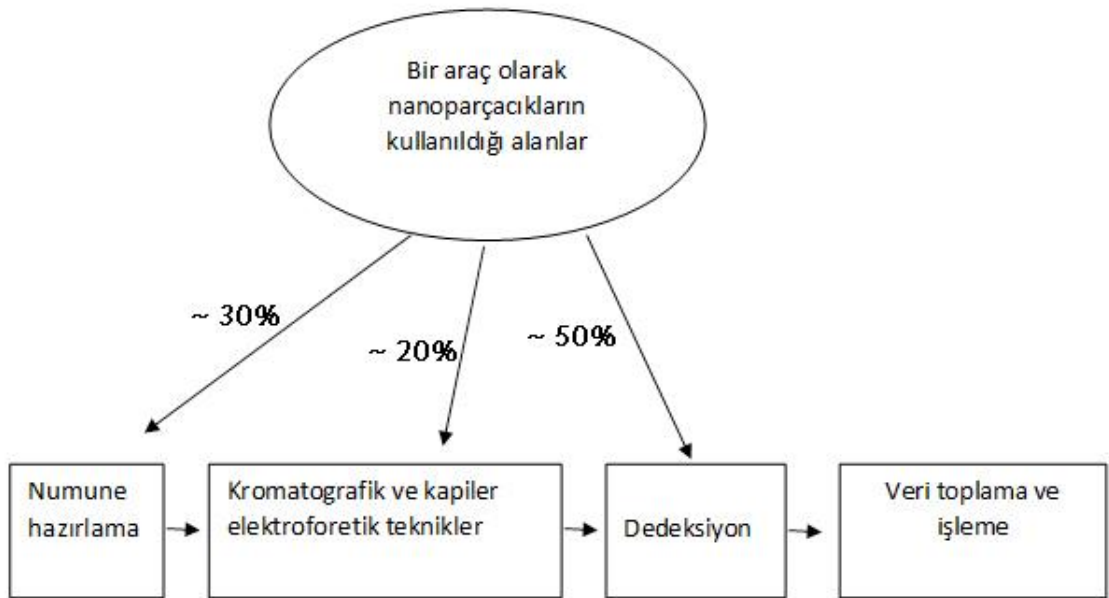
olabilir (Nagajaran, 2008; s.:8).

1.2.3.1.Metal Nanoparçacıklar ve Spektroskopide Kullanımı

Metal nanoparçacıklar, 0 boyutlu, çapı 1-100 nm aralığında, her bir nanoparçacıkta 10^6 atomdan daha az sayıda metal atomu içeren nanoparçacıklar olarak tarif edilmektedir. Metal nanoparçacıklar diğer nanomateryaller arasında optik ve

elektronik özellikleri ve sentezlenmesinin kolaylığının yanında (Feldheim ve Foss, 2002) katalitik ve manyetik özellikleriyle de ilgi çekmektedir. Metal nanoparçacıkların sentezinde genellikle metal tuzlarının, onların etrafında bir tabaka oluşturan ve bir araya gelmelerini engelleyen fonksiyonel moleküllerin varlığında, kimyasal olarak indirgenmesinden faydalanılır (Brust ve ark., 1994). Bu moleküler tabaka, koruma fonksiyonunun yanında parçacıkla ortamın etkileşimini de belirler ve nanoparçacığa sensör özelliği kazandırabilir. Ayrıca değişik çözücülerdeki çözünürlüğünü de kontrol eder. Metal nanomateryaller özgün optik ve elektriksel özelliklerinden dolayı analitik amaçlı olarak geniş uygulama alanları bulmaktadırlar.

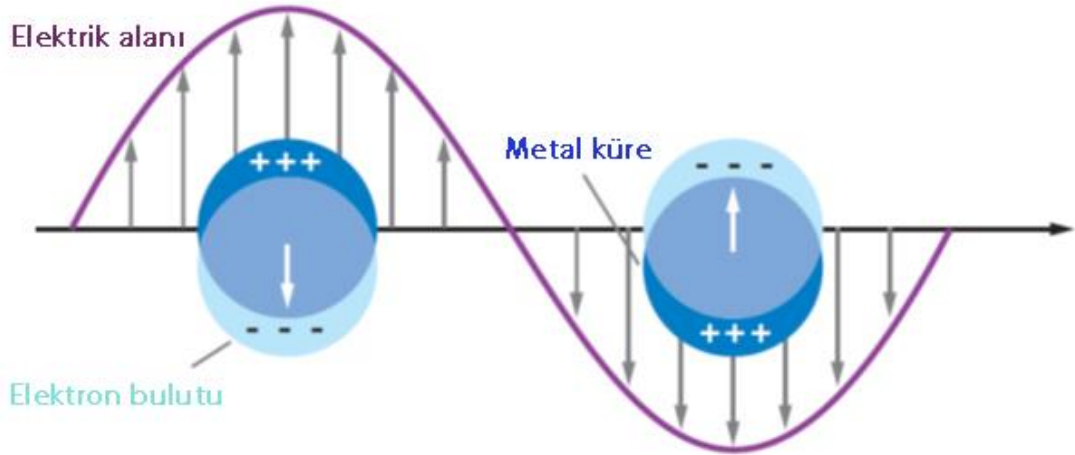
Lucena ve ark.ları (2011) analitik işlemlerin numune hazırlama, kromatografik ve kapiler elektroforetik teknikler, dedeksiyon ve veri işleme gibi bazı aşamalara bölünebileceğini ve nanoparçacıkların bu aşamalarda kullanımının Şekil 1.6'da görüldüğü gibi olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmaların çoğunluğu dedeksiyon kısmında, nanoparçacık temelli elektrot geliştirme ile ilgilidir. Bunun dışında numune hazırlama ile ilgili de çalışmalar bulunmaktadır.



Şekil 1.6. Nanoparçacıkların analitik işlemlerde kullanımını (Lucena ve ark., 2011)

Metal nanoparçacıklar analitik alanda, spektroskopide de uygulama alanı bulmuştur. Metal nanoparçacıkların spektroskopik uygulamaları genellikle yüzey çalışmaları olmakla birlikte, çözelti ortamında da çalışabilmek mümkündür. Yüzey çalışmaları açısından en çok uygulama alanı bulunan teknik Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) tekniğidir. Bunun dışında Yüzeyde Zenginleştirilmiş Floresans (Surface Enhanced Fluorescence, SEF) ve Yüzeyde Zenginleştirilmiş IR Absorbans (Surface Enhanced Infrared Absorbance, SEIRA) tekniklerine de sıklıkla rastlamak mümkündür. Çözelti bazlı çalışmalarda ise UV-GB spektroskopisi, Raman spektroskopisi, floresans spektroskopisi, IR spektroskopisi gibi alanlar sayılabilir. Yüzey çalışmalarının çözelti bazlı çalışmalara göre daha çok olmasının nedeni genellikle yüzey çalışmalarında elde edilen sonuçların çözelti bazlı çalışmalara göre daha hassas olması ve daha küçük yakalama sınırlarına inilebilmesidir. Buna karşılık çözelti bazlı çalışmalar ise hazırlanması kolay ve tekrar edilebilirliği daha yüksek sonuçlar vermektedir.

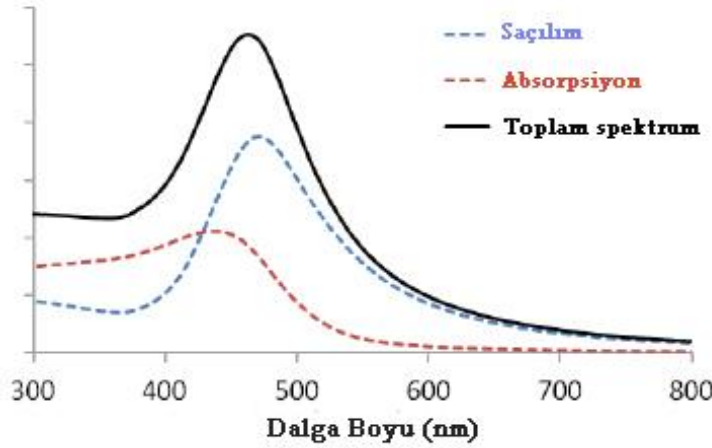
Metal nanoparçacıkların ışık ile olan ilişkisini açıklamak için Gustav Mie'nin (1908) 20. yüzyılın başlarında kolloidal altın parçacıkların renkleriyle ilgili yayınladığı çalışması değerlidir. Mie, bu çalışmasında, küçük ve küre biçimindeki parçacıkların ışık saçılımını hesaplamak için Maxwell'in elektromanyetik teorisini kullanmıştır. İlk ölçümlerinde altının boyutunun değişmesi ile renginin değiştiğini bulmuştur ve bu fenomen daha sonra *yüzey plazmon rezonans* olarak adlandırılmıştır. Homojen ve izotropik (her yönde aynı şekilli) küreler tarafından gerçekleştirilen elektromanyetik saçılım, Mie'nin teorisi olarak adlandırılrsa da, ondan daha önce de bu konuda çalışan bilim insanları olmuştur. Alfred Clebsch, Ludvig Lorenz ve Peter Debye'nin konu hakkında çok değerli çalışmaları olmuştur (Wriedt, 2012). Bu yüzden teori Lorenz-Mie teorisi ve hatta Lorenz-Mie-Debye teorisi olarak da bilinmektedir. Ludvig Lorenz küre parçacıklar tarafından ışığın saçılımı konusunda aynı hesaplamaları 1890'da yapmıştır. Ancak bu hesaplamaları Danca yayınladığı için Fransızcaya çevrilmeden önce neredeyse hiç kimse haberdar olamamıştır. Ayrıca hesaplamalarını Maxwell'in elektromanyetik teorisi ile ilişkilendirmemiştir (Wriedt, 2012).



Şekil 1.7. Metal nanoparçacıkların yüzey plazmonlarını gösteren örnek çizim (Willets ve Duyne, 2007)

Yüzey plazmon rezonansı (surface plasmon resonance, SPR), bir parçacığın elektronlarının, parçacığa gelen ışığın uyarılması ile kollektif şekilde salınımıdır (Şekil 1.7). Metallerin yüzeyindeki bu serbest elektron bulutu, elektron plazması olarak adlandırılmakta ve metalin yüzeyindeki bu elektron plazmasında şekilde görüldüğü gibi gerçekleşen salınımlar ise plazmon olarak adlandırılmaktadır. Yüzey plazmonlarının salınımı nanoparçacıkların ışıkla olan ilişkisini ve dolayısıyla rengini belirler. Atomik veya moleküler haldeki aksine, metal nanoparçacıklar yüzey plazmon rezonanslarından dolayı yüksek absorpsiyon ve saçılım bantlarına sahiptirler. Rezonans koşulları gelen ışığın frekansının, pozitif yüklü çekirdeğin dengeleme kuvvetlerine karşı salınım halindeki yüzey elektronlarının doğal frekansına eşleştiği zaman kurulur (Zeng ve ark., 2011). Şekil 1.7'deki gibi gelen ışığın dalga boyu, etkileştiği parçacıktan çok büyük ise bu, nanoparçacığın yüzeyinde, lokalize yüzey plazmon rezonans (localized surface plasmon resonance, LSPR) olarak bilinen bir frekansta, lokal olarak salınan plazmonlara neden olur (Willets ve Van Duyne, 2007). Yüzey plazmon rezonansları dielektrik ortamdaki değişikliklere duyarlıdır. Yüzey plazmon ölçümleri lazer ve dedektörden oluşan SPR cihazları ve UV-GB spektrofotometresi ile yapılır. UV-GB spektrofotometresinde numuneye gönderilen ışığın şiddetinin azalmasından absorpsiyon ve saçılma bir arada sorumludur (Şekil 1.8). Çok küçük parçacıklarda (~2 nm) saçılım absorbansın yanında ihmal edilebilecek

düzeyle kalırken, büyük parçacıklarda ($\sim 1 \mu\text{m}$) absorpsiyonun yanında ihmal edilebilecek düzeyle geriler (nanoComposix, 2012). Yüzeyle plazmon rezonansı dalga boyu, nanoparçacıkların boyutları, şekilleri ve türleri değıştirilerek ayarlanabilir (Willets ve Van Duyne, 2007).



Şekil 1.8. Altın nanoparçacık için (50 nm) saçılım, absorpsiyon ve toplam spektrum (nanoComposix, 2012)

Çapı “a” olan ve z-ekseninde polarize bir ışınla ($\lambda > a$) uyarılmış küre biçimindeki nanoparçacıkların etrafındaki elektromanyetik alan, Maxwell denklemlerinin yarı statik bir yaklaşımla çözümlenmesiyle hesaplanabilir (Jeanmarie ve Van Duyne, 1977):

$$E_{dış}(x, y, z) = E_0 \hat{z} - \left[\frac{\epsilon_{iç} - \epsilon_{dış}}{\epsilon_{iç} + 2 \epsilon_{dış}} \right] a^3 E_0 \left[\frac{\hat{z}}{r^3} - \frac{3z}{r^5} (x\hat{x} + y\hat{y} + z\hat{z}) \right]$$

Burada $\epsilon_{iç}$ metal nanoparçacığın dielektrik sabiti, $\epsilon_{dış}$ dış ortamın dielektrik sabitidir. Metal nanoparçacıkların spektrumları ise şu formüle göre hesaplanabilir (Link ve Sayed, 1999):

$$E(\lambda) = \frac{24 \pi^2 N a^3 \epsilon_{dış}^{3/2}}{\lambda \ln(10)} \left[\frac{\epsilon_f(\lambda)}{(\epsilon_g(\lambda) + X \epsilon_{dış})^2 + \epsilon_{iç}(\lambda)^2} \right]$$

Burada ϵ_g ve ϵ_f metal dielektrik fonksiyonun gerçek ve farazi bileşenleri, X parçacığın geometrisine göre 20'ye kadar yükselebilen ve küre için 2 olan bir faktör ve N parçacığın temsil edilebileceği ölçülebilir polarize elemanlarıdır.

Maxwell denklemlerinden türetilen bu basitleştirilmiş denklemlerden de anlaşılabilceği gibi metal nanoparçacıkların elektromanyetik spektrumları parçacıkların; cinsine, şekline, büyüklüğüne, ortamın ve parçacığın dielektrik sabitine bağlıdır ve bu değerler bilirse hesaplanabilirler. Altın, gümüş, bakır ve bazı alkali metal nanoparçacıklar görünür bölgede absorpsiyon maksimumuna sahiptirler (Ozturk, 2010; s.:5-6).

Metal nanoparçacıkların UV-GB spektroskopisinde kullanıldığı çalışmalar, metal nanoparçacıkların analitin varlığında optik özelliklerinde gözlenen değişikliklerden, yani spektrumundaki değişikliklerden yararlanarak yapılan tayin çalışmaları olmuştur. Bu teknikte SPR bantlarındaki değişimden analitik amaçlı yararlanılmaktadır. Özellikle saçılma, agregasyon seviyesine çok duyarlıdır ve absorpsiyon ile birlikte agregasyon arttıkça kırmızıya kayma gözlenir (*nanoComposix*, 2012).

Örneğin; sitrat kaplı gümüş nanoparçacıklar elektronegatif yüklü yüzeye sahiptirler ve suda elektrostatik itmeden dolayı birbirlerinden simetrik olarak dağınık halde bulunurlar. Bu çözelti sarı renkli plazmon rezonans bantı gösterir (Henglein ve Giersig, 1999). Jing ve ark.nın (2008) bir çalışmasında olduğu gibi bu çözelti pozitif yüklü bir molekülle karşılaştığında (çalışmada berberin hidroklorür) elektrostatik çekimden dolayı gümüş nanoparçacıklarının topaklanmasına sebep olacak ve renk değişimi gözlenecektir. Jing ve arkadaşları bu stratejiyi berberin'in kolorimetrik tayininde kullanmışlar ve gümüş kolloidlerinin berberin konsantrasyonuna bağlı olarak sarıdan yeşil ve maviye dönüştüğünü gözlemlemişlerdir. Absorpsiyon spektrumundaki değişimlerden yararlanarak da kantitatif tayin gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada tayin alt sınırları 13 nM'dir. Bu çalışmanın dışında Lu ve arkadaşları (2010) UV-GB spektrofotometresi kullanarak sefadrinin farmasötik preparatlarda altın nanoparçacıklar ile tayinini gerçekleştirmişlerdir. Nezhad ve arkadaşları (2010) ise dopamin, levodopa ve adrenalin analizi için gümüş nanoparçacıklar kullanmışlardır.

Guo ve ark.1 (2010) ise önemli bir analiz olan sütte ve bebek mamalarında melamin analizi için altın nanoparçacıklarıyla kolorimetrik tayin gerçekleştirmişlerdir. Hajizadeh ve arkadaşları (2011) ise suda siyanür tayinini, sudaki diğer iyonlardan herhangi bir girişim görmeden gümüş nanoparçacıklarla gerçekleştirmişlerdir. Bir pestisit olan asetamipridinin sebzelerde tayini için Xu ve arkadaşlarının (2011) geliştirdiği yöntemde ise altın nanoparçacıklar kullanılmıştır. Yapılan çalışmalardan görüldüğü gibi geniş uygulama alanlarında, UV-GB spektrofotometresinin kullanıldığı, metal nanoparçacıklarla moleküllerin etkileşiminden yararlanan yöntemler mevcuttur. Metal nanoparçacıkların kullanıldığı bu çalışmalarda yöntemlerin temel avantajları; duyarlılığı, seçiciliği, hızlı ve doğru sonuç vermesi ve pahalı cihazlara ihtiyaç duyulmamasıdır. Geliştirilen çalışmalarda hedef moleküller genellikle şüpheli ve ortamda bulunmaması gereken moleküller olmaktadır ve yöntemler genellikle gözle dahi, aranılan molekülün varlığını tespit etmeye imkan sağlamaktadır.

Metal nanoparçacıklar spektroskopi alanında floresans spektroskopisinde de geniş bir uygulama alanı bulmaktadır. Bunun nedeni metal nanoparçacıkların kolayca ayarlanabilen optik özellikleri sayesinde analizlerin duyarlılığının artırılabilmesidir. Parçacıkların boyutu ve şekli değiştirilerek istenilen özelliklerde sensörler veya sinyal zenginleştiriciler sentezlenebilmektedir. Yine yüzey çalışmaları floresans spektroskopisinde daha geniş yer bulmaktadır. Yüzey çalışmaları genellikle SERS yönüne kaymıştır. Bunun nedeni SERS de sinyalin SEF'e göre çok daha fazla artırılmasıdır. Ancak son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler floresans alanına olan ilgiyi artırmış ve dolayısıyla SEF çalışmalarını da hızlandırmıştır (Ozturk, 2010; s.:10). Çözelti bazlı çalışmalar ise floresans spektroskopisinde kolaylığı ve tekrar edilebilirliği nedeniyle tercih edilmektedir. Çözelti bazlı çalışmalar ve yüzey çalışmaları metalle zenginleştirilmiş floresans (MEF) olarak adlandırılmaktadır.

Zenginleştirilmiş floresansta; florofor gruba belirli bir mesafede bulunan metal nanoparçacıkları, florofora fazladan elektromanyetik alan sağlayacağı için yayılan ışığın miktarını artırmaktadır (Ozturk, 2010; s.:12). MEF etkisi, nanoparçacığın saçılma modunun, uyarılmış haldeki bileşenle eşleşmesi sonucu oluşan ve çok hızlı

yaşam sürelerine (lifetime) neden olan bir etkidir (Aslan ve Geddes, 2010). Bu sayede geleneksel floresans tekniklerinin duyarlılığı artırılabilir. Floresans verimi, kuantum verimi adı verilen ve floresans yapan moleküllerin sayısının uyarılmış moleküllerin sayısına oranı olarak formüle edilmiş bir denklemle ifade edilir. (Skoog ve ark, 1998)

$$\Phi = k_f / (k_f + k_i)$$

Φ kuantum verimi, k_f floresans hız sabiti, k_i ise ışımsız durulmaların hız sabitlerinin toplamıdır.

Zenginleştirilmiş floresansta metal zenginleştirmesinin hız sabiti de (k_m) hesaba katılarak floresans verimi için formül:

$$\Phi = (k_f + k_m) / (k_f + k_i + k_m) \text{ 'a dönüşmektedir.}$$

Ancak duyarlılığı artırabilmek için bazı faktörlere dikkat etmek gerekmektedir. Birincisi metal nanoparçacıkların (yüzey plazmonların) frekansları floresans yapan molekülün emisyon frekansıyla örtüşmelidir. Floresans yapan molekülün emisyon spektrumu molekülün spesifik özelliklerinden biridir ve değiştirilemez ancak yüzey plazmon rezonans spektrumu metalin büyüklüğüne ve şekline bağlı olduğu için ve bu da değiştirilebilen bir parametre olduğu için bu faktör ayarlanabilir (Kruszewski, 2008). İkinci faktör ise florofor ile metal nanoparçacığın mesafesinin ayarlanmasıdır ki, eğer bu mesafe az olursa florofordan yayılan floresans metal nanoparçacık tarafından absorbe edilir ve floresans sönümlenmesi gözlenir. Bu sönümlenmeye floresans rezonans enerji transferi (FRET) veya daha doğru bir ifadeyle rezonans enerji transferi (RET) denir. RET iki molekül birbirlerine yeterince yakınsa (~10 nm) ve bir molekülün yaydığı ışığın spektrumu diğer molekülün absorban spektrumuyla örtüşüyorsa gerçekleşir (Lakowicz, 2006; s.:13). Metalle güçlendirilmiş floresansta bu faktörü ayarlamak oldukça zordur ve bazen florofora bir molekül bağlayarak bazen

de florofor ile metal nanoparçacık arasında bir ara yüzey ekleyerek bu ayarlanmaya çalışılır. (Ozturk, 2010; s.:15-16)

Metal nanoparçacıklarla floresans zenginleştirmesine literatürde birçok örnek bulunabilir. İlaç analizlerine uygulamalarına örnek olarak Alam ve ark.nın (2012) katekolaminler için geliştirdikleri bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada katekolaminlerin Tb^{+3} ile yaptıkları kompleksin floresansını gümüş nanoparçacıklarıyla artırmışlardır. Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin tayini için geliştirilen bir başka çalışmada (Tan ve Chen, 2012) ise gümüş nanoparçacıklarla zenginleştirilmiş floresans probu geliştirilmiştir.

Lantanitler, floresans özelliği gösteren ve sulu çözeltileri 0,5 ile 3,0 milisaniye arası sönme süresi gösteren metallerdir (Sabbatini ve Guardigli, 1993). Emisyon sinyalleri yasaklı geçiş olarak adlandırılan 4f orbitallerini de içerdiği için absorpsiyon katsayısı oldukça düşük, emisyon hızı düşük, ömrü yüksektir. Absorpsiyonu düşük olduğu için genellikle doğrudan uyarılmazlar, organik bir ligand ile şelat oluşturduktan sonra uyarılırlar (Lakowicz, 2006; s.:87). Öropyum nanoparçacıklar (EuNP) yüzeyleri modifiye edilebilen ve floresans özelliği gösteren nanoparçacıklardır. Yüzey modifikasyonu ile floresans probu olarak kullanılabilirler.

1.3. Üzerinde Çalışma Yapılan Etken Maddelerin Tayinleri Konusunda Günümüze Kadar Yapılmış Çalışmalar

1.3.1. Spektrofotometrik Çalışmalar

Al-Sabha (2010) AMİ'in ilaçlarda tayini için bir spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Bu yöntemde AMİ, tetrasiyanoetilen (TCNE) ve 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokinon (DDQ) ile reaksiyonlara sokularak 330 ve 340 nm'lerde absorpsiyon maksimumları gösteren renkli kompleksler oluşturulmuştur. TCNE ile oda sıcaklığında gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda oluşan ürün 2-40 dakika stabil olup, bu yöntemdeki çalışma aralığı 0,4-6,8 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. DDQ ile oluşan kompleks ise

40 °C’de tam 30 dakika sonra absorpsiyonu ölçülmüş ve çalışma aralığı 0,8-20 µg/mL olarak bulunmuştur. TCNE ve DDQ için yakalama sınırları sırasıyla 0,06 µg/mL ve 0,18 µg/mL, tayin alt sınırları ise sırasıyla 0,19 µg/mL ve 0,63 µg/mL olarak bulunmuştur.

Bontchev ve ark. tarafından 1984 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada ise TOB, apramisin ve kanamisin için bromtimol mavisi ile iyon-çifti oluşturularak farmasötik preparatlarda tayin yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada oluşan iyon çifti kloroform ile ekstrakte edilmiş ve 430 nm’deki absorpsiyon üzerinden tayin gerçekleştirilmiştir. TOB için çalışma aralığı 1×10^{-3} ile 5×10^{-3} M arasındadır.

Confino ve Bontchev (1990), AMİ, TOB, kanamisin ve neomisin için geliştirdikleri spektrofotometrik tayinde etken maddeleri pentasiyanonitrozilferat (II) ile 540 nm’de absorpsiyon yapan türlere dönüştürmüşlerdir.

Das Gupta ve ark.1983 yılında AMİ, TOB, kanamisin ve neomisini Hantz reaksiyonu ile spektrofotometrik olarak tayin etmişlerdir. Geliştirdikleri stabilite-göstergeli yöntemi ilaç analizlerine uygulamışlardır.

El-Didamony ve ark. (2006) GEN ve vankomisinin potasyum permanganat ile reaksiyonundan yararlanarak bir ilaç analizi yöntemi geliştirmişlerdir. Optimize edilen yöntemde GEN, potasyum permanganat ile 100 °C’de 25 dakika boyunca reaksiyona sokulduktan sonra 3,0-8,0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında tayini gerçekleştirilmiştir.

GEN’in ninhidrin ile mor renkli bir ürün oluşturmasından faydalanılan bir başka çalışmada ise (Frutos ve ark., 2000) 400 nm’deki absorpsiyon ölçülerek tayin gerçekleştirilmiştir. 30-120 µg/mL doğrusal çalışma aralığına sahip olan çalışmanın yakalama sınırının 0,39 µg/mL, tayin alt sınırının ise 1,19 µg/mL olduğu belirtilmiş ve yöntem farmasötik preparatlara uygulanmıştır.

Ghany ve ark. (2003) TOB ve GEN'i 1,4-benzokinon ile türevlendirerek spektrofotometrik ve spektroflorimetrik olarak tayin etmişlerdir. Spektrofotometrik tayinde GEN için çalışma aralığı 16-128 µg/mL ve TOB için ise 16-112 µg/mL'dir.

Krzek ve ark. 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada GEN'i *o*-fitalaldehit ile türevlendirmişlerdir. Elde edilen ürünün konsantrasyonu ile absorpsiyon spektrumunun üçüncü türevinin 40-80 µg/mL aralığında doğrusal bir eğilim gösterdiğini bulmuşlardır. 281 nm'de yapılan ölçümlerde yakalama sınırı 1,66 µg/mL, tayin alt sınırı ise 5,04 µg/mL'dir.

Fujita ve ark.ları (1984) TOB, neomisin, streptomisin, sefalekssin ve ampisilinin tayini için *o*-hidroksihidrokinon ftalein ve uranyum (VI), mangan (II), palladyum (II) veya zirkonyum (II) ile yüzey aktif maddelerin varlığında bir metot geliştirmişlerdir. Bu yöntemde TOB, 2-40 µg/mL aralığında analiz edilebilmektedir. Yöntemde, insan idrarı ve tükürük numunelerine etken maddeler eklendikten sonra analiz edilmiştir. Aminoglikozidler, *o*-hidroksihidrokinon ftalein-uranyum (VI) kompleks sisteminde renkli kompleksler türetmişlerdir(Mori ve ark. 1986). Yine aynı çalışma grubu geliştirdikleri bu yöntemi GEN için membran filtre ön-deriştirme işlemi sonrasında uygulamışlardır. GEN için çalışma aralığını 0-5,4 µg olarak belirmişlerdir.

AMİ, GEN, TOB, kanamisin, streptomisin ve neomisin için geliştirilen bir başka spektrofotometrik yöntemde (Omar ve ark. 2013), aminoglikozidler pikrik asit veya 2-4-dinitrofenol ile sarı renkli iyon çifti oluşturmuşlardır. Doğrusal çalışma aralıkları AMİ için 10-100 µg/mL, GEN için 10-100 µg/mL ve TOB için 2,5-20 µg/mL'dir. Yakalama sınırları AMİ, GEN ve TOB için sırasıyla 2,55 µg/mL, 2,39 µg/mL ve 0,72 µg/mL; tayin alt sınırlarını ise sırasıyla 7,72 µg/mL, 7,25 µg/mL ve 2,19 µg/mL'dir. Yöntemi farmasötik preparatlara uygulamışlardır.

Petrukhin ve ark. (2009) GEN'i Cu(II) ile kompleks haline getirdikten sonra 240 nm'deki absorpsiyonundan yararlanarak analiz etmişlerdir. Oluşan kompleksin 40 dakika stabil kaldığını gözlemlemişler ve yöntemi ilaçlarda miktar tayini için

kullanmışlardır. GEN ile Cu'nun 1:1 oranında birleştiği bu yöntemde çalışma aralıkları 30-100 µg/mL'dir.

TOB'in aromatik aldehitlerle Schiff bazı oluşturduğu çalışmada (Sagar ve ark.,2003), 40-400 µg/mL aralığında tayinleri gerçekleştirilebilmiştir. Aromatik aldehit olarak vanilin, paradimetilaminosinnamaldehit ve paradimetilaminobenzaldehit kullanılan çalışmalarda sırasıyla 570 nm, 420 nm ve 415 nm dalga boylarında ölçümler yapılmıştır.

Williams ve ark.nun 1975 yılında yaptıkları bir çalışmada GEN için spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Yöntemde GEN'i asetillemek için *Eschericia coli* JR88/C600 ve 5, 5'-ditiobis-(2, 2) nitrobenzoik asit kullanmışlardır. İnsan serumuna GEN ekleyerek analizinin gerçekleştirildiği çalışmada 412 nm'de absorpsiyonu ölçülmüştür. Yöntemin doğrusal çalışma aralığı 0,1-50 µg olarak verilmiştir.

1.3.2. Spektroflorimetrik Çalışmalar

Ghany ve ark. (2003) GEN ve TOB'i 1,4-benzokininon ile tamponlanmış ortamda 80 °C'de 15 dakika beklettikten sonra 280 nm'de uyarıp, 630 ve 635 nm'lerdeki emisyon sinyallerini ölçmüşlerdir. Farmasötik preparatlara uygulanan bu çalışmada çalışma aralıkları GEN için 1.28-5.76 µg/mL, TOB için ise 0.64-3,2 µg/mL'dir.

Bir başka çalışmada (Al-Majed ve ark., 2003) GEN'in 4-kloro-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol (NBD-Cl) ile 70 °C'de 1 saat metanolik fosfat tamponunda bekletilmesinden açığa çıkan türevlendirilmiş ürün tayin edilmiştir. Ürün 465 nm'de uyarılıp 530 nm'deki emisyon sinyali ölçülmüştür. Yakalama sınırının 0,112 µg/mL olarak verildiği çalışmada, doğrusal çalışma aralığı 0,56-2,8 µg/mL'dir. Yöntem farmasötik preparatlara ve GEN eklenmiş insan plazmasına uygulanmıştır. Amino asitlerin girişimlerini engellemek için bakır (II) hidroksit ile kompleksleştirme

reaksiyonu uygulamışlardır ve plazmadan % 97,9 \pm 3,4'lük bir geri kazanım elde etmeyi başarmışlardır.

Rizk ve ark. (1995) yaptıkları bir çalışmada AMİ, GEN, TOB, neomisin, streptomisin ve kanamisin, Eu^{+3} ile amin ve hidroksil grupları üzerinden reaksiyona girdiğini öne sürüp, bu reaksiyon sonucunda Eu^{+3} 'ün emisyon spektrumunun pik şiddetindeki artış üzerinden analizleri gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir. Ancak Gilmartin ve ark. (2000) yaptıkları deneylerde spektrumdaki bu artışın aminoglikozidlerin Eu^{+3} ile reaksiyonundan ileri gelmediğini, aminoglikozidlere bağlı sülfat iyonlarının floresans sinyallerindeki artışın nedeni olduğunu kanıtlamışlardır. Deneyde aminoglikozidleri sülfattan arındırdıktan sonra floresans sinyallerinde bir artış olmadığı gözlemlenmiştir.

El-Kosasy ve ark. (2003a) GEN ve TOB'i farmasötik preparatlarda spektrofotometrik olarak analiz etmişlerdir. Yöntem GEN ve TOB'in amin grupları üzerinden 4-kloro-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3 diazol (NBD-Cl) ile bazik ortamda reaksiyona girmesine dayanır. Oluşan türevlendirilmiş ürünün 465 nm'de uyarıldıktan sonra 528 nm'de emisyonu ölçülmüştür. Doğrusal çalışma aralıkları GEN için 1-6 $\mu\text{g/mL}$, TOB için ise 0,5-4 $\mu\text{g/mL}$ 'dir.

AMİ, TOB, kanamisin ve neomisinin insan serumuna ve idrarına eklendikten sonra analiz edildiği bir başka spektrofotometrik çalışmada (El-Shabrawy, 2007) türevlendirme ajanı olarak 2-hidroksil-1-naftaldehit kullanılmıştır. TOB için 0,5-5,0 $\mu\text{g/mL}$, AMİ için 0,25-4,0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralıklarının olduğu yöntem farmasötik preparatlara da uygulanmıştır. 80 °C'de 30 dakikalık su banyosunda tamponlanmış ortamda bekletilen örnekler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 366 nm'de uyarılmış ve emisyonları 434 nm'de ölçülmüştür.

Wang ve ark. (2000) GEN'i senkronize birinci türev floresans yöntemiyle analiz etmişlerdir. GEN'i asetilaseton ve formaldehit ile kaynayan su banyosunda 25 dakika boyunca karıştırıp buz banyosuna aldıktan sonra oluşan *N*-gentamil-2,6-dimetil-3,5-

diasetil-1,4-dihidropiridin floresansından yararlanılmıştır. Birinci türev pikinin 425 nm’de olduğu yöntemde çalışma aralığı 0-3 U/mL olarak belirtilmiştir.

GEN’in göz damlalarında florimetrik tayini için Gubernator ve ark. (2006) *o*-fitaldialdehit ile türevlendirme yöntemi geliştirmişlerdir. Borat tamponuyla pH’ın 10,4’e tamponlandığı ortamda oluşan ürünün 10 dakikada maksimum emisyon sinyali verdiği, ardından sinyalde düşüş olduğu gözlenmiştir. Doğrusal çalışma aralığının 0,5-4,0 µg olduğu çalışma farmasötik preparatlara uygulanmıştır.

Sığır serum albüminin kullanıldığı bir başka çalışmada (Liu ve ark., 2012), Ponceau S eklenmesiyle sığır serum albüminin floresansında sönümlenme gözlenmiştir. Bu karışıma GEN eklendiğinde emisyon sinyallerinin tekrar yükseldiği gözlenmiştir. GEN’in 0,084 mM’dan 0,84 mM’a eklendiği çalışma kantitatif tayinden çok moleküller arası etkileşimin aydınlatılmasına odaklanmıştır ve herhangi bir numuneye uygulanmamıştır.

Sanchez-Martinez ve ark. (2004) AMİ için indosiyenin yeşili ile bir uzun-dalga florimetrisi kullanarak kinetik bir tayin gerçekleştirmişlerdir. 765 nm’de uyarılan örneklerin emisyonu 812 nm’de 5 saniye boyunca ölçülmüştür. İnsan serumuna AMİ eklenerek analizinin yapıldığı çalışmada serum için yakalama sınırı 2,5 µg/mL’dir.

Tekkeli ve ark. (2013) TOB’i floreskamin ile türevlendirmişlerdir. Türevlendirilen bu ürünü 388 nm’de uyarıp 469 nm’de emisyonunu ölçmüşlerdir. Doğrusal çalışma aralığı 0,3-1,5 µg/mL olan yöntemi farmasötik preparatlara ve insan serumuna uygulamışlardır. Yakalama sınırınının 65 ng/mL, tayin alt sınırınının 215 ng/mL olduğu çalışmanın dayanıklılık testleri de gerçekleştirilmiştir.

1.3.3. Sıvı Kromatografisi Çalışmaları

Yaptığımız literatür araştırmasında AMİ, GEN ve TOB tayini için bugüne kadar 129 tane yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi geliştirildiği

görülmüştür: Adams ve Hoogmartens (2004); Adams ve ark. (1998a); Adams ve ark. (1998b) Agarwal (1989); Al-Amoud ve ark. (2002); Albracht ve De Wit (1987); Al-Majed (2008); Almeida ve ark. (2012); Anhalt ve Brown (1978); Arcelloni ve ark. (2001); Attema-De Jonge ve ark. (2008); Babin ve Fortier (2007); Baietto ve ark. (2010); Baranowska ve ark. (2006); Barends ve ark. (1983); Barends ve ark. (1987); Barends ve ark. (1980); Barends ve ark. (1981); Bogialli ve ark. (2005); Bohm ve ark. (2013); Brajanoski ve ark. (2008); Cabanes ve ark. (1991) Cai ve ark. (2005); Cai ve Mou (2005); Calderon ve ark. (1996); Caturla ve ark. (1992); Caudron ve ark. (2013); Cazorla ve ark. (2014); Chang ve ark. (2010); Cherlet ve ark. (2000); Chopra ve ark. (2013); Chopra ve ark. (2010); Claes ve ark. (1984); Clarot ve ark. (2004); Clarot ve ark. (2009); Dash ve Suryanarayanan (1991); D'Souza ve Ogilvie (1982); Essers (1984); Fabre ve ark. (1989); Feng ve ark. (2001a); Feng ve ark. (2001b); Feng ve ark. (2001c); Feng ve ark. (2002); Fennell ve ark. (1995); Freeman ve ark. (1979); Galanakis ve ark. (2006); Gambardella ve ark. (1985); Getek ve ark. (1983); Getek ve ark. (1991); Gotelli ve ark. (1984); Graham ve ark. (1997); Guo ve ark. (2006); Haughey ve ark. (1980); He ve ark. (2011); Heller ve ark. (2005); Isoherranen ve Soback (2000); Joseph ve Rustum (2010); Kabra ve ark. (1983a); Kabra ve ark. (1983b); Kabra ve ark. (1984); Kantor ve Selzer (1968); Kaufmann ve ark. (2012); Kaufmann ve Maden (2005); Keevil ve ark. (2003); Kijak ve ark. (1997), Kim ve ark. (2003); Korany ve ark. (2013); Kowalczyk ve ark. (2010); Kraisintu ve ark. (1982); Kubo ve ark. (1984); Kubo ve ark. (1982); Kuehl ve ark. (2012); Laki ve ark. (2011); Larsen ve ark. (1980); Lecaroz ve ark. (2006); Lehotay ve ark. (2013); Li ve ark. (2005); Li ve ark. (2014); Loffler ve Ternes (2003); Lu ve Feng (2007); Maitra ve ark. (1978); Maitra ve ark. (1979); Mantanga ve ark. (2007); Mantanga ve ark. (2008); Marples ve Oates (1982); Martos ve ark. (2010); Mashat ve ark. (2008); McLaughlin ve ark. (1994); Megoulas ve Koupparis (2004); Megoulas ve Koupparis (2005); Morovjan ve ark. (1998); Ng ve ark. (1991); Nicoli ve Santi (2006); Ovalles ve ark. (2005); Papp ve ark. (1992); Peng ve ark. (1977); Rees ve ark. (2000); Ruckmani ve ark. (2011); Rumble ve Roberts (1987); Russ ve ark. (1998); Santos ve ark. (2002); Sar ve ark. (1993); Sar ve ark. (1992); Schimdt ve Slavin (1981); Seidl ve Nerad (1988); Sekar ve ark. (2013); Serrano ve Silva (2006a); Serrano ve Silva (2006b); Shou ve ark. (2013); Statler (1990); Stypulkowska ve ark. (2010); Szunyong ve ark. (2000),

Tao ve ark. (2012); Turnispeed ve ark. (2009); Valentini ve ark. (2008); Van Duijn ve ark. (1988); Van Holthoon ve ark. (2009); Vucicevic ve ark. (2011); Walker ve Coates (1981); Wang ve ark. (2009); Weigand ve Coombes (1983); Wichert ve ark. (1991); Yang ve Tomellini (2001); Yusuf ve ark.. (1999) Zawilla ve ark. (2007); Zhang ve ark. (2011); Zhang ve Peng (2011); Zhu ve Wang (2013); Zhu ve ark. (2008).

Bu yöntemlerin bir kısmı dedeksiyon için türevlendirme içerirken bir kısmı da özel dedektörler sayesinde türevlendirmeye ihtiyaç duymadan analize imkan sağlamaktadır. Bu yöntemlerde dedektör olarak elektrokimyasal, amperometrik, diyot dizi dedektör, floresans, kütle spektrometri, tandem kütle spektrometri, ELSD, yüklü aerosol, lazer kaynaklı polarimetrik, kemilüminesans, rezonans Rayleigh saçılma ve refraktif indeks dedektörleri kullanıldığı görülmüştür. Bu yöntemlerin bazılarında tayin limitleri kullanılan dedektöre ve/veya türevlendirme ajanlarına göre düşük değerlere inebilmiştir.

Numune olarak ise AMİ, GEN ve TOB'in çok çeşitli matrislerde analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunlar insan kulak sıvısı, idrarı, plazması, serumu ve dokusu; sığır böbreği, dokusu, sütü, idrarı ve plazması; köpek plazması; domuz böbreği; at böbreği; su ve hastane atık suyu; toprak; ilaç ve yiyeceklerdir.

Numune hazırlama aşamasında genellikle katı faz ekstraksiyonu kullanılmakla birlikte, ultrasonik destekli ekstraksiyon ve katyon değiştirme ekstraksiyonuna da rastlanmıştır.

1.3.4. Diğer kromatografik yöntemler

Kromatografik çalışmalar genellikle YPSK yönüne kaymış olmakla birlikte az sayıda da olsa farklı yöntemler bulunmaktadır. Isoherran ve Soback (2000) GEN'i trimetilsililimidazol ve trifloroasetik asit anhidrit ile türevlendirip gaz kromatografisi kütle dedektöründe analiz etmişlerdir. Preu ve ark. (1999) ise GEN'i

trimetilsiliimidazol ve heptaflorobütirilimidazol ile türevlendirdikten sonra gaz kromatografisi kütle dedektöründe tayin etmişlerdir.

Hidrofilik etkileşim kromatografisi kullanılan yöntemlerde kütle dedektörü kullanılmıştır (Kumar ve ark., 2012a; Kumar ve ark., 2012b; Oertel ve ark., 2004). İnsan serumu, bal ve böbrek numunelerinde analizler gerçekleştirilmiştir.

Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi yöntemleri (Allwohn ve ark., 1988; Argekar ve ark., 1996; El-Kosasy ve ark., 2003b; Hubicka ve ark., 2009; Sekkat ve ark., 1989; Vega ve ark., 1991) farmasötik preparatlara ve kümes hayvanlarının etlerinden alınan numunelere farklı türevlendirme ajanları kullanılarak uygulanmıştır.

1.3.5. Kapiler elektroforez yöntemleri

Günümüze kadar AMİ, GEN ve TOB tayini için sıvı kromatografisine göre daha az sayıda kapiler elektroforez yöntemi (23 adet) geliştirilmiştir. Bunlar: Ackermans ve ark. (1992); Curiel ve ark. (2007); Deubner ve Holzgrabe (2004); El-Attug ve ark. (2012a); El-Attug ve ark. (2012b); El-Attug ve ark. (2012c); El-Attug ve ark. (2012d); Kaale ve ark. (2000); Kaale ve ark. (2001); Kaale ve ark. (2002a); Kaale ve ark. (2002b); Kaale ve ark. (2002c); Kaale ve ark. (2005); Law ve ark. (2006); Lin ve ark. (2008); Liu ve ark. (2004); Oguri ve ark. (1996); Serrano ve Silva (2006c); Voegel ve Baldwin (1997); Wan ve Le (1999); Yeh ve ark. (2005); Yu ve ark. (2009); Yuan ve ark. (2005)'dir.

Bu yöntemlerde misel elektrokinetik kapiler kromatografisi ve kapiler zon elektroforez gibi yöntemler kullanılırken dedektör olarak kapasitif eşleşmiş temassız iletkenlik dedektörü (C4D), floresans dedektörü, lazerle indüklenmiş floresans dedektörü, diyot dizi dedektörü ve elektrokimyasal dedektör gibi dedektörler kullanılmıştır. Yöntemler farmasötik preparatlara, insan plazması ve serumuna ve sığır sütüne uygulanmıştır. Çalışmalarda dedektör tipine göre değişik türevlendirme ajanları kullanılmıştır.

1.3.6. Elektroanalitik Yöntemler

AMİ, GEN ve TOB için geliştirilen az sayıda elektroanalitik çalışma vardır: (Athanasiou-Malaki ve ark. (1989); Flemming (1989); Gonzalez-Fernandez ve ark. (2011); Gupta ve ark. (2013); Li ve ark. (2004); Perruchon ve Caullet (2004); Schoukroun-Barnes ve ark. (2014); Sun ve ark. (2005); Wang ve ark. (2007); Xu ve ark. (2003)). Bu çalışmalardan yakın zamanda yapılan moleküler baskılanmış polipirol ile modifiye edilmiş camı karbon elektrotlu voltametrik çalışma (Gupta ve ark., 2013) ve RNA aptamer bazlı elektrokimyasal sensör geliştirilen (Schoukroun-Barnes ve ark., 2014) çalışma hariç genellikle çok yüksek tayin alt sınırları görülmektedir. Diferansiyel puls polarografisi, voltametri ve amperometrinin kullanıldığı çalışmalarda numune olarak farmasötik preparatlar, serum ve süt örnekleri kullanılmıştır.

1.3.7. İmmünolojik yöntemler

Seçilen aminoglikozidler için geliştirilen immunoassay çalışmaları bulunmaktadır: Ara ve ark. (1995); Barbier ve Galvain (1979); Broughton ve ark. (1976); Casley ve ark. (1978); Francke ve ark. (1981); Gerson ve ark. (1981); Griffiths ve ark. (1977); Heick ve ark. (1982); Jin ve ark. (2005); Jolley ve ark. (1981); Khaldeeva ve ark. (2002); Kolosova ve ark. (1988); Kominami ve ark. (1981); Li ve ark. (2012); Longmore ve ark. (1976); Mahon ve ark. (1973); Meulemans ve ark. (1981); Munro ve ark. (1982); Ngo ve Narinesingh (2005); O'Connell ve ark. (1984); Phaneuf ve ark. (1980); Sanchez-Martinez ve ark. (2007); Sanchez-Martinez ve ark. (2009); Standefer ve Saunders (1978); Staneck ve ark. (1981); Suzui ve ark. (1981); Tayeb ve ark. (1986); Tsay ve Palmer (1981); Tsay ve ark. (1980); Van Es ve ark. (2001); Van Hamont ve ark. (1980); Vasliades ve ark. (1984); Wang ve ark. (1981); Watson ve ark. (1976); Wills ve Wise (1979). Bu metotlar radyoimmünolojik (RIA) ve enzim immünolojik (ELIZA) çalışmalardır. ELIZA çalışmalarının birçoğu floresans dedeksiyonu ile yapılmakla birlikte, amperometrik dedeksiyon da yapılmıştır. Bu çalışmalar plazma, serum ve süt örneklerine uygulanmıştır.

1.3.8. Rezonans Rayleigh Saçılımı Spektroskopisi

Hu ve ark (2003, 2010); Li ve ark. (2009); Liu ve ark. (2006); Liu ve ark. (2003a, 2003b); Wang ve ark. (2010); AMİ, GEN ve TOB için bazı boyalar (pontamin gök mavisi, Kongo kırmızısı, tripan mavisi, Evans mavisi) ve CdTe kuantum dot kullanarak rezonans Rayleigh saçılımına dayanan yöntemler geliştirmişlerdir. Yöntemler farmasötik preparatlara, idrara ve serumlara uygulanmıştır.

1.3.9. Çip çalışmaları

Uygulamadaki basitliği ve taşınabilirliği nedeniyle son yıllarda ilgi gören yöntemlerin çiplere (lab-on-a-chip) aktarılması çalışmaları AMİ ve TOB için de uygulanmıştır (Sierra-Rodero ve ark., 2012; Yola ve ark., 2014). Sierra-Rodero ve ark (2012) AMİ'yi luminol ve hidrojen peroksit varlığında Cu(II) ile reaksiyona sokarak kemilüminesansını ölçmüşlerdir. Ancak bu yöntemde çalışma aralıkları AMİ için 0,3-3,3 μM gibi görece yüksek aralıklardır. Yola ve ark. (2014) ise kuvars kristal mikrobalsans nanosensörü geliştirmişler ve bu yöntemi süte uygulamışlardır. Bu yolla yakalama sınırlarını pM seviyelerine kadar indirebilmişlerdir.

1.4. Amaç

Beşeri amaçlı sıkça kullanılan aminoglikozid grubu antibiyotikler, hayvanlarda da hastalık önleme ve koruma amaçlı kullanılabildiği gibi illegal olarak da büyüme hızlandırıcı (growth-promoter) olarak kullanılabilmektedir. Bunların gıdalarda, sütte ve sularda bulunması; antibiyotik direncini artırmalarına ilaveten, nefrotoksik ve ototoksik özelliklerinden dolayı alınması halinde insan organizması için tehlikelidir ve bu yüzden bu maddeler için miktar sınırlamaları getirilmiştir. Gentamisin (GEN) için sütte maksimum kalıntı limiti Avrupa Birliği, Dünya Sağlık Örgütü ve Kanada'da 100 ppb, ve Amerika Birleşik Devletleri 'nde 30 ppb olarak belirlenmiştir ama tobramisin (TOB) ve amikasin (AMİ) için bu sayılan ülkelerde herhangi bir limit belirlenmemiştir.

Aminoglikozid grubu antibiyotiklerin analizleri kromofor grubu içermemelerinden, yüksek polaritelerinden, ters-faz sıvı kromatografi kolonlarında alıkonmalarının zayıf olmasından dolayı analizleri zordur. AMİ, GEN ve TOB tayini için Avrupa Farmakopesinde yer alan sıvı kromatografisi yönteminde ters-faz polimerik kolon ve amperometrik dedektör önerilmektedir. Ama bu kolonla yapılan analizlerde geniş ve kuyruklu pikler elde edilmekte olup ayrıca amperometrik dedektörü de her yer ve zamanda bulmak çok da kolay değildir..

Bu nedenle AMİ, GEN ve TOB'in miktar tayinleri için yeni, dayanıklı, basit, ucuz ve hızlı metotlar geliştirilmesi önemlidir.

Doktora tezi kapsamında; aminoglikozid grubu antibiyotiklerden olan GEN, TOB ve AMİ için gümüş ve altın nanoparçacıklar kullanılarak spektrofotometrik ve spektroflorimetrik miktar tayini yöntemleri geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilecek yöntemlerin basit, ucuz, tekrar edilebilir ve farmasötik preparatlara ve süt numunelerine uygulanabilir olması da hedeflenmiştir.

Literatürde; kromofor grubu içermediği için spektrumu olmayan bu moleküllerin analizlerinde sadece türevlendirme yoluyla spektrofotometrik tayin yöntemlerinin geliştirildiği ve uygulandığı görülmüştür. Ancak bu yöntemler, aminoglikozidlerin kalıntı analizleri için yeterli olmamasına ilaveten türevlendirme işlemleri sırasında uygulanan ısıtma ve ekstraksiyon gibi işlemler nedeniyle de zahmetlidir. Doktora tezi kapsamında yapılacak çalışmalar ile hem renk değişiminden dolayı gözle dahi kalitatif analize imkan veren hem de kantitatif tayin amacıyla yüksek duyarlılığa sahip, spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaca ulaşabilmek için gümüş nanoparçacıkların kullanılması düşünülmüştür. Yapılan literatür araştırmasında bugüne kadar aminoglikozid sınıfı antibiyotiklerin kalitatif ve kantitatif analizleri için gümüş nanoparçacıkların kullanıldığı spektrofotometrik bir analiz çalışmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle yapılacak çalışma orijinaldir. Ve de geliştirilecek yöntemlerin hem bu antibiyotikleri içeren farmasötik preparatlara ve hem de süt numunelerine uygulanabilir olması amaçlanmıştır.

Yine tez kapsamında aminoglikozidler için spektrofotometrik bir yöntem geliştirip, altın nanoparçacıklarla sinyallerinin güçlendirilmesi amaçlanmıştır. Aminoglikozidler için bugüne kadar yapılmış florimetrik çalışmalar genellikle türevlendirilen aminoglikozidlerin kromatografik veya elektroforetik tayinleridir. Ayrıca AMİ, GEN ve TOB için bugüne kadar yapılan spektrofotometrik çalışmaların duyarlılığı çoğunlukla ppm seviyelerindedir. Yapılan literatür taramalarına göre yapılan çalışmalarda altın nanoparçacıklar kullanılarak gerçekleştirilen bir spektrofotometrik tayin yöntemi bulunmamaktadır. Yapacağımız çalışmalarda aminoglikozidlerin spektrofotometrik tayini için Eu'un kullanıldığı bir yöntem geliştirip bu yöntemin duyarlılığını da altın nanoparçacıklar ile sinyal zenginleştirilmesi yapılarak artırılması planlanmıştır. Yüksek duyarlılığa sahip olmasını beklediğimiz bu yöntem sayesinde çok pahalı cihazlarla (LC-MS gibi) yapılan pahalı yöntemlere alternatif olarak, ucuz, basit, duyarlı ve validasyonu yapılmış bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmektedir. Aminoglikozidler için geliştirilecek bu yöntemin duyarlılığı, doğruluğu ve kolay uygulanabilirliği ile diğer yöntemlere üstünlük sağlayacağı ve de rutin analizlerde kullanılabilir bir yöntem olacağı düşünülmektedir. Çünkü metal nanoparçacıkların kullanıldığı çalışmalarda yöntemlerin temel avantajları; duyarlılığı, seçiciliği, hızlı ve doğru sonuç vermesi ve pahalı cihazlara ihtiyaç duyulmamasıdır. Geliştirilecek bu yöntemin de hem farmasötik preparatlara hem de süt örneklerine uygulanması planlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasalların tamamı analitik saflıktadır ve ayrıca bir saflaştırma işlemi uygulanmaksızın kullanılmışlardır. AgNO_3 , H_3PO_4 , HCl , HNO_3 , NaNO_2 , EDTA, Na_2SO_4 , kloroform, betametazon dipropiyonat, trisodyum sitrat ve sodyum dodesil sülfat (SDS); Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. EuCl_3 , HAuCl_4 , NaBH_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , NaOH , Na_2CO_3 , NaCl , lipoik asit, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]karbodiimid hidroklorür (EDC) ve N-hidroksisüksinimid (NHS), etanol, setiltrimetilamonyum bromür (CTAB), metil-*p*-hidroksibenzoat, propil-*p*-hidroksibenzoat, gliserin, klorbütanol, laktoz ve trikloroasetik asit Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından satın alınmıştır. NaNO_3 , KCl ve sodyum benzoat Riedel de Haen (Seelze, Almanya) firmasından; BaCl_2 , Fluka (Buchs, Almanya) firmasından; tannik asit, sitrik asit ve askorbik asit Alfa Aesar (Massachusetts, ABD) firmasından satın alınmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan aminoglikozidler:

Gentamisin sülfat TÜM EKİP İLAÇ A.Ş. (İstanbul, Türkiye) tarafından sağlanmıştır. Gentamisin, % 30 C1, % 26 C1a, % 44 C2 formundadır. Sülfat içeriği % 33,5'dir.

Amikasin Sülfat, TÜM EKİP İLAÇ A.Ş. (İstanbul, Türkiye) tarafından sağlanmıştır. Amikasin:sülfat oranı 1:2'dir.

Tobramisin, BİLİM İLAÇ (İstanbul, Türkiye) tarafından sağlanmıştır.

Tez çalışmasında AMİ ve GEN için belirlenen konsantrasyonlar, sülfat içeriklerine göre düzeltilerek hesaplanmıştır.

2.1.2. Kullanılan Farmasötik Preparatlar

BELOGENT[®] merhem (1mg GEN/g; Parti no: 25063101) Türkiye'deki eczanelerden temin edilmiştir. Amikasin sülfat içeren DRAMIGEL[®] (% 5; Parti no:C0681) preparatı İtalya'daki eczanelerden temin edilmiştir. TOBRASED[®] göz merhemi (% 0,3 TOB içermektedir; Parti no: 1041039B) Türkiye'deki eczanelerden temin edilmiştir.

2.1.3. Cihazlar

Spektrofotometrik çalışmalarda Shimadzu 1601 model çift ışın yollu spektrofotometre (Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. Spektrumlar UVPC37 ve UV-probe yazılımları kullanılarak görüntülenmiş ve işlenmiştir. Numuneler 1cm'lik kuartz küvetlerde ölçülmüş ve slit aralığı sabit olarak 2 nm'de tutulmuştur.

Floresans spektrumları Agilent Carry Eclipse spektroflorimetre (California, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Numuneler 1 cm'lik kuartz floresans küvetlerine alınmıştır. Uyarma ve emisyon slitleri değiştirilerek optimize edilmiştir. Sıcaklık kontrolü "Agilent Cary Single Cell Peltier Accessory" ile sağlanmıştır.

Santrifüj işlemlerinde Thermo Micro CL21 soğutmalı mikrosantrifüj (New York, ABD) ve Nüve NF 200 santrifüj (Ankara, Türkiye) kullanılmıştır.

pH ölçümlerinde Mettler-Toledo WTW model pHmetre (Ohio, ABD) kullanılmış ve ölçümlerden önce kalibrasyonu yapılmıştır.

Ultrasonik banyo olarak JP SELECTA (Barselona, İspanya), Vorteks karıştırıcı olarak Velp Scientifica Zx³ (Usmate, İtalya) kullanılmıştır.

Elektron mikroskobu görüntülemeleri Ankara Üniversitesi Elektron Mikroskobu Birimi'nde ve ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda bulunan FEI Tecnai G2 TEM (transmission electron microscopy; Hillsboro, OR,USA) cihazlarıyla yapılmıştır. AgNP'lerin boyutları için ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Malvern Zetasizer Nano Z model cihazla ölçülmüştür.

IR spektrumları Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü'nde bulunan ATR eklentili Shimadzu IR Affinity-1 cihazıyla ölçülmüştür. Erime noktası tayini için Electro Thermal - IA9100 model erime noktası tayin cihazı kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

Doktora tezi kapsamında AMİ, GEN ve TOB'in farmasötik preparatlarda ve sütte analizi için altın ve gümüş nanoparçacıklar kullanılarak spektrofotometrik ve spektroflorimetrik metotlar geliştirilmiştir.

2.2.1. Spektrofotometrik çalışmalar

2.2.1.1. Giriş

Işık genellikle birçok dalga boyunun karışımı halindeki bir elektromanyetik bir radyasyondur. Işık dalgalarının iki tepe noktası arasındaki mesafe ile ölçülen dalga boyu, λ ile gösterilir. Işığın 185-400 nm arası dalga boylarını içeren bölgesi mor ötesi (UV) bölge olarak adlandırılır. Gözle görülebilen bölge ise 400-700 nm aralığındadır (Poole ve Kalnenieks, 2000). UV ve görünür bölge analitik uygulamalarda en çok kullanılan bölge olup, spektrofotometri bu bölgedeki ışığın absorpsiyonu veya

geçirgenliğinin ölçülmesi üzerine kurulu bir tekniktir. Geçirgenlik (T) ve absorptans (A) numuneye yollanan ışık (P_0) ile numuneden geçen ışık (P) arasındaki ilişkiden yararlanılarak hesaplanır. Geçirgenlik numuneden geçen ışığın, numuneye gelen ışığa oranıdır (Skoog ve ark. s.139):

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Absorptans ise numuneye gelen ışığın, numuneden geçen ışığa oranının logaritması alınarak hesaplanır:

$$A = \log \frac{P_0}{P}$$

Spektrofotometrik ölçümlerde kantitatif tayin için kullanılan Beer yasası, absorptansın, numunenin absorpsiyon katsayısı (k), ışığın numune içinde aldığı yol (b) ve numune konsantrasyonu (c) ile doğru orantılı olduğunu söylemektedir:

$$A = kbc$$

Işığı absorplayabilen türler için bu denklem uygulanabilirken, aminoglikozidler gibi UV-GB'de ışığı absorplayabilecek kromofor grupları bulunmayan türler için bu yolla tayin yapmak mümkün değildir. Geliştirdiğimiz spektrofotometrik yöntemde, AgNP'lerin UV-GB'deki absorpsiyon ve saçılmadan kaynaklanan spektrumunda aminoglikozidlerle etkileşimi sonrası oluşan pik şiddetindeki değişimlerden yararlanılmıştır.

2.2.1.2. Etken maddelerin saflık kontrolleri

Deneylere başlamadan önce AMİ, GEN ve TOB'un saflık kontrolleri yapılmıştır. Bunun için IR spektrumları ve erime noktası tayin belirlenerek referanslarla karşılaştırılmıştır.

2.2.1.3. Gümüş nanoparçacık (AgNP) sentezi

AgNP sentezi için Song ve ark.nın (2009) geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem aşağıdan yukarıya bir sentezleme metodu olup AgNO_3 'ın NaBH_4 ile indirgenmesi ve SDS ile oluşan kolloidlerin stabilize edilmesine dayanır. Bu yöntemde 3,8 mg NaBH_4 ve 8,5 mg SDS 50 mL saf suda çözülüp 30 dakika boyunca karıştırılmaya bırakılmıştır. Başka bir balon jode 1,7 mg AgNO_3 50 mL saf suda çözülmüştür. AgNO_3 çözeltisi bir büret yardımıyla hızlı bir şekilde karıştırılan NaBH_4 -SDS çözeltisine damla-damla eklenmiştir. Çözelti, AgNO_3 eklendikçe sararmaya başlamıştır, ekleme işlemi tamamlandıktan sonra 1 saat daha karıştırılmıştır.

2.2.1.4. AgNP'ların karakterizasyonları

Hazırlanan AgNP'ların karakterizasyonu UV-GB spektrofotometresi ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak yapılmıştır.

2.2.1.4.1. AgNP'ların UV-GB ile karakterizasyonları

UV-GB spektrofotometresindeki ölçümlerde AgNP çözeltileri kuartz küvetlere alınarak suya karşı spektrumları alınmıştır.

2.2.1.4.2. AgNP'ların TEM ile karakterizasyonları

TEM görüntülemelerinde Ankara Üniversitesi Elektron Mikroskobu Birimi'nde bulunan FEI marka cihazın Tecnai G2 S-TWIN modeli kullanılmıştır. Cihazda 200 kV voltajda çalışılmıştır. Görüntüleme için 4 adet örnek hazırlanmıştır. Birinci örnek sadece AgNP çözeltisi, diğer üç örnek ise sırasıyla GEN, TOB ve AMI eklenmiş AgNP çözeltileridir. Bu örnekler sentilasyon cihazında 5 dakika bekletildikten sonra karbon formvar kaplı 200 mesh'lik bakır gridlere dökülmüştür. Ardından kurumaya bırakılan örnekler 1 gün sonra ölçüme alınmıştır. Parçacıkların boyutunun ölçümü için ayrıca

1/20 oranında seyreltilen AgNP çözeltileri dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle ölçülmüştür.

2.2.1.5. Yöntem optimizasyonu için yapılan çalışmalar

Deneylerde bazı parametrelerin dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir. AgNP'ların spektrumları nanoparçacıkların büyüklüğüne, şekline, ortamın bileşimine ve agregasyon seviyesine bağlıdır. Aminoglikozidlerin eklendiğinde AgNP'ların agregasyon seviyesi zamana bağımlı olarak değişmektedir. Bu nedenle aminoglikozidler AgNP çözeltilerine eklendikten sonra bir süre spektrumda değişimler izlenmiştir.

Zaman dışında, ortamın pH'ı ve iyonik şiddet de optimize edilmiştir. Bu amaçla değişik pH'lardaki tamponlar 25 mM NaH₂PO₄ ile hazırlanmıştır. Bu tamponun pH'ı 100 mM H₃PO₄ veya 100 mM NaOH kullanılarak istenilen pH'lara ayarlanmıştır. Hazırlanan pH'larda numunelerden farklı olarak sadece etken madde içermeyen kör çözeltilerle numuneler arasındaki 394 nm'deki ΔA'lar (absorbans farkı) ölçülmüştür. ΔA'ları en yüksek tutacak pH'lar en uygun değerler olarak seçilmiştir. Çünkü ΔA'nın yüksek olması yöntem için duyarlılığın artması anlamına gelmektedir.

Aynı şekilde belirlenen pH'larda ortama 100 mM NaCl'den değişik miktarlarda eklenerek iyonik şiddet için en uygun değerler belirlenmiştir.

2.2.1.6. Yöntem validasyonu için yapılan çalışmalar

Metot optimizasyonu deneylerinden sonra, belirlenen şartlarda tayin çalışmalarına başlanmıştır. Optimum pH ve iyonik şiddetlerde AMİ için 60-100 ng/mL; GEN için 20-60 ng/mL ve TOB için 22,5-60 ng/mL aralıklarında üç set halinde çözeltiler hazırlanmıştır. Deney tüplerine alınan 3 mL AgNP çözeltisi üzerine bu çözeltilerden 1 mL eklenmiş ve vorteks karıştırıcıda 20 saniye süreyle karıştırılmıştır. Her bir aminoglikozid için belirlenen sürede beklendikten sonra, 200-800 nm arası

spektrumları çizdirilmiştir. Üçer set halinde hazırlanan bu çözeltilerin 394 nm'deki absorbansları, kör çözeltilerin absorbanslarından çıkarılarak ΔA değerleri elde edilmiştir. Konsantrasyona karşı ΔA grafiklerinden kalibrasyon doğrusunun denklemleri ve korelasyon katsayıları belirlenmiştir. Kalibrasyon denklemlerinin eğim ve kesim değerlerinin standart sapmaları ve ortalamaları kullanılarak yakalama sınırları (YS) ve tayin alt sınırları (TAS) belirlenmiştir:

$$YS = 3\sigma / m$$

$$TAS = 10\sigma / m$$

Burada σ kesim değerlerinin standart sapması, m ise kalibrasyon denklemlerinin eğimidir.

Yöntemin doğruluk ve kesinliğini sınamak için standart maddeler kullanılarak üçer set halinde AMİ (70; 80; 90 ng/mL), GEN (30; 40; 50 ng/mL) ve TOB (35; 42; 55 ng/mL) çözeltileri hazırlanmış ve üç gün boyunca analiz edilerek, sonuçları değerlendirilmiştir. Günler arası deneylerinde deney tüpleri ultrasonik banyoda 5 dakika bekletildikten sonra ölçümler alınmıştır. Bu veriler kullanılarak bağıl hata değerleri şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Bağıl hata} = 100 \times \frac{(\text{bulunan} - \text{konulan})}{\text{konulan}}$$

Dayanıklılık, metodun parametrelerdeki küçük ama anlamlı değişimler karşısında etkilenmeden kalmasını ve güvenilir sonuçlar vermesini ifade eder (ICH Guidelines, 1994). Dayanıklılık testleri için öncelikle deneye etki eden faktörler belirlenmiş, ardından bu faktörlerin belirsizlik değerleri hesaplanmıştır. Bu belirsizlik değerleri ilaç analizlerinde genellikle kullanılan katsayı olan "5" ile çarpılarak faktörlerin seviyeleri belirlenmiştir (Heyden ve ark., 2001) Bu metodun dayanıklılığını test etmek için pH, iyonik şiddet ve zaman faktörlerindeki küçük değişikliklerin sonuçlara etkisi incelenmiştir. pH ve iyonik şiddet için dayanıklılık testlerinde, cihazların ve kullanılan

diğer malzemelerin kalibrasyon sertifikalarından elde edilen belirsizlik değeri kullanılmıştır. Kullanılan Metler-Toledo WTW model pHmetrenin belirsizlik değeri $pH \pm 0,01$ olarak verilmiştir. İyonik şiddet için ise kullanılan mikropipetlerin, balon jocular ve hassas terazinin belirsizlik değeri hesaplanarak dayanıklılık testlerinin seviyeleri belirlenmiştir. Birden fazla belirsizlik kaynağının olduğu bu gibi durumlarda öncelikle relatif belirsizlikler hesaplanır ve bu relatif belirsizliklerin toplamından hareketle toplam belirsizliğe geçiş yapılır (Heyden ve ark., 2001). 500 mL 3,65 mg/mL (0,1 M) NaCl konsantrasyonu için belirsizlik hesaplanırken:

Terazi için sertifikasında belirtilen belirsizlik değeri 0,1 mg'dır. Dolayısıyla tartım için relatif belirsizlik:

$$0,1/3650 = 2,74 \times 10^{-5}$$

Kullanılan 500 mL'lik balon jocularden gelen belirsizlik 0,25 mL olarak belirtilmiştir. Relatif belirsizlik:

$$0,25/500 = 5,00 \times 10^{-4}$$

Seyreltmelerde kullanılan mikropipetin belirsizliği sertifikasında %0,4 olarak belirtilmiştir. Yani relatif belirsizliği 4×10^{-3} 'dür.

Toplam relatif belirsizlik: $0,00003 + 0,0005 + 0,004 = 0,00453$

$$\%0,453$$

Optimum NaCl konsantrasyonunun 5,0 mM olarak belirlendiği Gen ve TOB çalışmalarında belirsizlik:

$$5,0 \times 0,453 / 100 = 0,02 \text{ mM olacaktır.}$$

Bu değer dayanıklılık testlerinde varsayılan değer olan 5 ile çarpıldığında elde edilen değer olan $\pm 0,1$ mM seviyelerinde yöntemin dayanıklılığı test edilmiştir.

Optimum NaCl konsantrasyonunun 2,5 mM olarak belirlendiği AMİ için yapılan çalışmalarda ise belirsizlik:

$$2,5 \times 0,453 / 100 = 0,01 \text{ mM olacaktır.}$$

Aynı şekilde elde edilen değer 5 ile çarpılarak $\pm 0,05$ mM seviyelerinde yöntemin dayanıklılığı test edilmiştir.

Zaman için ise kullanılan saatin belirsizliği bilinmediği için ± 1 dakikada yapılan ölçümlerin sonuçlara etkisi gözlemlenmiştir.

İlaç uygulamasına geçilmeden önce, validasyon parametrelerinden seçicilik deneyleri yapılmıştır. İlaç yardımcı maddelerinin yönteme etkisini incelemek standart ekleme yöntemi uygulanmıştır. Standart ekleme yönteminin dışında elde edilebilen yardımcı maddelerin zelteleri hazırlanmış ve AgNP çözeltisine eklenerek etkileri incelenmiştir. Bu yardımcı maddeler metil-*p*-hidroksibenzoat, propil-*p*-hidroksibenzoat, gliserin, betametazon dipropiyonat, klorbutanol, sodyum benzoat ve EDTA'dır. Standart ekleme yönteminde ilaçlara, içeriğinin % 50, 75 ve 100' kadar etken maddelerden eklendikten sonra analizleri gerçekleştirilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanarak yardımcı maddelerin etkisi incelenmiştir.

Seçicilik çalışmalarından sonra yöntem merhem ve jellere uygulanmıştır. Aminoglikozidler hidrofilik yapıda olmaları nedeniyle merhem ve jellerden sulu faza kolaylıkla alınabilmektedirler. Jel ve merhem zelteleri uygun miktarlarda tartımlar

yapıldıktan sonra etken maddelerin tampon çözeltilere alınmasının ardından analiz edilmişlerdir.

Elde edilen sonuçların hesaplamalarında standart sapma (SS), bağıl standart sapma (BSS), bağıl hatanın yanı sıra güven aralıkları da (GA) hesaplanmıştır. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$GA = \frac{t.s}{\sqrt{N}}$$

Burada N deney sayısı, s standart sapma, t ise p=0,05'de t tablosundan elde edilen değerdir.

2.2.1.7. Yöntemin süt analizlerinde kullanımı için yapılan çalışmalar

Süt uygulamalarına geçmeden önce aminoglikozidlere benzer yapıda olan ve sütte bulunan laktozun metoda etkisi incelenmiştir. Hazırlanan laktoz çözeltisinden 1 mL alınıp, 3 mL AgNP çözeltisine eklenmiştir. Bu çözeltisinin spektrumu, kör çözeltisinin spektrumu ile karşılaştırılmıştır.

Süt numunelerinin hazırlanmasında, proteinler ve yağlardan arındırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada proteinlerden ve yağlardan arındırmak için, 2 mL'lik süt numunesi üzerine 1 mL trikloroasetik asit (%1 a/h) çözeltisi ve 0,5 mL kloroform eklenmiştir. Deney tüpleri daha sonra 10 dakika süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Ardından proteinlerin ve yağların etkili bir şekilde çöktürülebilmesi için, numuneler +4°C'de 13000 rpm hızda 25 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından süzüntüde kalan yağların ayrılması işlemine geçilmiştir. Bu işlem dikkatlice yapılmalıdır, çünkü ortamda bulunan yağlar çözeltilerin bulanıklaşmasına ve spektrumlara etki etmesine neden olabilmektedir. Ayrıca sütteki yağların varlığında aminoglikozidler AgNP ile etkileşmemekte, sarı renkli çözelti rengini korumakta ve bulanıklaşmaktadır. Bu nedenle önceki santrifüj işlemine ek olarak 0,25 mL NaOH (1 N) eklenerek 5 dakika beklenmiştir. Ardından oda sıcaklığında 5000 rpm'de 10 dakika

daha santrifüj edilen örnekler membran filtrelerden (0,22 µm) süzülerek etkili bir şekilde yağlarından ayrılmıştır.

Bu son çözeltilerin pH'ı her bir aminoglikozid için en uygun değerlere H₃PO₄ (1 M) ile ayarlandıktan sonra NaCl (0,1 M) ile iyonik şiddetleri ayarlanmıştır. Bu çözeltilerden alınan 1 mL'lik kısım 3 mL AgNP çözeltisine eklenmiş ve her bir aminoglikozid için belirlenen sürede beklendikten sonra spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır.

2.2.2. Spektroflorimetrik çalışmalar

2.2.2.1. Giriş

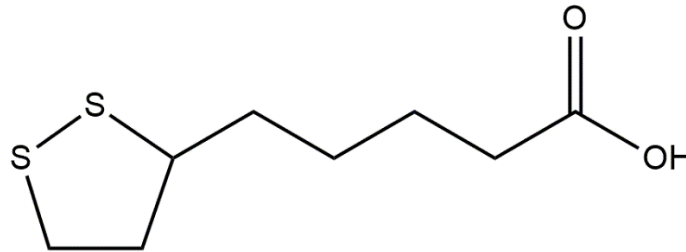
Floresansda normalde işleyen süreç, floresans özelliği gösteren molekülün enerjisi absorblayarak elektronun üst enerji seviyelerine geçmesi ve ardından bazı ışımaz durulmalar da dahil olmak üzere, kazandığı bu enerjisi ışık olarak yayarak kaybetmesidir. Floresansta enerji absorplandığında elektronlar eşleşmiş elektronik halde yani singlet halinde bulunurlarken fosforesansta triplet halde bulunurlar. Floresansta absorplanan ışığın dalga boyundan daha büyük dalga boylarında ışık yayılır, çünkü ışımaz durulmalar adı verilen bazı enerji kayıpları yaşanır. Bu ışımaz durulmalar, sistemler arası geçiş, iç dönüşüm, dış dönüşüm ve titreşimsel durulma gibi olaylardır ve floresansın verimini düşürürler.

Sönümlenme işlemleri, statik sönümlenme, dinamik sönümlenme ve rezonans enerji transferidir.

Tez çalışması kapsamında aminoglikozidlerin spektroflorimetrik tayinleri için ilk strateji olarak, aminoglikozidlerin lantanitlerle yaptıkları komplekslerin floresans emisyonları üzerinden tayin yöntemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Ancak yapılan çeşitli denemeler sonucunda, Rizk ve ark.nın (1995) iddialarının aksine aminoglikozidlerin lantanitlerle yaptıkları komplekslerin, lantanitlerin

floresanslarında artışa yol açmadığı deneysel olarak belirlenmiştir. Ayrıca Gilmartin ve ark.nın (2000) çalışmaları da elde ettiğimiz bu sonuçları doğrulamaktadır. Lantanitlerin floresans emisyonundaki küçük artışın nedeni aminoglikozidlere bağlı olan sülfattan kaynaklanmaktadır. Bu sonuçlar nedeniyle lantanitlerin doğrudan aminoglikozidlerle oluşturacağı kompleksinin floresansının altın nanoparçacıklarla güçlendirilmesinden vazgeçilmiştir. Bunun yerine denenen *o*-fitaldialdehit ile aminoglikozidlerin kompleksinin sinyal güçlendirilmesinden de tatmin edici sonuçlar alınamamıştır.

Bütün bunların yerine başka bir strateji olarak öropyumu nanoparçacıkları (EuNP) halinde sentezlendikten sonra aminoglikozidlere bağlanabilecek bir molekül ile modifiye edilmesi planlanmıştır. Böylece zaten spektroskopik yöntemler arasında seçiciliği daha yüksek bir yöntem olan spektrofotometrinin seçiciliği, bu molekül ile artırılmış olacaktır. Bu amaç için molekül yapısı (Şekil 2.1) gözününe alınarak lipoik asit tercih edilmiştir. Lipoik asit, sülfür grupları üzerinden sentezlenen EuNP'a bağlanırken, karboksil üzerinden de aminoglikozidlerin amin grupları ile etkileşime girmeye uygundur.



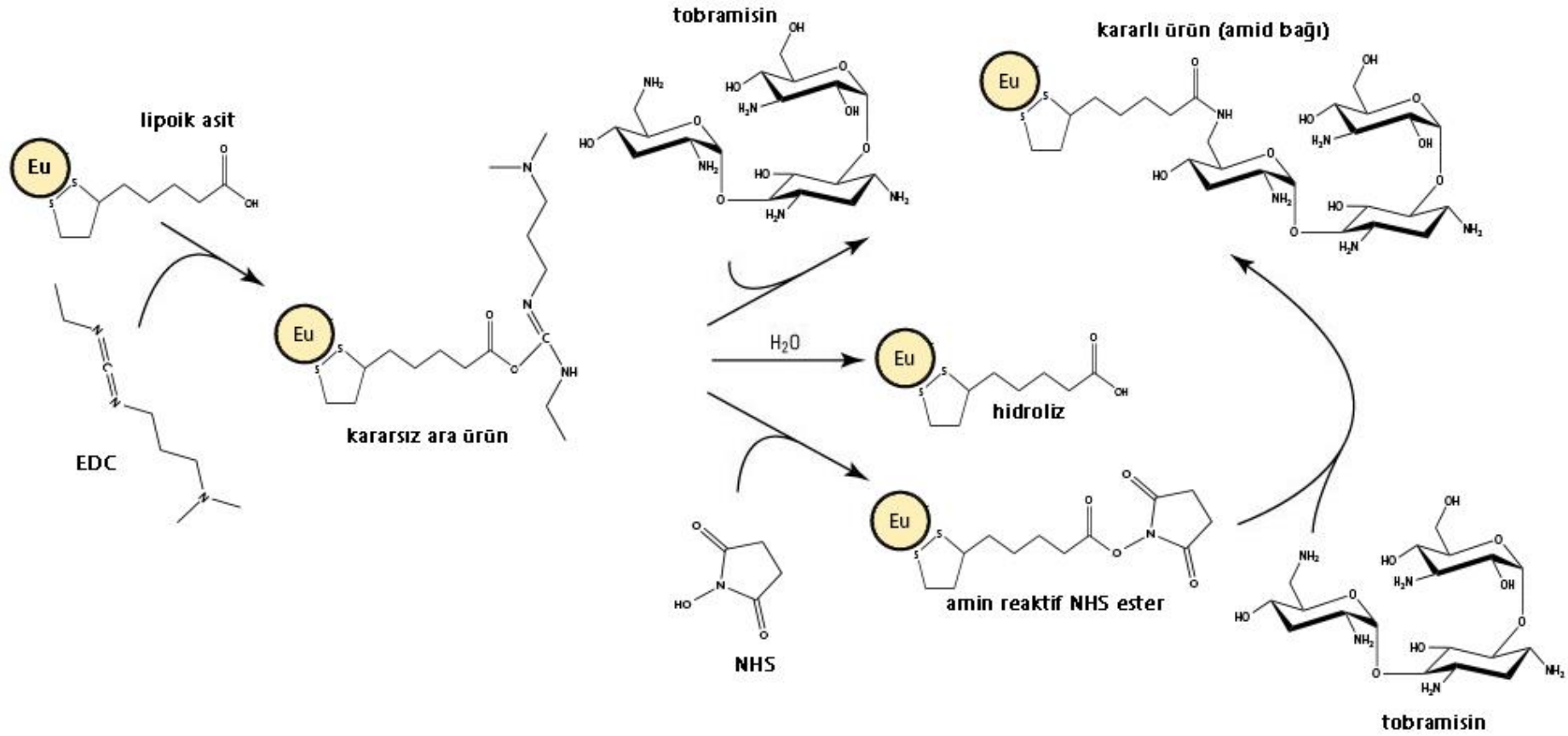
Şekil 2.1. Lipoik asit

2.2.2.2. Öropyum nanoparçacıklarının sentezi

EuNP sentezinde Gao ve ark.larının (2007) geliştirdikleri yöntem küçük değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Yöntemde yüzey aktif madde olarak kullanılan sodyum dodesilbenzen sülfonat yerine SDS kullanılmıştır. Öropyum'un nitrat tuzu yerine ise klorür tuzu kullanılmıştır. Sentezleme şu şekilde yapılmıştır:

İndirgen olarak kullanılan tannik asitin 13 mg'ı 50 mL saf suda çözüldükten sonra 30 °C'lik su banyosuna alınmıştır. Bu çözelti hızlıca karıştırılırken üzerine 0,01 M EuCl_3 çözeltisinden 5 mL ve 5.0×10^{-5} M SDS çözeltisinden 3,75 mL eklenmiştir. Ardından modifikasyon yapıcı ajan olarak etanol içerisinde hazırlanmış 0,01 M lipoik asitten 2 mL eklendikten sonra su banyosunda 30 dakika boyunca karıştırılmaya bırakılmıştır. 30 dakika karıştırma sonunda oda sıcaklığına soğutulmuş ve 250 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

Sensör mekanizmasının temeli; lipoik asidin karboksil gruplarının, aminoglikozidlerin amin gruplarıyla reaksiyona girerek amid oluşması ve bu reaksiyonun EuNP'ların floresansında değişimlere yol açmasına dayanmaktadır. Ancak bu amid bağlarının oluşumu için öncelikle karboksil grubunun aktive edilmesi gerekmektedir. Çünkü karboksil grubu ile amin grubunun reaksiyona girip amid bağını oluşturabilmesi oda sıcaklığında kendiliğinden gerçekleşen bir reaksiyon değildir (Valeur ve Bradley, 2009). Su molekülünün eliminasyonunu gerektiren bu reaksiyon ancak 200 °C gibi çok yüksek sıcaklıklarda gerçekleşebilir (Jursic ve Zdravkovski, 1993). Bu yüksek sıcaklıklar ise reaksiyona giren türlerin yapılarının bozulmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle genellikle bağlama ajanlarına ihtiyaç duyulur. Karboksil bağlayıcı reaktif olarak çalışmamızda 0,1 M EDC ve 0,1 M NHS kullanılmıştır (Şekil 2.2). EDC, amid bağının oluşması için karboksil grubunu aktif hale getirirken, NHS ise oluşan amid bağının kararlı olmasını sağlar (Staros ve ark, 1986; Grabarek ve Gergely1990).



Şekil 2.2. Öropyum nanoparçacık üzerindeki lipoik asitin EDC/NHS reaktifleri ile aktifleştirilmesi ve ardından tobramisin ile reaksiyonunun şematik gösterimi

2.2.2.3.Floresans sönümlenmesi çalışmaları

Aminoglikozid numuneleri, hazırlanan EuNP'lere eklendiğinde emisyon sinyallerinde azalma gözlemlenmiştir. Numunelerin floresans şiddetinde azalmaya neden olan işlemlere *floresans sönümlenmesi* adı verilir. Uyarılmış hal reaksiyonları, moleküler yer değiştirme enerji transferi, temel-hal kompleks oluşumu ve çarpışma gibi moleküler etkileşimler sönümlenmeye neden olabilirler. Sönümlenme, çarpışmadan kaynaklanan dinamik sönümlenme ve floresans yapan tür ile sönümleyen arasındaki reaksiyondan kaynaklanan statik sönümlenme olarak ikiye ayrılır. Hem statik hem de dinamik sönümlenme moleküler teması ihtiyaç duymaktadırlar. (Lakowicz, 2006 s.:277)

Sönümlenme türü Stern-Volmer eşitliği kullanılarak aydınlatılabilir (Valeur, 2002):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 C_Q = 1 + K_{sv} C_Q$$

Burada F_0 ve F sönümleyicinin yokluğunda ve varlığındaki floresans şiddeti, k_q bimoleküler sönümlenme sabiti, τ_0 sönümleyicinin yokluğunda floroforun ömrüdür. C_Q ise sönümleyicinin konsantrasyonudur. Genellikle sönümlenme verileri F_0/F 'e karşı C_Q grafiği çizilerek gösterilir ve K_{sv} bu grafiğin eğimidir. Ancak statik ve dinamik sönümlenme sadece bu grafikten belirlenemez. Sıcaklık, viskozite veya floresans ömrü ölçümleri ile de sönümlenme türü belirlemek mümkündür (Lakowicz, 2006 s.:280). Bunun için farklı sıcaklıklarda yaptığımız deneylerde K_{sv} değerleri hesaplanmıştır. Bunun dışında EuNP ile aminoglikozidlerin etkileşiminin UV spektrumlarını inceleyerek de sönümlenmenin türü incelenmiştir.

Sönümlenme deneylerinde bazı etkenlere dikkat etmek gerekir. Öncelikle bu deneyler maksimum sönümlenme koşullarında çalışılmalı, çünkü emisyon sinyali düşük olduğunda ortamdaki zemin floresansı önemli olmaya başlar. Ayrıca Rayleigh ve Raman saçılımları sönümleyicinin konsantrasyonundan bağımsızdır ve saçılan

ışınların floresansa katkısı sönümlenmeyle birlikte artar. Sönümleyicinin absorbans spektrumu da dikkat edilmesi gereken faktörlerden biridir. İyonik şiddetin sönümlenme deneylerinde sabit tutulması önemlidir.(Lakowicz, 2006 s.:289)

Spektroflorimetrik deneylerde AMİ ve GEN öncelikle sülfattan arındırılmıştır. Bunun için 0,1 M HCl ile asitlendirilmiş ortamda 0,1 M BaCl₂ kullanılmıştır. Ba⁺² kasyonu asidik ortamda sadece sülfat anyonunu çöktürmektedir. Aşırısı eklenen Ba⁺² ile oluşan BaSO₄ süzülerek ortamdaki ayrılmıştır. Ardından çözelti 0,1 M NaOH kullanılarak nötrleştirilmiş ve tampon çözeltiler ile istenen pH'da tamponlanmıştır. TOB'in standartında sülfat tuzu olmadığı için herhangi bir işlem yapmadan doğrudan kullanılmıştır.

Spektroflorimetrik metot geliştirme aşamasında ilk önce en uygun uyarılma dalga boyu ve bu dalga boyuna ait emisyon spektrumları elde edildikten sonra fotoçoğaltıcı tüpün voltajı ve slit aralıkları optimize edilmiştir.

2.2.2.4.Yöntem optimizasyonu için yapılan çalışmalar

Miktar tayinlerinden önce metot optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir: Spektroflorimetrik deneylerde öncelikle floresans dalga boyları ve slitleri belirlenmiştir. Ardından tayin limitlerini en düşük tutacak şekilde metodun optimizasyonuna başlanmıştır.

2.2.2.4.1. pH optimizasyonu

pH taraması 0,5 birim aralıklarla; pH 2,5 – 7,5 arasında sitrik asit-fosfat tamponu kullanılarak, pH 8,0-10,0 aralığı ise borat tamponu kullanılarak yapılmıştır. pH 2,5-7,5 aralığındaki tamponlar 25 mM sitrik asit ve 50 mM Na₂HPO₄'ın değişik oranlarda karıştırılması ile elde edilmiştir. pH 8,0-10,0 bölgesi ise 25 mM H₃BO₃ pH'nın 100 mM NaOH kullanılarak ayarlanması ile hazırlanmıştır. Daha sonra floresans ölçümleri için her bir pH'da hazırlanan TOB numunelerinden alınan 0,5 mL'lik kısım,

2 mL EuNP çözeltisi üzerine eklenmiş ve emisyon spektrumları alınmıştır. Kör çözeltileri olarak ise aminoglikozid içermeyen tampon çözeltiler aynı oranlarda EuNP ile karıştırılarak ölçülmüştür.

2.2.2.4.2. İyonik şiddet optimizasyonu

pH optimizasyonunun ardından iyonik şiddet optimizasyonu yapılmıştır. İyonik şiddetin ayarlanması için NaCl kullanılmıştır. Belirlenen pH'larda değişen oranlarda NaCl eklenmiş (son konsantrasyon 0 - 2,5 M arası) ve floresans şiddeti farkı (ΔF) ölçülmüştür.

2.2.2.4.3. Altın nanoparçacık sentezi

Yöntemin duyarlılığını artırmak için sinyallerin metalle zenginleştirilmesi yoluna gidilmiştir. Metalle zenginleştirilmiş floresans çalışması için çeşitli boyutlarda ve şekillerde AuNP'lar hazırlanmıştır. Jana ve ark.larının (2001) geliştirdikleri yöntem, çekirdek çözeltisi hazırlandıktan sonra büyütme çözeltisi ile bu nanoparçacığın boyutunun ve şeklinin değiştirilmesine dayanır. Bu yöntemde öncelikle küçük metal parçacıklar (çekirdek) hazırlanır. Bu parçacıklar çekirdeklenme merkezi olarak işlev görür. Ardından büyütme çözeltisi kullanılarak daha büyük boyutlarda parçacıklar hazırlanır. İstenen nanoparçacık büyüklüğüne ve şekline bağlı olarak farklı miktarlarda büyütme çözeltisi ve çekirdek çözeltisi kullanılabilir. Büyütme çözeltisi yüksek miktarda stabilizör içerir. Bu sayede istenen büyüklükte sentezlenen nanoparçacıklar uzun süre topaklanma veya çökme göstermez ve kararlı kalırlar.

Sentez çalışmalarında öncelikle 3,5 nm'lik AuNP çekirdek çözeltisi hazırlanmıştır. Çekirdek çözeltisi için 20 mL $2,5 \times 10^{-4}$ M HAuCl_4 ve $2,5 \times 10^{-4}$ M trisodyum sitrat içeren sulu çözelti hazırlanmıştır. Bu çözelti karıştırılırken üzerine 0,6 mL taze ve çok soğuk suda hazırlanmış 0,1 M NaBH_4 eklenmiştir. NaBH_4 eklendiği an oluşan pembe renk 3,5 nm parçacık oluşumunun göstergesidir. Bu yöntem oda sıcaklığında gerçekleştirildiği için trisodyum sitrat sadece parçacığın yüzeyini kaplar,

indirgeyici ajan olarak NaBH_4 bulunur. Bu çekirdek çözeltisi hazırlandıktan sonra 2 ila 5 saat içerisinde kullanılmalıdır.

Büyütme çözeltisi için 200 mL $2,5 \times 10^{-4}$ M HAuCl_4 hazırlanmış ve üzerine 6 g CTAB eklenmiştir. Çözelti, CTAB çözününceye ve çözeltinin rengi berrak turuncu renge dönünceye kadar ısıtılmıştır. Ardından çözelti oda sıcaklığına soğutulup, büyütme çözeltisi olarak kullanılmıştır. Bu çözeltiler hazırlandıktan sonra aşağıdaki şekilde değişik boyutlarda parçacıklar hazırlanmıştır:

5,5 nm'lik AuNP: 7,5 mL büyütme çözeltisine 50 μL taze hazırlanmış askorbik asit (0,1 M) eklenmiş ve çözeltinin renginin kaybolduğu görülmüştür. Çözelti hızlıca karıştırılırken üzerine 2,5 mL çekirdek çözeltisinden eklenmiştir. Çözelti bir süre sonra şarap kırmızısı renge dönüşmüştür. Bu rengi aldıktan sonra çözelti 10 dakika daha karıştırılıp, küre şeklinde ve 5,5 nm boyutlarında AuNP elde edilmiştir.

8,0 nm'lik AuNP: 9,0 mL büyütme çözeltisine 50 μL taze hazırlanmış askorbik asit (0,1 M) çözeltisi eklenmiş ve çözeltinin renginin kaybolduğu görülmüştür. Çözelti hızlıca karıştırılırken üzerine 1,0 mL çekirdek çözeltisinden eklenmiştir. Çözelti bir süre sonra koyu kırmızı renge dönüşmüş ve 10 dakika daha karıştırılmıştır. 8,0 nm boyutlarındaki küre biçimindeki AuNP çözeltisi, daha sonra 17 nm'lik AuNP hazırlanırken çekirdek çözelti olarak da kullanılmıştır.

17 nm'lik AuNP: 9,0 mL büyütme çözeltisine 50 μL taze hazırlanmış askorbik asit (0,1 M) eklenmiş ve çözeltinin renginin kaybolduğu görülmüştür. Çözelti hızlıca karıştırılırken üzerine 1,0 mL 8,0 nm AuNP çözeltisinden eklenmiştir. Çözelti 10 dakika daha karıştırılıp ve rengin kırmızıya çalan kahverengi olduğu görülmüştür. Bu şekilde hazırlanan çözelti 17 nm'lik AuNP'tır ve bir sonraki çözelti için çekirdek çözeltisi olarak kullanılmıştır.

37 nm'lik küre ve 17-200 nm çubuk karışımı: 9,0 mL büyütme çözeltisine 50 μL taze hazırlanmış 0,1 M askorbik asit çözeltisi eklenmiştir. Renksiz hale gelen ve hızlıca

karıştırılan çözeltinin üzerine 1 mL 17 nm'lik AuNP çözeltisi eklenmiş ve 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen kahverengi çözelti 37 nm'lik küreler ve 17 nm en 200 nm boy ölçülerine sahip çubukların karışımıdır. Her bir çözelti CTAB stabilizörünün varlığında bir aydan daha uzun süre dayanmakta ve her bir çözelti $2,5 \times 10^{-4}$ M altın içermektedir.

Sentezleme aşamasından sonra sinyal güçlendirmesi için kullanılacak AuNP'lerin belirlenmesine geçilmiştir. Bunun için 0,5 mL AuNP çözeltileri deney ortamlarına eklendikten sonra floresans şiddeti ve ΔF üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sinyalleri en çok güçlendiren AuNP seçildikten sonra EuNP ile birlikte karakterizasyonu yapılmıştır.

Optimizasyon işleminin son aşaması olarak eklenen AuNP'lerin miktarları belirlenmiştir. Bunun için son hacim aynı olacak şekilde değişen oranlarda AuNP'lar deney tüplerine eklenmiş ve emisyon sinyalleri izlenmiştir. Emisyon sinyallerindeki güçlendirme, eklenen AuNP hacmine karşı grafiğe geçirilmiştir.

2.2.2.4.4. Öropyum ve altın nanoparçacıkların karakterizasyonları

Hazırlanan AuNP ve EuNP'lerin UV-GB spektrofotometresi ile spektrumları alınmıştır. Ayrıca optimizasyon aşaması sonrasında deneylerde kullanılması kararlaştırılan 37 nm'lik küre ve 17-200 nm çubuk karışımı AuNP ve EuNP'lerin TEM görüntülemesi Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndaki FEI Tecnai G² Spirit Bio (TWIN) yüksek kontrastlı TEM cihazında yapılmıştır. Numuneler bir gün öncesinden karbon kaplı bakır ızgaralarda (200 mesh) kurumaya bırakılmış ve 120 kV'da ölçümler alınmıştır.

2.2.2.5.Yöntem validasyonu için yapılan çalışmalar

Metot optimizasyonu deneylerinden sonra metodun geçerlilik testleri yapılmıştır. ICH kılavuzlarında (1994) ilaç analizleri için zorunlu parametrelerin yanında metodun

dayanıklılık çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda ICH kılavuzları temel alınmıştır. Optimum pH (5,00) ve iyonik şiddetlerde (2,5 M NaCl) AMİ için 0,75-27,5 µg/mL; GEN için 0,40-26 µg/mL ve TOB için 0,25-25 µg/mL aralıklarında üç set halinde çözeltiler hazırlanmıştır. Deney tüplerine alınan 1,5 mL AuNP çözeltisi üzerine bu çözeltilerden 0,5 mL eklenmiştir. Ardından 0,4 mL AuNP eklendikten sonra 280 nm’de uyarılan örneklerin emisyon spektrumları 290-800 nm aralığında alınmıştır. Üçer set halinde hazırlanan bu çözeltilerin 315 nm’deki sinyalleri izlenerek ΔF değerleri bulunmuştur. Konsantrasyona karşı ΔF grafikleri çizilerek kalibrasyon doğrusunun denklemleri ve korelasyon katsayıları belirlenmiştir. YS ve TAS değerleri Bölüm 2.2.1.5’de anlatıldığı gibi kalibrasyon denklemlerinin eğim ve kesim değerlerinin standart sapmaları ve ortalamaları kullanılarak hesaplanmıştır.

Metodun doğruluk ve kesinliğinin sınamak için standartlar kullanılarak üç set aminoglikozid örnekleri hazırlanmıştır (10, 15 ve 20 µg/mL) ve üç gün ölçülerek sonuçları değerlendirilmiştir.

Dayanıklılık testleri için öncelikle deneye etki eden faktör olarak pH belirlenmiştir. Kullanılan Metler-Toledo WTW model pHmetrenin belirsizlik değerleri $\pm 0,01$ olarak verilmiştir. Deneylede belirsizlik değeri 5 katsayısı ile çarpılarak belirlenen $\pm 0,05$ seviyelerde metod sınanmıştır. Aminoglikozidlerin optimum pH’ı olarak belirlenen 5,00 değerinden $\pm 0,05$ pH’lardaki tamponlar, sitrat ve fosfat tamponları kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu tamponlardan elde edilen sonuçlar metodun dayanıklılığı için değerlendirilmiştir.

Ardından metodun uygulama aşamasına geçilmiştir. Farmasötik formülasyonlarda bulunan yardımcı maddelerinin yöntem etkisini incelemek standart ekleme yöntemi uygulanmıştır. Standart ekleme yönteminde ise ilaçlara içeriğinin % 50, 75 ve 100’ü kadar etken maddelerden eklendikten sonra analizleri gerçekleştirilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanarak yardımcı maddelerin etkisi incelenmiştir.

Seçicilik çalışmalarında standart ekleme yöntemine ek olarak elde edilebilen yardımcı maddelerin ve bazı iyonların tolerans limitleri de hesaplanmıştır. Bunun için bu iyonların, örneklerin floresans sinyallerini $\pm\%5$ oranında değiştirdikleri konsantrasyonlar belirlenmiştir. Bazı iyonların yüksek konsantrasyonlarda dahi etkisi gözlenmediğinden bu iyonların tolerans limitleri çalışılabilen en yüksek konsantrasyondan da yüksektir şeklinde belirtilmiştir. Bazı yardımcı maddelerin ise sulu fazda çözünürlüğü oldukça düşüktür, bu yüzden bu maddelerin çözünürlüklerinin en üst değerlerindeki çözeltilerle deneyler gerçekleştirilmiş ve sonuçlar bu değerlere göre tablolştırılmıştır. Çözeltileri hazırlanan yardımcı maddeler ve iyonlar şunlardır: metil-*p*-hidroksibenzoat, propil-*p*-hidroksibenzoat, gliserin, betametazon dipropiyonat, klorbütanol, sodyum benzoat, K^+ , NO_3^- , NO_2^- , CH_3COO^- , CO_3^{2-} , Cl^- ve Na^+ .

2.2.2.6. Yöntemin süt analizlerinde kullanımı için yapılan çalışmalar

Süt uygulamalarına geçmeden önce aminoglikozidlere benzer yapıda olan ve sütte bulunan laktozun metoda etkisi incelenmiş ve tolerans değerleri belirlenmiştir. Süt numuneleri spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi hazırlanmıştır (Bölüm 2.2.1.6). Öncelikle sülfattan arındırılmış aminoglikozid eklenmiş sütlerin proteinler ve yağdan arındırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için 2 mL'lik süt numunesi üzerine 1 mL TCA (%1 a/h) çözeltisi ve 0,5 mL kloroform eklenmiştir. Tüpler daha sonra 10 dakika süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Ardından proteinlerin ve yağların etkili bir şekilde çöktürülebilmesi için, $+4^{\circ}C$ 'de 13000 rpm devirde 25 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından süzüntüde kalan yağların ayrılması işlemine geçilmiştir, çünkü ortamda bulunan yağlar çözeltilerin vizkositesinin değişmesine ve ışınların saçılmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle önceki santrifüj işlemine ek olarak 0,25 mL NaOH (1 N) eklenerek birkaç dakika beklenmiştir. Ardından oda sıcaklığında 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen örnekler membran filtrelerden (0,22 μm) süzülerek etkili bir şekilde yağlarından ayrılmıştır. Bu son çözeltiler 1 N HCl ile nötrale edildikten sonra pH'ları 2,5 M NaCl içeren sitrat-fosfat tamponu kullanılarak 5,00'e ayarlanmıştır. Konsantrasyonları her bir etken madde için 10, 15 ve 20 ppm olarak ayarlanan örneklerden alınan 0,5 mL'lik kısım 1,5 mL EuNP üzerine

eklenmiştir. Bu numuneler üzerine AuNP eklendikten sonra ölçümler yapılmıştır. Kör çözelti olarak ilaç eklenmemiş sütlere aynı işlemler yapılmıştır.

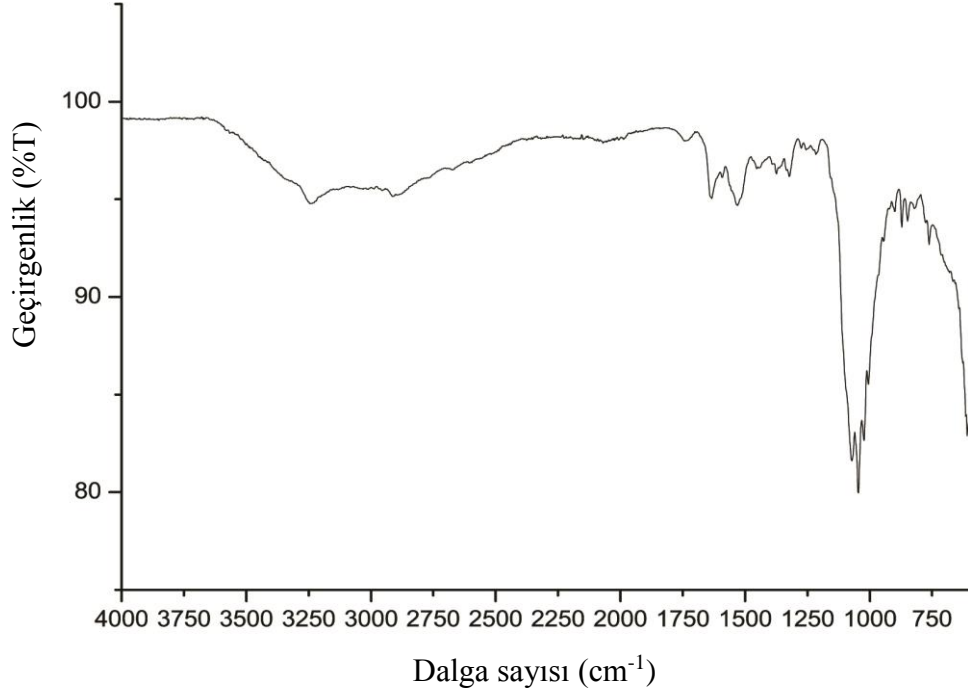
3. BULGULAR

3.1. Etken Maddelerin Kontrolleri

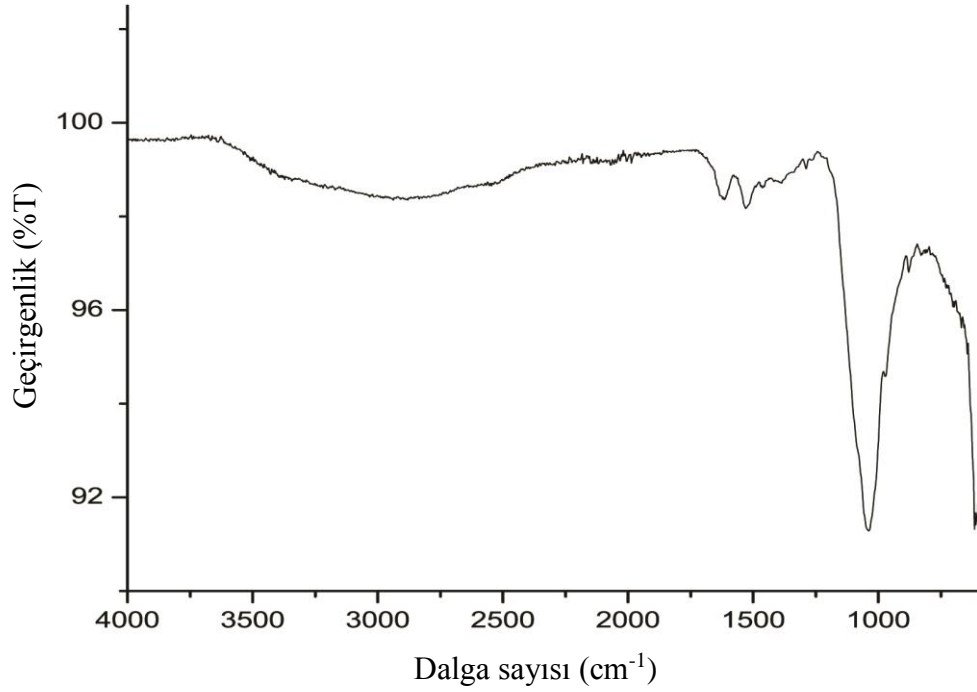
Gentamisin sülfat'ın kontrolü için erime noktası ölçülmüş ve 237 °C'de bozularak eridiği görülmüştür. Amikasin sülfat ise 228 °C'de bozularak erimiştir. TOB'in erime noktası 217 °C olarak tayin edilmiştir. Bu değerler referanslarla uyumludur (Merck Index, 2001).

AMİ'nin IR spektrumu (Şekil 3.1) Bio-Rad/Sadtler IR Data Collection (2014) ile karşılaştırılmış ve uyumlu olduğu görülmüştür. GEN'in IR spektrumu (Şekil 3.2) Thumer ve Patel'in (2011) çalışmasıyla uyumludur. TOB'in IR spektrumu (Şekil 3.3) Japon Ulusal İleri Endüstriyel Bilim ve Teknoloji Enstitüsü'nün (AIST, 2014) veritabanındaki IR spektrumları karşılaştırılmış ve uyumlu olduğu görülmüştür.

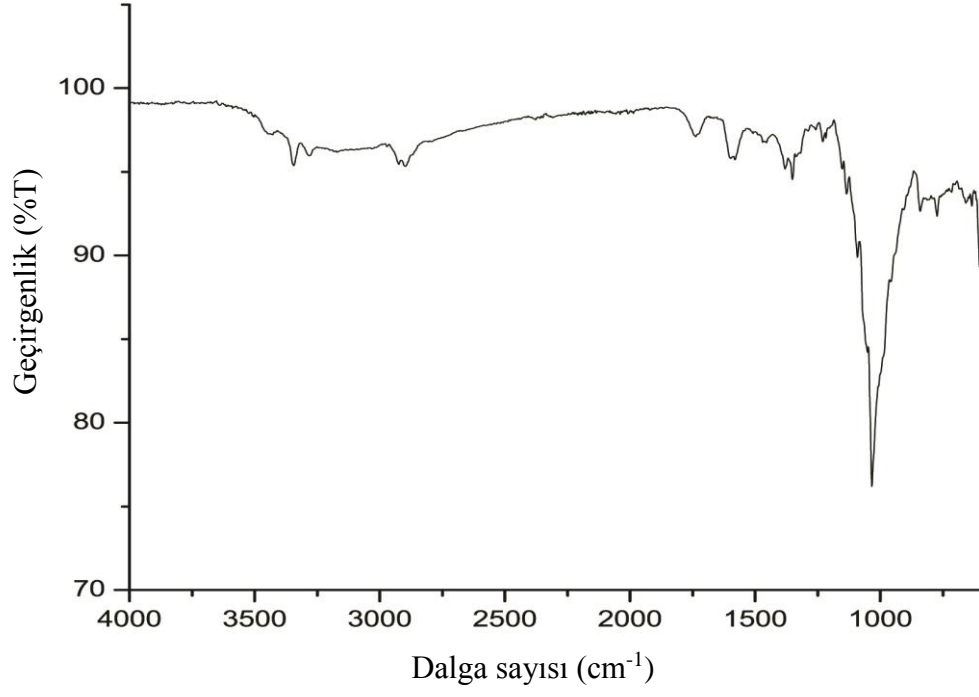
Elde edilen sonuçlara göre AMİ, GEN ve TOB ayrıca herhangi bir saflaştırılmaya gerek duyulmadan olduğu gibi deneylerde kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Amikasinin IR spektrumu



Şekil 3.2. Gentamisinin IR spektrumu



Şekil 3.3. Tobramisinin IR spektrumu

3.2. Spektrofotometrik Çalışmalar

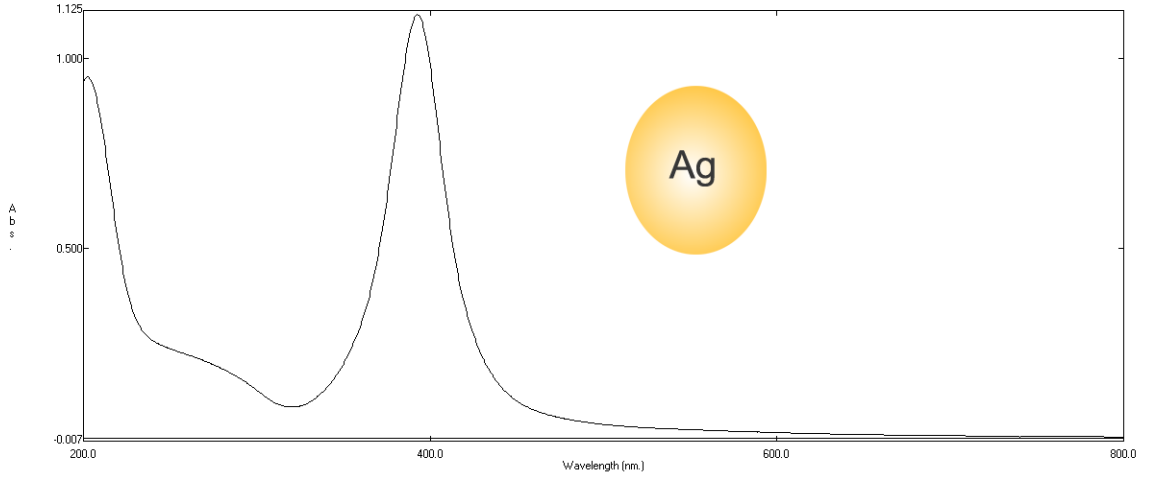
3.2.1. Gümüş Nanoparçacık Karakterizasyonu

Bölüm 2.2.1.2’de anlatıldığı şekilde sentezlenen AgNP’ların sarı renkli yüzey plazmon absorpsiyonu gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.4). Oluşan renk referans yöntemiyle (Song ve ark. 2009) uyumludur.



Şekil 3.4. Gümüş nanoparçacıklar

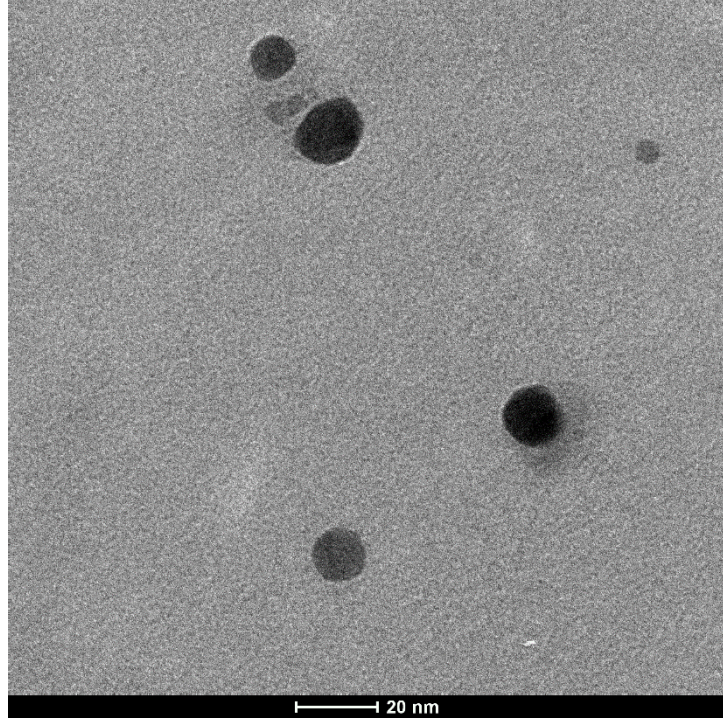
Sentezlenen AgNP’ların karakterizasyonu için UV-GB spektrofotometresi ve TEM görüntüleri kullanılmıştır. Hazırlanan AgNP çözeltisinin 200-800 nm aralığında absorpsiyon spektrumları alınmıştır (Şekil 3.5). Referans metotta belirtilen ve 394 nm’de görülen pik Şekil 3.5’deki sepktrumda görülmektedir.



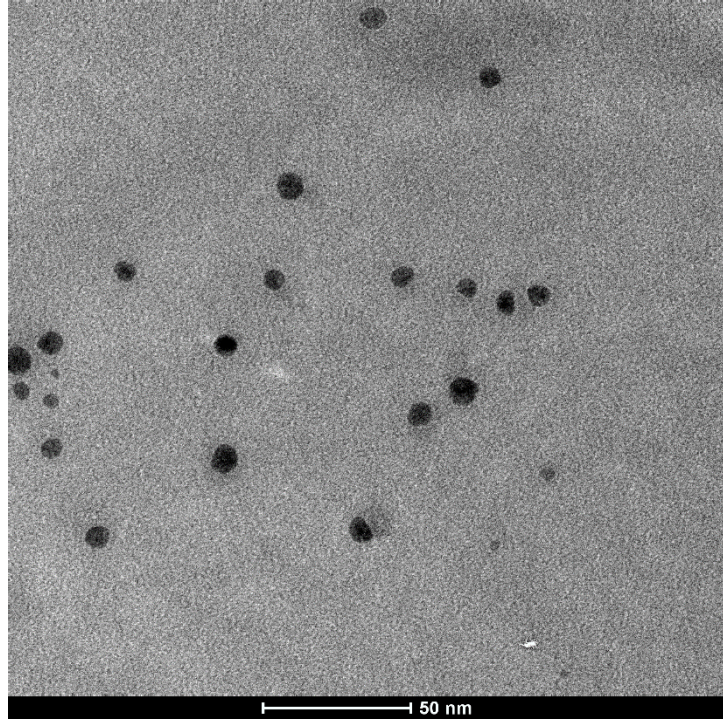
Şekil 3.5. Gümüş nanoparçacıkların 200—800 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumu

TEM görüntülemesi sonucunda hazırlanan AgNP'ların morfolojisi gözlemlenmiş ve aşağı yukarı küresel şekilde nanoparçacık elde edildiği sonucuna varılmıştır (Şekil 3.6.a ve b). Üzerine aminoglikozid eklenmiş nanoparçacıkların TEM görüntüleri ise Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9'da gösterilmiştir.

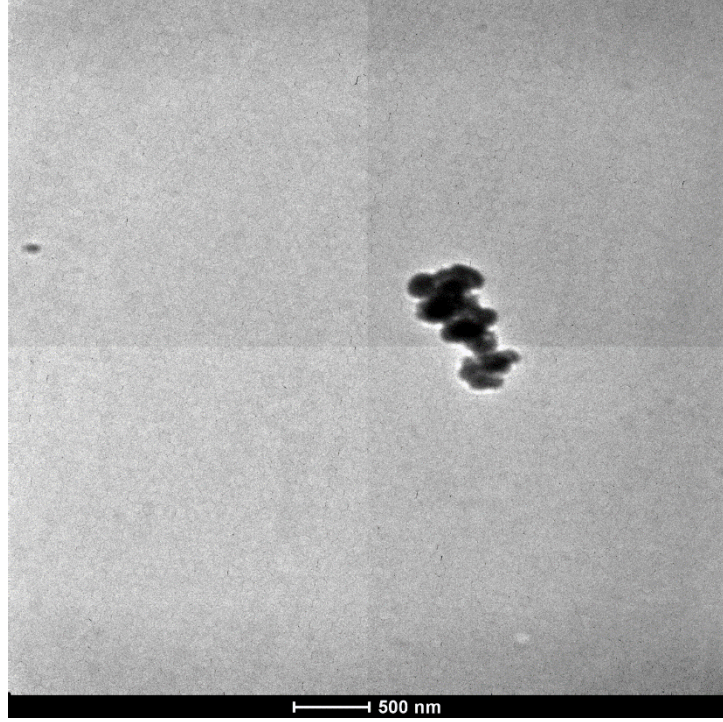
Aynı zamanda kesin veriler alınamamakla birlikte, DLS yöntemiyle parçacıkların boyutunun % 98 oranında 9-11 nm aralığında olduğu görülmüştür.



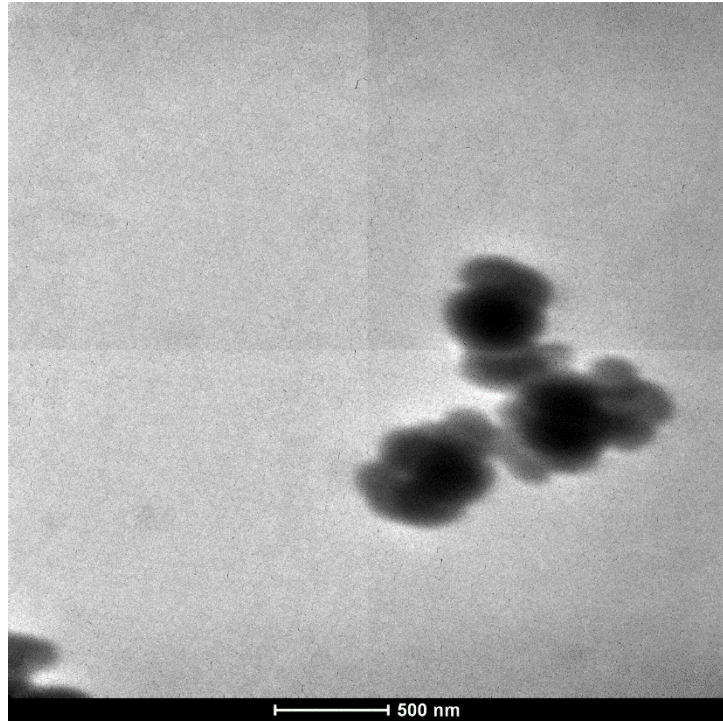
Şekil 3.6.a. Gümüş nanoparçacıkların TEM mikrografisi



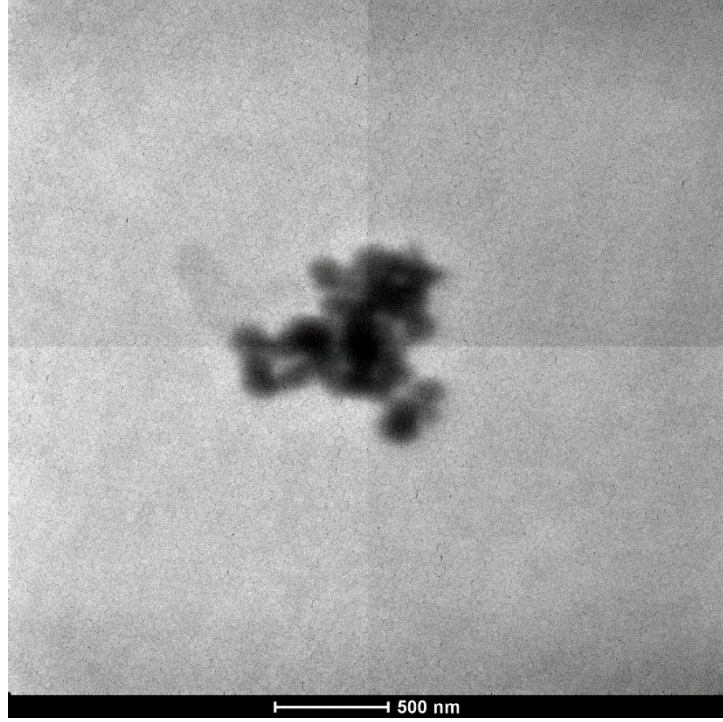
Şekil 3.6.b. Gümüş nanoparçacıkların TEM mikrografisi



Şekil 3.7. Gentamisin eklenmiş gümüş nanoparçacıkların TEM mikrografisi



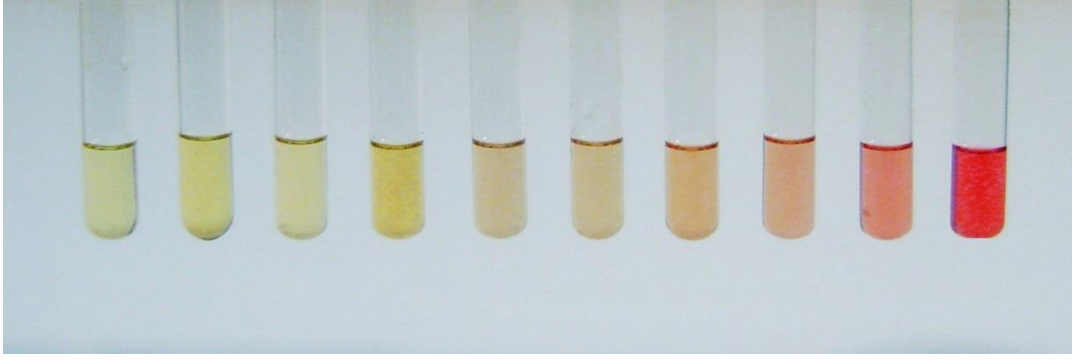
Şekil 3.8. Tobramisin eklenmiş gümüş nanoparçacıkların TEM mikrografisi



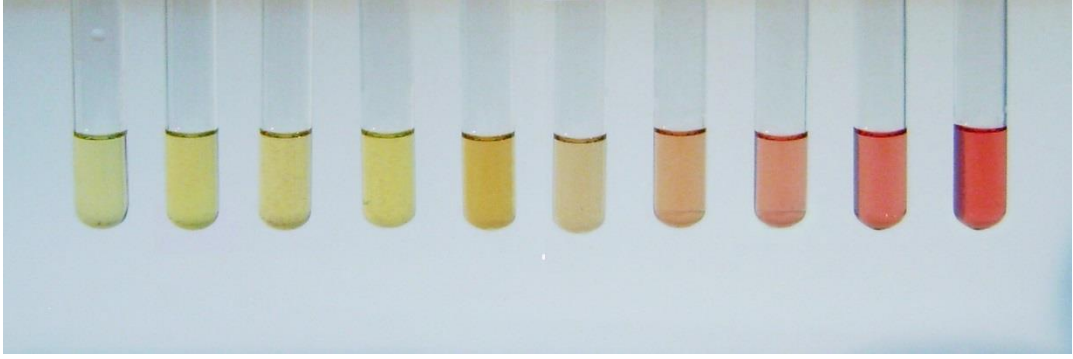
Şekil 3.9. Amikasin eklenmiş gümüş nanoparçacıkların TEM mikrofrafisi

3.2.2. AgNP ile GEN, AMİ ve TOB'un etkileşimi

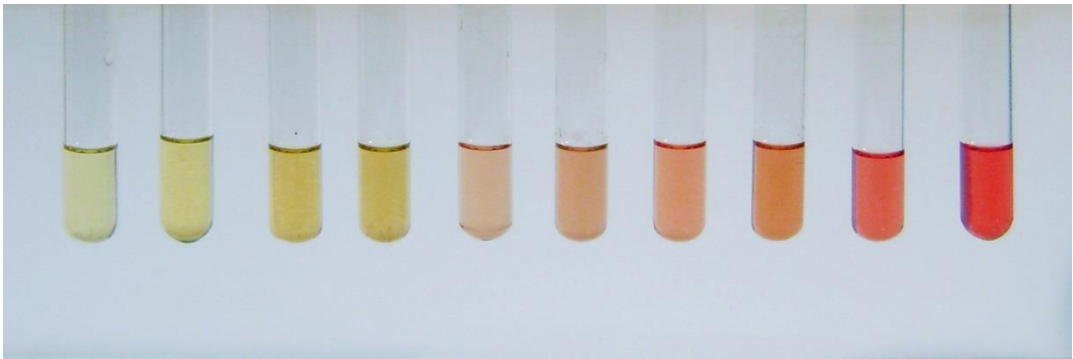
Sentezlenen modifiye edilmemiş AgNP çözeltileri üzerine saf suda hazırlanmış TOB, AMİ ve GEN çözeltileri eklendiğinde konsantrasyona bağlı olarak çözeltinin renginin değiştiği gözlenmiştir. Bu renk değişimi sarıdan turuncu ve kırmızıya doğru devam etmektedir (Şekil 3.10-3.12).



Şekil 3.10. Artan konsantrasyonlarda (0 – 2 $\mu\text{g/mL}$) tobramisin eklenmiş gümüş nanoparçacıklar.



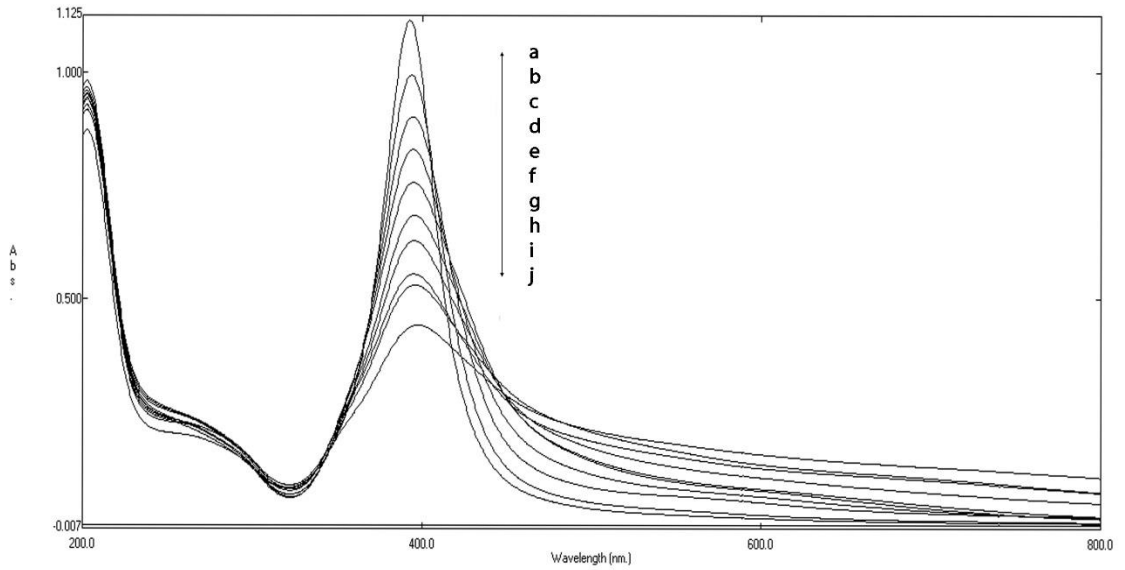
Şekil 3.11. Artan konsantrasyonlarda (0 – 2 $\mu\text{g/mL}$) amikasin eklenmiş gümüş nanoparçacıklar.



Şekil 3.12. Artan konsantrasyonlarda (0 – 2 $\mu\text{g/mL}$) gentamisin eklenmiş gümüş nanoparçacıklar.

3.2.3. Spektrofotometrik Metot Optimizasyonu Çalışmaları

AMİ, GEN ve TOB çözeltileri AgNP'lara eklendikten sonra gözlenen konsantrasyona bağlı renk değişimleri bizi, bu moleküllerin AgNP'ların UV-GB absorpsiyon spektrumunda konsantrasyona bağımlı olarak değişikliklere yol açtığı ve bu değişikliklerden kantitatif olarak yararlanılabileceği fikrine götürmüştür. Etken maddeler AgNP çözeltisine eklendiğinde, AgNP'ın 394 nm'deki spesifik pikinin absorbansında azalma, bu pikten daha uzun dalga boylarındaki absorbanslarda artış gözlenmektedir (Şekil 3.13). 394 nm'deki keskin pikte oluşan bu azalmanın (ΔA), aminoglikozidlerin belirli bir konsantrasyon aralığı için doğrusal olabileceği bulunmuş ve kantitatif olarak AMİ, GEN ve TOB analizinin bu yolla gerçekleştirilebilmesi için deney koşulları optimize edilmiştir.

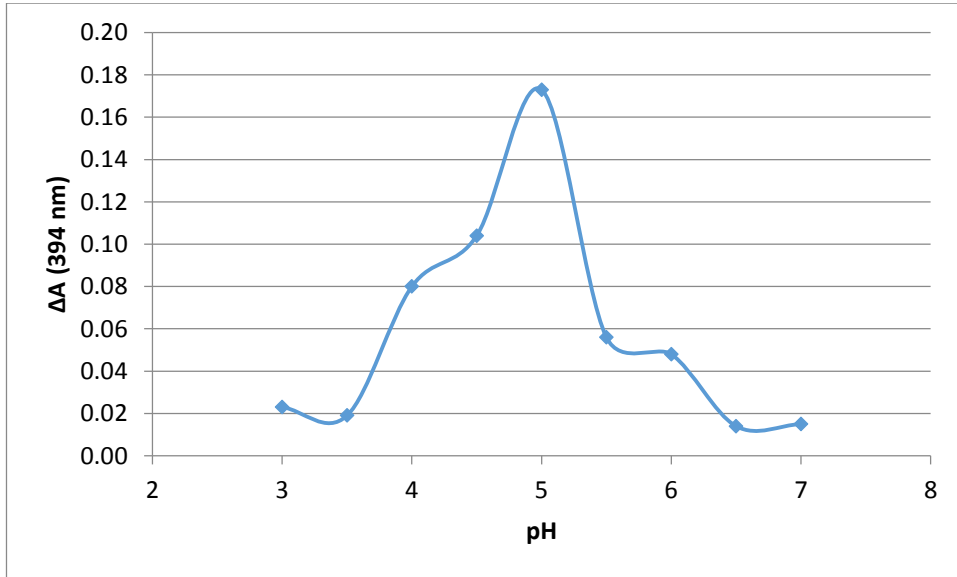


Şekil 3.13. Amikasin eklenmiş gümüş nanoparçacıkların 200-800 nm arasındaki absorpsiyon spektrumları [a)0 ng/mL, b)60 ng/mL, c)65 ng/mL, d)70 ng/mL, e)75 ng/mL, f) 80 ng/mL, g) 85 ng/mL, h) 90 ng/mL, i) 95 ng/mL, j)100 ng/mL]

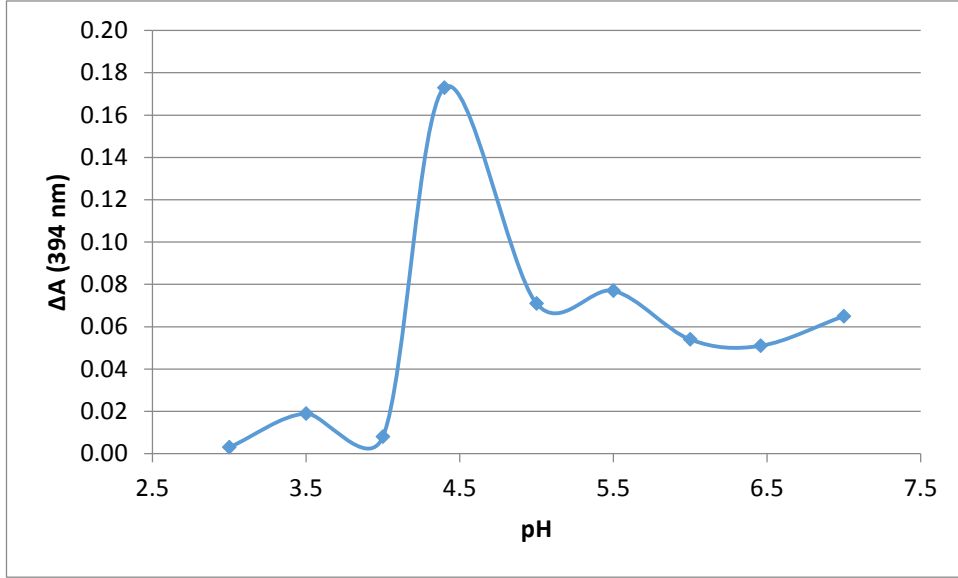
Metot optimizasyonu için deneyde etkili olan faktörler pH, tuz konsantrasyonu ve zamandır. Metot optimizasyonunda ΔA 'yı en yüksek tutacak değerler metodun tayin limitlerini düşüreceği için en uygun değerler olarak seçilmiştir.

3.2.3.1. pH Optimizasyonu

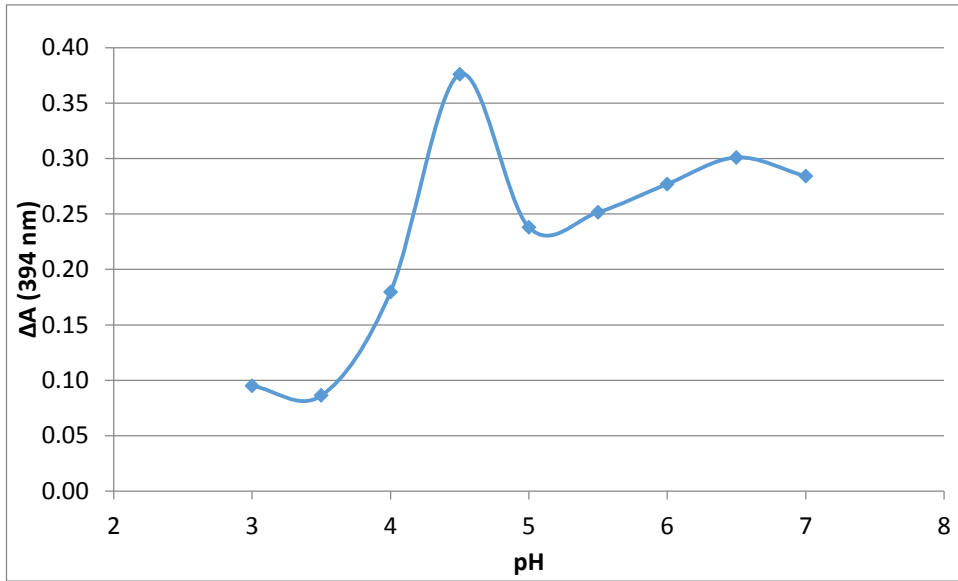
pH optimizasyonu çalışmaları için 25 mM NaH_2PO_4 çözeltisinin değişik pH'lardaki çözeltileri hazırlanmıştır. pH ayarlaması için 0.1 M NaOH ve 0.1 M H_3PO_4 çözeltileri ile yapılmıştır. Bu tampon çözeltiler içerisinde hazırlanan TOB, AMİ ve GEN çözeltilerinden 1 mL alınarak 3 mL AgNP çözeltisi içeren tüplere eklendikten hemen sonra bu çözeltilerin 200-800 nm aralığındaki spektrumları ölçülmüştür. Çözeltilerin konsantrasyonları TOB için 80 ng/mL, AMİ için 90 ng/mL ve GEN için 70 ng/mL olarak seçilmiştir. Kör çözeltisi her bir pH değeri için aminoglikozid içermeyen tampon çözeltilerden 1 mL alınıp 3 mL AgNP çözeltisine eklenerek hazırlanmış ve spektrumları alınmıştır. Her bir pH'daki kör çözeltilerin (3 mL AgNP + 1 mL tampon) 394 nm'deki absorbansından aminoglikozid eklenmiş AgNP çözeltisinin 394 nm'deki absorbansı çıkarılmıştır. ΔA 'yı en yüksek tutan pH değerleri en uygun değerler olarak seçilmiştir. Buna göre optimum pH olarak; AMİ için pH 5,00; TOB ve GEN için ise 4,50 değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.14-3.16).



Şekil 3.14. Amikasin (90 ng/mL) için pH'a karşı ΔA grafiği



Şekil 3.15. Gentamisin (70 ng/mL) için pH'a karşı ΔA grafiği

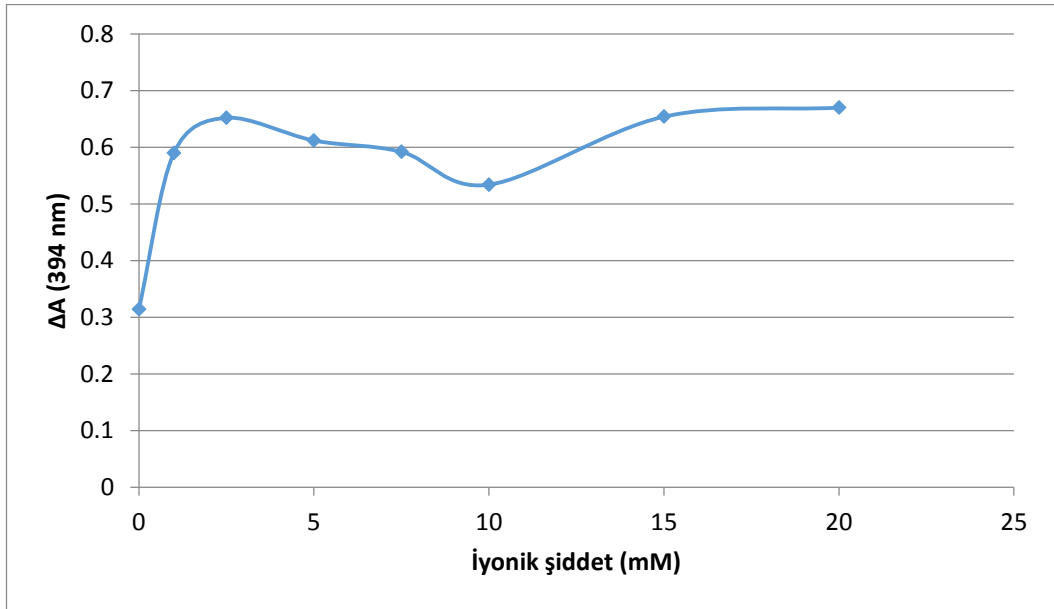


Şekil 3.16. Tobramisin (80 ng/mL) için pH'a karşı ΔA grafiği

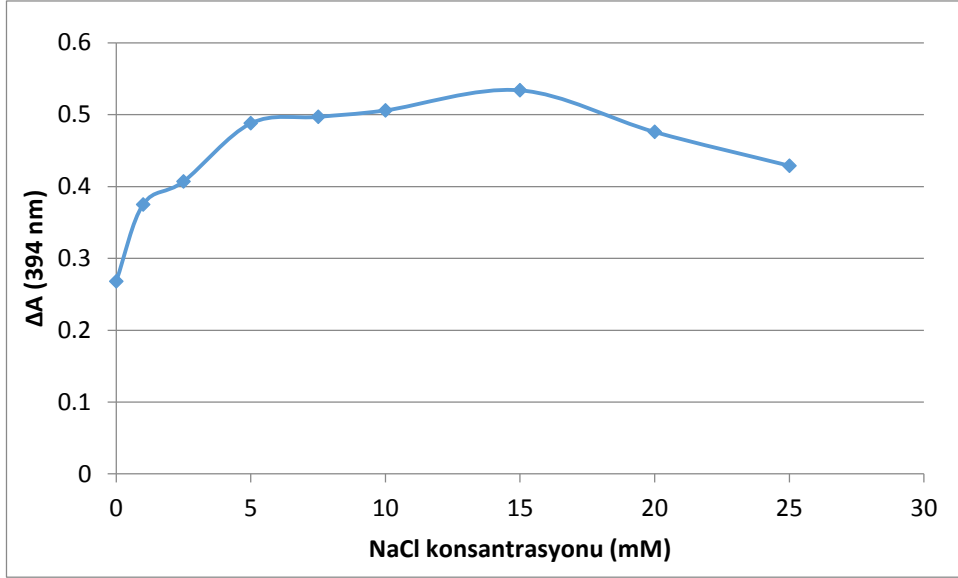
3.2.3.2. Tuz konsantrasyonu (iyonik şiddet)

Hazırlanan çözeltilerdeki iyonik şiddeti ayarlamak için 100 mM NaCl stok çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözeltiden alınan değişik miktarlardaki tuz çözeltisi 10 mL'lik balonjölere eklenmiştir. TOB için, üzerlerine konsantrasyonu 50 ng/mL

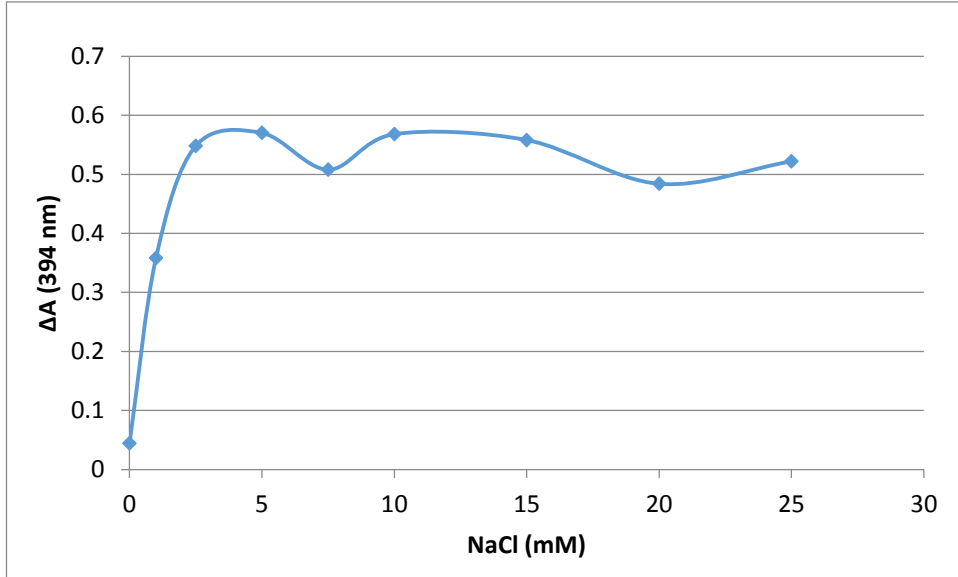
olacak şekilde TOB stok çözeltisinden eklendikten sonra, 25 mM pH 4,50 tamponuyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. GEN için, üzerlerine konsantrasyonu 50 ng/mL olacak şekilde GEN stok çözeltisinden eklendikten sonra, 25 mM pH 4,50 tamponuyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. AMİ için ise üzerlerine konsantrasyonu 80 ng/mL olacak şekilde AMİ stok çözeltisinden eklendikten sonra, 25 mM pH 5.00 tamponuyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Kör çözeltileri etken madde eklenmeden diğer faktörler aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu örneklerden alınan 1 mL'lik kısım 3 mL AgNP çözeltisi içeren tüplere eklenmiş ve 20 saniye boyunca vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. Spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda tuz konsantrasyonlarına karşı 394 nm'de ΔA grafiklere geçirilmiştir (Şekil 3.17-3.19). Genel olarak tuz konsantrasyonunun belli bir konsantrasyona kadar ΔA 'yı artırdığı gözlenmiş, ancak tuz konsantrasyonu AMİ için 2,5 mM; GEN ve TOB için ise 5 mM'in üzerine çıktığında absorban farkları hemen hemen değişmemiştir. Bu yöntemde, iyonik şiddetin çok yüksek olduğu durumlarda AgNP'ların çökebilme olasılığı yüzünden tuz konsantrasyonu çok yüksek tutulmamıştır ve en uygun değer olarak AMİ için 2,5 mM, GEN ve TOB için 5 mM NaCl konsantrasyonu seçilmiştir.



Şekil 3.17. Amikasin (80 ng/mL) için NaCl konsantrasyonuna karşı ΔA (394 nm'de)'nin değişim grafiği



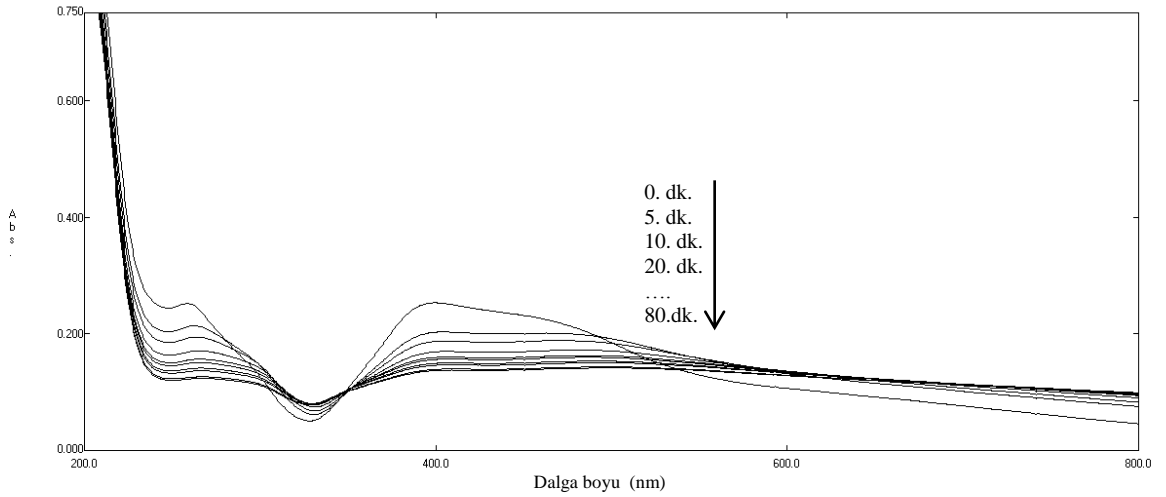
Şekil 3.18. Tobramisin (50 ng/mL) için NaCl konsantrasyonuna karşı ΔA (394 nm'de)'nin değişim grafiği



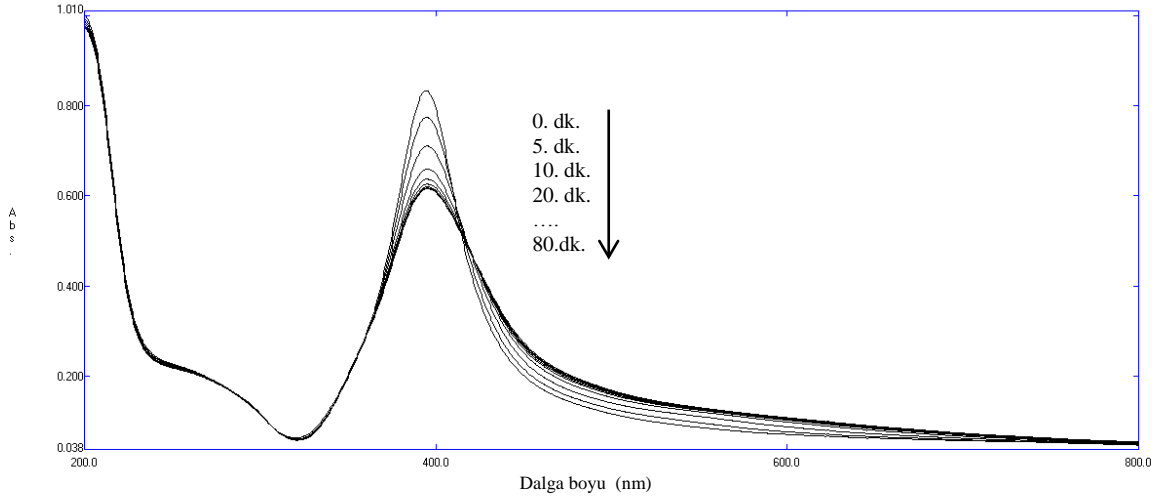
Şekil 3.19. Gentamisin (50 ng/mL) için NaCl konsantrasyonuna karşı ΔA (394 nm'de)'nin değişim grafiği

3.2.3.3. Zaman

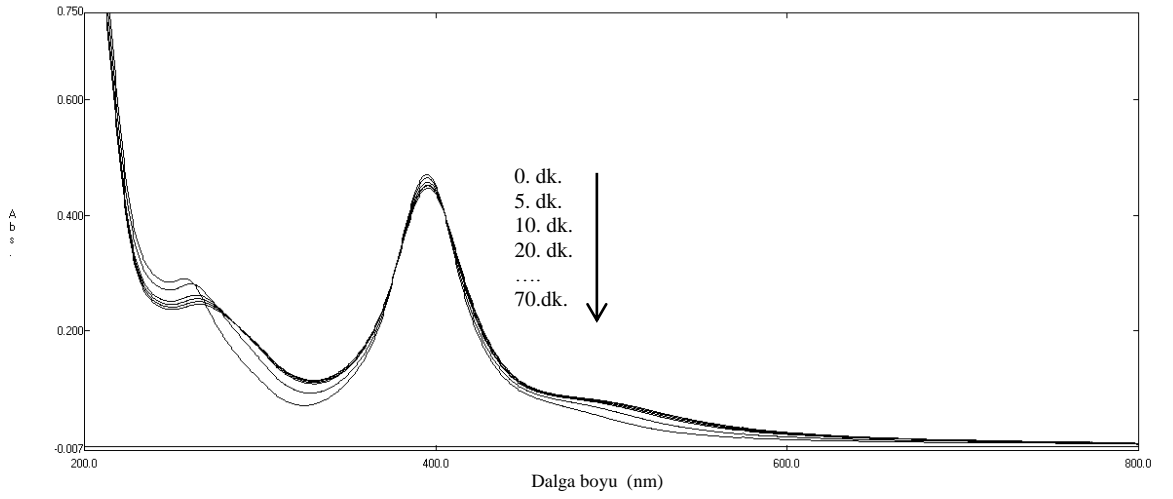
Yapılan çalışmalarda aminoglikozid çözeltilerinin, AgNP çözeltisine eklendikten sonra, çözeltinin renginin ve spektrumunun zamana bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Bu değişimin deneye olan etkisini gözlemlemek için belirlenen pH ve tuz konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin spektrumları belirli aralıklarla alınmıştır. AgNP'ların spektrumlarının zamana bağlı olarak azaldığı ve belli bir süre sonra bu azalmanın durduğu gözlenmiştir. Etkileşimin tamamlandığı bu sürenin AMİ için 50 dakika, GEN ve TOB için ise 60 dakika olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.20-3.21). Yapılan deneylerde, numuneler AgNP çözeltilerine eklendikten tam olarak bu süreler sonrasında spektrumların alınmasına çok dikkat edilmiştir.



Şekil 3.20. Tobramisin (60 ng/mL) eklenmiş gümüş nanoparçacıklarının 0-80 dakika aralığında alınan spektrumları



Şekil 3.21. Gentamisin (30 ng/mL) eklenmiş gümüş nanoparçacıkların 0-80 dakika aralığında alınan spektrumları



Şekil 3.22. Amikasin (70 ng/mL) eklenmiş gümüş nanoparçacıkların 0-70 dakika aralığında alınan spektrumları

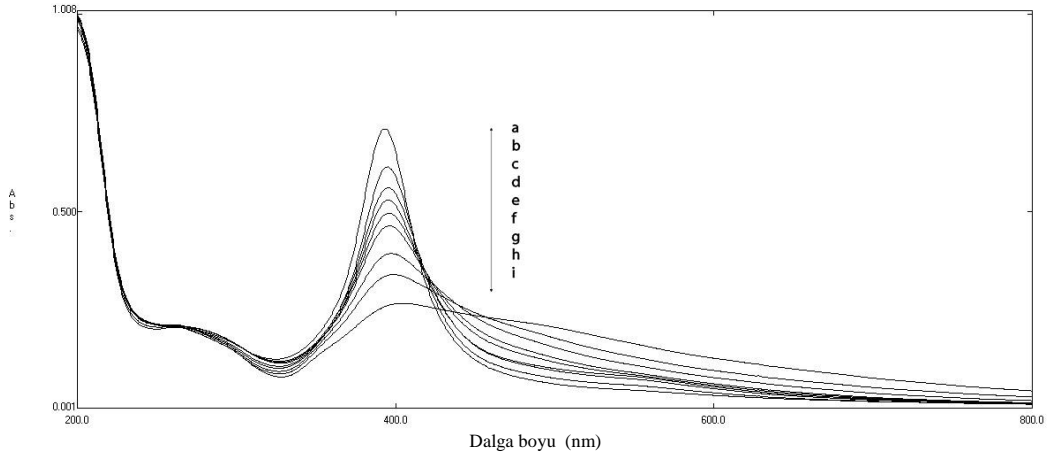
3.2.4. Spektrofotometrik Miktar Tayinleri

3.2.4.1. Tobramisin'in spektrofotometrik miktar tayini

En uygun çalışma şartları belirlendikten sonra, çalışma aralığı için deneyler yapılmış ve kabul edilebilir doğrusallık, doğruluk ve kesinliğin elde edildiği aralık olan doğrusal çalışma aralığı TOB için 22,5 – 60,0 ng/mL olarak belirlenmiştir. TOB'in 25 mM fosfat tamponu (pH 4,5; 5 mM NaCl) içerisindeki çözeltileri üç set olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden alınan 1'er mL'lik kısım 3 mL AgNP çözeltilerine eklendikten sonra 20 saniye vortekslenmiş, ardından her bir çözelti için tam olarak 60 dakika beklendikten sonra spektrumları alınmıştır. Ölçümlerde TOB konsantrasyonu arttıkça spektrumun 394 nm'deki absorbansının azaldığı ve daha yüksek dalga boylarında absorbans artışları olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.23). Kör çözeltileriyle, TOB içeren çözeltilerin 394 nm'deki absorbanslarının farkı hesaplanmıştır. Konsantrasyona karşı bu ΔA değerleri grafiğe geçirildiğinde, doğrusal bir ilişki gözlenmiştir (korelasyon katsayısı 0,9981). Yöntemin $YS; 3\sigma/m$ formülünden 4,67 ng/mL olarak, TAS ise $10\sigma/m$ formülünden 14,14 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. Tobramisin'in spektrofotometrik analizinden elde edilen regresyon verileri

Çalışma aralığı (ng.mL⁻¹)	22,5 – 60
Yakalama sınırı (ng.mL⁻¹)	5
Tayin alt sınırı (ng.mL⁻¹)	14
Eğim	0.008
Kesim	-0.079
Korelasyon katsayısı	0.9981
Eğimin standart hatası	0.0001
Kesimin standart hatası	0.0006



Şekil 3.23. Tobramisin eklenmiş gümüş nanoparçacık çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları [a)0 ng/mL b)22,50 ng/mL c)26,25 ng/mL d)30,00 ng/mL e)33,75 ng/mL f)37,50 ng/mL g)45,00 ng/mL h)52,50 ng/mL i)60,00 ng/mL]

Yöntemin geçerlilik testleri için standart çözeltiler kullanılarak laboratuvarında 35, 42 ve 55 ng/mL TOB içeren tampon çözeltiler (pH 4,5; 5 mM NaCl) hazırlanmış ve belirlenen koşullarda üç gün süresince günde üç kez olmak üzere gün-içi ve günler-arası ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler öncesinde çözeltiler 5 dakika süreyle ultrasonik banyoda tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar yöntemin doğruluk ve kesinlik açısından değerlendirilmesi için kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Tobramisinin standart çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları

Gün-içi			
Konulan(ng/mL)	Bulunan(ng/mL)	BSS (%)	Bağlı hata (%)
35	34,37	0,54	-1,79
42	42,77	2,15	1,83
55	54,66	0,76	-0,63
Günler arası			
Konulan(ng/mL)	Bulunan(ng/mL)	BSS (%)	Bağlı hata (%)
35	34,20	2,16	-2,28
42	42,79	1,39	1,89
55	55,07	1,20	0,13

BSS: Bağlı Standart Sapma

Son geçerlilik testi olarak dayanıklılık testi yapılmıştır. Bu test için TOB deneylerinde kullanılan optimum şartlarda küçük değişiklikler yapılarak metodun bu değişikliklere dayanıklılığı test edilmiştir. Yapılacak değişikliklerin miktarı, deneyde kullanılan malzemelerin belirsizliği üzerinden hesaplanmıştır. TOB için dayanıklılık testleri pH, iyonik şiddet ve zaman parametrelerinde yapılmıştır. pH için pHmetrenin belirsizliği, iyonik şiddet için hassas terazi, balon jöjeler ve kullanılan mikropipetlerin belirsizliği kullanıldı. Zaman için belirsizlik hesaplanamadığı için optimum zaman üzerinden ± 1 dakika üzerinden ölçümler alınmıştır. pH için belirsizlik 0,01 olarak belirtildiği için, bu belirsizlik k sabiti (5) ile çarpılmış ve optimum pH $\pm 0,05$ değiştirilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. İyonik şiddet için belirsizlik 0,02 olarak hesaplandığı için, $\pm 0,10$ değiştirilerek sonuçlara etkisi incelenmiştir. Çizelge 3.3'deki sonuçlar AgNP üzerine değişik koşullarda TOB ekledikten sonra elde edilen geri kazanım sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 3.3. Tobramisin için spektrofotometrik dayanıklılık testi sonuçları

pH	Geri kazanım (%)	İyonik şiddet (mM NaCl)	Geri kazanım (%)	Zaman (dk)	Geri kazanım (%)
4,45	100,17	4,90	98,92	59	101,69
4,50	101,17	5,00	99,17	60	101,69
4,55	98,16	5,10	103,48	61	101,30

3.2.4.1.1. Yöntemin tobramisin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması

3.2.4.1.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

Türkiye’de TOB içeren preparatlar arasında ampuller ve merhem preparatları sayılabilir. Geliştirilen yöntem ampuller içerisinde yardımcı maddelerden olan EDTA’ya karşı seçici değildir. Bu yüzden ampul preparatlarına uygulama yapıldığında EDTA’dan kaynaklanan pozitif bir girişim gözlenmektedir. Ancak yöntem merhem preparatında bulunan yardımcı maddelerden klorbütanol uygulandığında herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Klorbutanol dışındaki yardımcı bir madde olan vazelin suyla karışmadığı için süzme işlemi sırasında ayrılmaktadır. Merhem preparatı çözeltilerine standart TOB’dan % 50, 75 ve 100 oranlarında eklendikten sonra miktar tayinleri yapılmış ve yardımcı maddelerden kaynaklı herhangi bir girişim olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. TOBRASED® göz merhemi (% 0,3 TOB içermektedir; Parti no: 1041039B)'ne standart ilavesinden sonra TOB için yapılan deneylerin sonuçları

Eklene TOB (%)	Bulunan TOB (%)	Geri Kazanım (%)
50	51,16	102,33
50	49,56	99,11
75	74,96	99,95
75	71,75	95,66
100	96,55	96,55
100	97,63	97,63
Ortalama		98,54
SS		2,44
BSS		% 2,47
GA (p=0,05 için)		2,00

Yöntemin seçiciliği ve doğruluğu test edildikten sonra, merhemlerin analizi için 1 g TOBRASED® göz merhemi (% 0,3; Parti no: 1041039B) tartılmış ve 100 mL tampon çözeltilerde çözülmüştür. Üç set halinde hazırlanan bu ilaç çözeltileri, çözünme işlemi için 10 dakika ultrasonik banyoda tutulduktan sonra, 20 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Çözeltiler 0,45 µm'lik süzgeç kağıtlarından süzülüp, süzüntüden alınan 30 µL'lik kısım 20 mL'lik balonjojelere alınmıştır. Üzerine 100 mM NaCl'den 0,25 mL eklendikten sonra tamponla tamamlanmıştır. Buradan alınan 1 mL çözelti 3 mL AgNP çözeltisine eklenip 20 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. 60 dakika sonra spektrofotometrede ölçümler alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5'de görülmektedir.

Çizelge 3.5. TOBRASED® göz merhemi (% 0,3 TOB içermektedir; Parti no: 1041039B)'ne yöntem uygulandığında elde edilen sonuçlar

TOB miktarı (%)	Bulunan TOB (%)	Geri Kazanım (%)
0,30	0,28	93,41
0,30	0,28	93,41
0,30	0,29	95,69
0,30	0,30	99,94
0,30	0,30	99,63
0,30	0,30	98,66
Ortalama	0,29	96,79
SS	0,01	3,01
BSS	3,11	3,11
Bağıl hata	-3,21	-3,21
GA (p=0,05 için)	0,01	2,48

3.2.4.1.1.2. Yöntemin süte uygulanması

Süt numunelerine TOB eklendikten sonra Bölüm 2.2.1.6'da anlatıldığı gibi numuneler proteinler ve yağlardan arındırılmış ve AgNP'lara eklendikten sonra spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen ΔA sonuçları kullanılarak miktar tayini yapılmıştır (Çizelge 3.6). TOB katılmış süt örnekleri AgNP çözeltilerine eklendiğinde, AgNP'ların renklerinin sarıdan turuncuya dönüştüğü gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.6. TOB için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları

Eklenen(ng/mL)	Bulunan (ng/mL)	Geri Kazanım (%)	BSS(%)
35	32,85	93,85	3,30
42	38,95	92,74	9,76
55	49,80	90,54	4,40

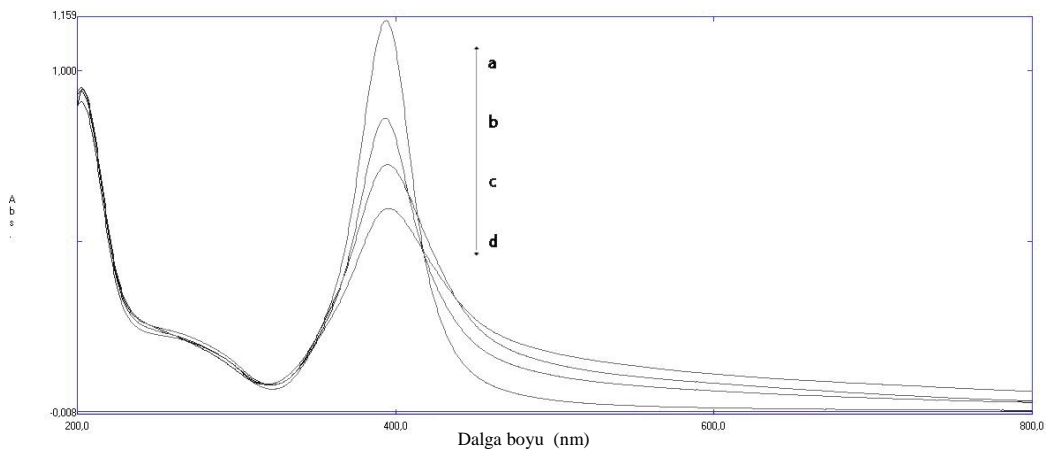
3.2.4.2. Gentamisinin spektrofotometrik miktar tayinleri

En duyarlı deney koşulları belirlendikten sonra, doğrusal çalışma aralığı 20-60 ng/mL olarak belirlenmiştir. GEN çözeltileri 25 mM fosfat tamponu (pH 4,5; 5 mM NaCl) içerisinde 3 set olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden alınan 1'er mL'lik kısım 3 mL AgNP çözeltisine eklendikten sonra 20 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırılmış, ardından her bir çözelti için tam olarak 60 dakika beklendikten sonra ölçümleri alınmıştır. GEN konsantrasyonu artırıldıkça AgNP'a ait spektrumun 394 nm'deki absorbansının azaldığı ve daha yüksek dalga boylarında absorbans artışları olduğu gözlemlenmiştir. Kör çözeltileriyle, GEN içeren çözeltilerin 394 nm'deki absorbanslarının farkı hesaplanmıştır. Konsantrasyona karşı ΔA grafiğe geçirildiğinde, doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. GEN için korelasyon katsayısı 0,9930'dur. Yöntemin $YS \ 3\sigma/m$ formülünden 2,85 ng/mL olarak, TAS ise $10\sigma/m$ formülünden 8,63 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.7. Gentamisinin spektrofotometrik analizinden elde edilen regresyon verileri

Çalışma aralığı (ng.mL⁻¹)	20-60
Yakalama sınırı (ng.mL⁻¹)	2,85
Tayin alt sınırı (ng.mL⁻¹)	8,63
Eğim	0,013
Kesim	-0,084
Korelasyon katsayısı	0,9930
Eğimin standart hatası	0,0003
Kesimin standart hatası	0,0012

Yöntemin geçerliliğini test etmek için stok çözeltiler kullanılarak laboratuvarında 30, 40 ve 50 ng/mL GEN içeren çözeltiler hazırlanmış ve üç gün süresince günde üç kez olmak üzere gün-içi ve günler-arası ölçümleri yapılmıştır (Şekil 3.24). Ölçümler öncesinde çözeltiler 5 dakika süreyle ultrasonik banyoda tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8’de gösterilmiştir.



Şekil 3.24. Validasyon çalışmalarında hazırlanan gümüş nanoparçacık-gentamisin [a)0 ng/mL, b)30 ng/mL, c)40 ng/mL, d)50 ng/mL] çözeltilerinin spektrumları

Çizelge 3.8. Gentamisinin standart çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları

Gün-içi			
Konulan(ng/mL)	Bulunan(ng/mL)	BSS (%)	Bağlı hata (%)
30	30,95	5,42	3,16
40	40,33	1,18	0,84
50	51,31	0,93	2,63
Günler arası			
Konulan(ng/mL)	Bulunan(ng/mL)	BSS (%)	Bağlı hata (%)
30	30,44	4,26	1,45
40	40,59	1,46	1,47
50	51,12	1,33	2,25

GEN için dayanıklılık testleri pH, iyonik şiddet ve zaman parametrelerinde yapılmıştır. Zaman için belirsizlik hesaplanamadığı için optimum zaman üzerinden ± 1 dakika üzerinden ölçümler alınmıştır. pH için belirsizlik 0,01 olarak hesaplandığı için, bu belirsizlik k sabiti (5) ile çarpılarak optimum pH $\pm 0,05$ değiştirilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. İyonik şiddet için belirsizlik 0,02 olarak hesaplandığı için $\pm 0,10$ değiştirilerek sonuçlara etkisi incelenmiştir. Çizelge 3.9'daki sonuçlar AgNP üzerine değişik koşullarda GEN ekledikten sonra elde edilen geri kazanım sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 3.9. Gentamisin dayanıklılık testi sonuçları

pH	Geri kazanım (%)	İyonik şiddet (mM NaCl)	Geri kazanım (%)	Zaman (dk)	Geri kazanım (%)
4,45	101,62	4,90	103,00	59	102,47
4,50	101,94	5,00	100,03	60	102,15
4,55	99,82	5,10	102,58	61	102,15

3.2.4.2.1. Yöntemin gentamisin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması

3.2.4.2.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

GEN içeren ilaçlardan BELOGENT® merheminin her 1 gramında 0,5 mg betametazon ve 1,0 mg GEN etken maddeleri ve bunların yanında yardımcı madde olarak sıvı parafin ve beyaz yumuşak parafin bulunmaktadır. Betametazon test edilerek yöntemin seçiciliği belirlenmiştir. AgNP çözeltilerine betametazon eklenmiş ve çözeltilerin renginde ve UV-GB spektrumunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Standart ekleme yönteminde ise merhem preparatı çözeltilerine standart GEN eklendikten sonra miktar tayini yapılmış ve herhangi bir girişim olmadan doğru sonuçlar elde edildiği gözlenmiştir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. BELOGENT® merheme (1 mg GEN / 1 g merhem; Parti no: 25063101) standart ilavesinden sonra GEN deneylerinin sonuçları

Eklenen GEN (%)	Bulunan GEN (%)	Geri Kazanım (%)
50	50,92	101,83
50	50,25	100,51
75	74,16	98,88
75	74,33	99,10
100	104,02	104,02
100	103,02	103,02
Ortalama		101,23
SS		2,09
BSS		% 2,07
GA (p=0,05 için)		1,72

Daha sonra merhem preparatının analizi için 1 g BELOGENT® (1mg GEN/g ; Parti no: 25063101) tartılıp 100 mL suda çözülmüştür. Beş set olarak hazırlanan bu ilaç çözeltilerinin çözünme işlemi 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda hızlıca karıştırıldıktan sonra, 15 dakika ultrasonik banyoda tutularak gerçekleştirilmiştir. Çözeltiler 0,45 µm'lik süzgeç kâğıtlarından süzülüp süzüntüden alınan 30 µL'lik kısım 10 mL'lik balonjojeye alınmıştır. Üzerine 100 mM NaCl'den 0,50 mL eklendikten sonra fosfat tamponuyla tamamlanmıştır. Buradan alınan 1 mL çözelti 3 mL AgNP çözeltisi üzerine eklendikten sonra 20 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. 60 dakika sonra spektrofotometrede ölçümler alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.11'da görülmektedir.

Çizelge 3.11. BELOGENT® merheminin (1 mg GEN / 1 g merhem; Parti no: 25063101) miktar tayini sonuçları

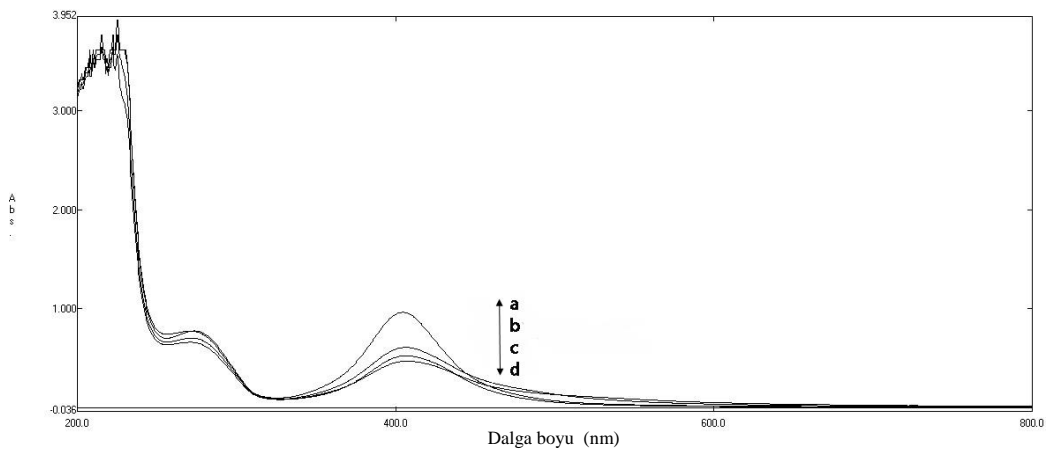
GEN miktarı (mg)	Bulunan GEN (mg)	Geri Kazanım (%)
1,00	1,01	101,04
1,00	1,04	103,95
1,00	1,03	102,63
1,00	1,02	102,36
1,00	1,06	105,81
Ortalama	1,03	103,16
SS	0,02	1,81
BSS	%1,75	% 1,75
Bağlı hata	3,16	3,16
GA (p=0,05 için)	0,02	1,72

3.2.4.2.1.2. Yöntemin süte uygulanması

GEN eklenmiş süt numuneleri bölüm 2.2.1.6'da anlatıldığı gibi yağdan ve proteinlerden arındırıldıktan sonra süzülerek analizlere hazır hale getirilmiş ve AgNP'lara eklendikten sonra spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır (Şekil 3.25). Elde edilen ΔA sonuçları kullanılarak miktar tayini yapılmıştır (Çizelge 3.12). GEN'li süt örnekleri eklenmiş AgNP çözeltilerinde de renk değişimi gözlenmiştir.

Çizelge 3.12. Gentamisin için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları

Eklenen (ng/mL)	Bulunan (ng/mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
30	34,45	114,83	4,39
40	37,87	94,67	9,08
50	43,54	87,08	5,40



Şekil 3.25. Gentamisin içeren süt numunelerinin gümüş nanoparçacıklara eklendikten sonraki spektrumları [a)0 ng/mL, b)30 ng/mL, c)40 ng/mL, d)50 ng/mL]

3.2.4.3. Amikasinin spektrofotometrik miktar tayinleri

Optimizasyon çalışmalarında belirlenen deney koşullarında yapılan çalışmalar sonucunda doğrusal çalışma aralığı AMİ için 60-100 ng/mL olarak belirlenmiştir. AMİ'in 25 mM fosfat tamponu (pH 5,0; 2,5 mM NaCl) içerisinde, çözeltileri 3 set olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden alınan 1'er mL'lik kısım 3 mL AgNP çözeltisi üzerine eklendikten sonra 20 saniye vortekslenmiş, ardından her bir çözelti için tam olarak 50 dakika beklendikten sonra ölçümleri alınmıştır. AMİ konsantrasyonuna bağlı olarak AgNP'ye ait spektrumun 394 nm'deki absorbansının

azaldığı ve daha yüksek dalga boylarında absorban artışı olduğu gözlemlenmiştir. Kör çözeltileriyle, AMİ içeren çözeltilerin 394 nm'deki absorbanlarının farkı hesaplanmıştır. Konsantrasyona karşı ΔA grafiğe geçirildiğinde, doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. AMİ için korelasyon katsayısı 0,9946'dır. Yöntemin YS $3\sigma/m$ formülünden 14,94 ng/mL olarak, TAS ise $10\sigma/m$ formülünden 45,26 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.13. Amikasinin spektrofotometrik analizinden elde edilen regresyon verileri

Çalışma aralığı (ng.mL⁻¹)	60-100
Yakalama sınırı (ng.mL⁻¹)	14,94
Tayin alt sınırı (ng.mL⁻¹)	45,26
Eğim	0,014
Kesim	-0,723
Korelasyon katsayısı	0,9946
Eğimin standart hatası	0,0002
Kesimin standart hatası	0,0020

Stok çözeltiler kullanılarak laboratuvarında 70, 80 ve 90 ng/mL AMİ içeren çözeltiler hazırlanmış ve üç gün süresince, günde üç kez olmak üzere gün-içi ve günler arası ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler öncesinde çözeltiler 5 dakika süreyle ultrasonik banyoda tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.14'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.14. Amikasinin standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası analiz sonuçları

Gün-içi			
Konulan(ng/mL)	Bulunan(ng/mL)	BSS (%)	Bağlı Hata (%)
70	69,37	1,78	-0,98
80	79,94	0,71	-0,08
90	90,37	0,98	0,41
Günler-arası			
Konulan(ng/mL)	Bulunan(ng/mL)	BSS (%)	Bağlı Hata (%)
70	68,73	1,26	-1,81
80	78,89	1,30	-1,39
90	89,49	1,15	-0,57

AMİ için de TOB ve GEN’de olduğu gibi dayanıklılık testleri uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.15’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.15. Amikasin dayanıklılık testi sonuçları

pH	Geri kazanım (%)	İyonik şiddet (mM NaCl)	Geri kazanım (%)	Zaman (dk)	Geri kazanım (%)
4,95	100,19	2,45	99,30	49	100,50
5,00	100,61	2,50	99,05	50	100,40
5,05	98,08	2,55	99,87	51	100,40

3.2.4.3.1. Yöntemin amikasin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması

3.2.4.3.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

AMİ içeren preparat olarak DRAMIGEL® jel (%5 AMİ içermektedir, Parti No: C0681) seçilmiştir. DRAMIGEL® preparatında etken madde olarak %5 oranında AMİ ve yardımcı madde olarak metil-*p*-hidroksibenzoat, propil-*p*-hidroksibenzoat ve gliserin bulunmaktadır. Yardımcı maddeler analiz edilerek yöntemin seçiciliği test edilmiştir. AgNP çözeltilerine DRAMIGEL® jelde bulunan yardımcı maddeler olan metil-*p*-hidroksibenzoat, propil-*p*-hidroksibenzoat ve gliserin eklenmiş ve çözeltilerin renginde ve UV-GB spektrumunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Standart ekleme yönteminde ise jel preparatı çözeltilerine standart AMİ eklendikten sonra miktar tayini yapılmış ve herhangi bir girişim gözlenmemiştir (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.16. DRAMIGEL® (%5 AMİ içermektedir; Parti no:C0681) jele standart ilavesinden sonra AMİ için yapılan deneylerin sonuçları

Eklenen AMİ (%)	Bulunan AMİ (%)	Geri Kazanım (%)
50	49,38	98,77
50	48,86	97,72
75	74,44	99,26
75	74,58	99,44
100	101,20	101,20
100	101,99	101,99
Ortalama		99,73
SS		1,58
BSS		%1,59
GA (p=0,05 için)		1,30

Preparat analizi için 0,5 g DRAMIGEL® (%5 ; Parti no:C0681) tartılmış ve 100 mL suda çözülmüştür. Beş set olarak hazırlanan bu ilaç çözeltilerinin çözünme işlemi için 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda hızlıca karıştırıldıktan sonra, 15 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. Çözeltiler 0,45 µm'lik süzgeç kâğıtlarından süzülüp süzüntüden alınan 200µL'lik kısım 10 mL'lik balonjojeye alınmış ve saf su ile tamamlanmıştır. İyice çalkalandıktan sonra buradan alınan 160 µL'lik kısım 10 mL'lik balonjojeye alınmış ve üzerine 100 mM NaCl'den 0,25 mL eklendikten sonra fosfat tamponuyla (25 mM, pH 5,00) tamamlanmıştır. Buradan alınan 1 mL çözelti 3 mL AgNP çözeltisine eklendikten sonra 20 saniye vortekslenmiştir. 50 dakika sonra spektrofotometrede ölçümler alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.17'de görülmektedir.

Çizelge 3.17. DRAMIGEL® (%5 AMİ içermektedir; Parti no:C0681) miktar tayini sonuçları

AMİ miktarı (%)	Bulunan AMİ (%)	Geri Kazanım (%)
5,00	5,03	100,54
5,00	5,03	100,63
5,00	4,92	98,33
5,00	4,96	99,21
5,00	4,89	97,88
Ortalama	4,97	% 99,32
SS	0,06	1,25
BSS	%1,26	% 1,26
Bağlı hata	-0,68	-0,68
GA (p=0,05 için)	0,06	1,20

3.2.4.3.1.2. Yöntemin süte uygulanması

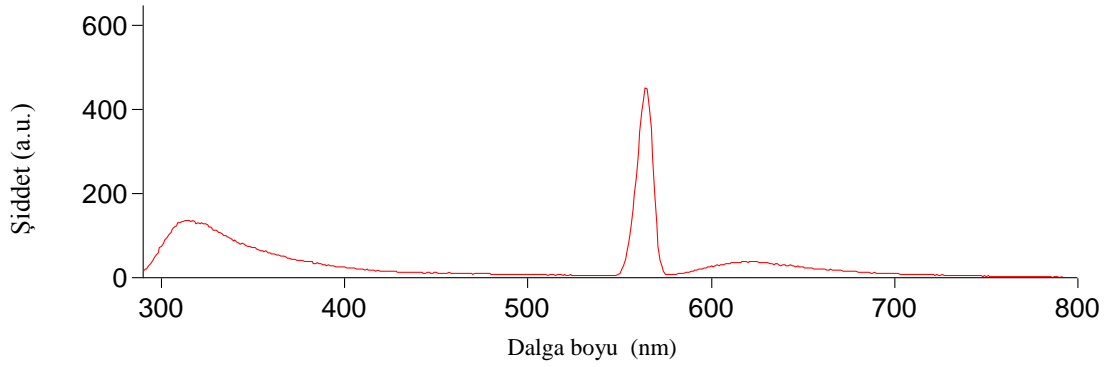
Bölüm 2.2.1.6'da anlatıldığı gibi hazırlanmış AMİ eklenmiş süt numunelerinin spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. ΔA sonuçlarından hareketle miktar tayini yapılmıştır (Çizelge 3.18). Bu deneyde de AgNP sarıdan turuncuya renk değişimi göstermiştir.

Çizelge 3.18. Amikasin için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları

Eklenen (ng/mL)	Bulunan (ng/mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
70	65,65	93,79	5,09
80	71,94	89,93	4,34
90	86,87	96,52	3,32

3.3. Spektroflorimetrik Çalışmalar

Bölüm 2.2.2.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan EuNP, NHS/EDC ile aktifleştirildikten sonra floresans taraması yapılmış ve emisyon sinyallerinin en yüksek olduğu uyarma dalga boyu 280 nm (λ_{ex}) olarak belirlenmiştir. 280 nm'de uyarılan parçacıkların 315 nm ve 620 nm'de iki adet floresans piki ve 570 nm civarında da ikinci mertebeden bir Rayleigh saçılma piki gözlenmiştir (Şekil 3.26). Slit aralıkları $slit_{ex}=5$ nm ve $slit_{em}=10$ nm tutularak emisyon spektrumlarının düzgün bir şekilde alınması sağlanmıştır.



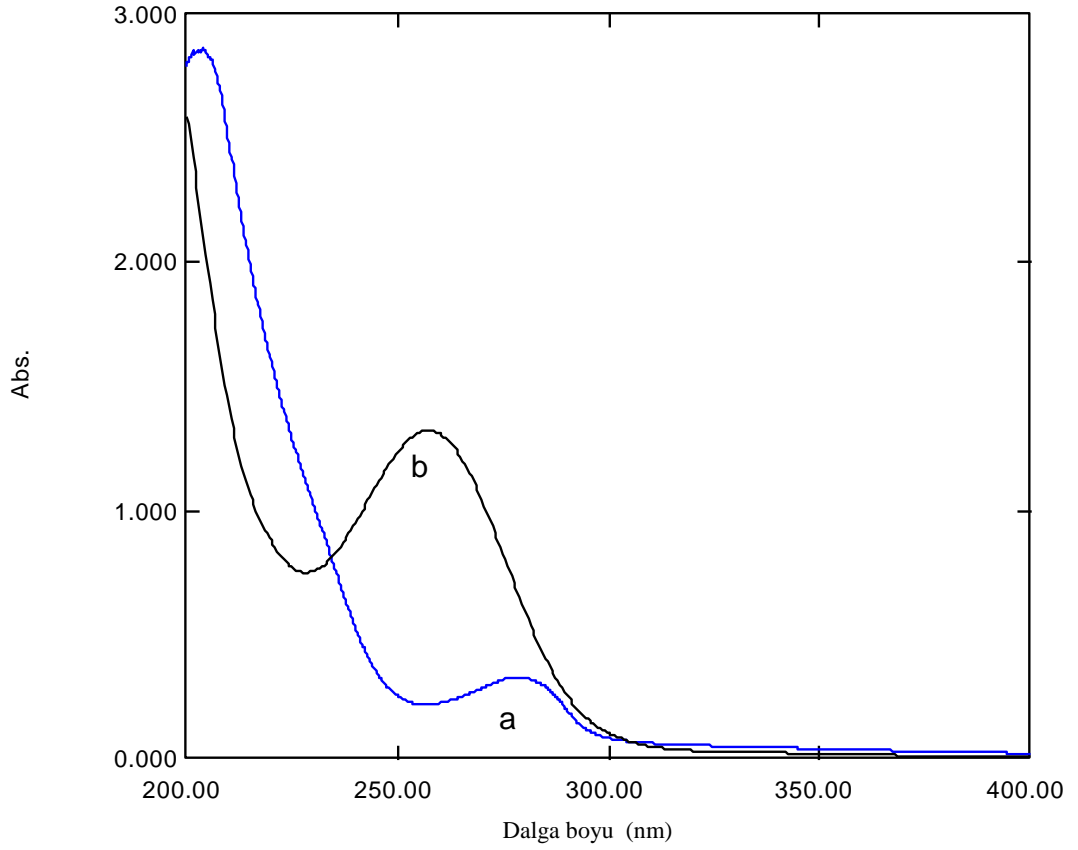
Şekil 3.26. Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların emisyon spektrumu (λ_{ex} :280 nm, $slit_{ex}$ =5 nm, $slit_{em}$:10 nm).

Ardından aktifleştirilmiş karboksil gruplarına sahip lipoik asit kaplı EuNP'a TOB eklenecek floresansa etkisi incelenmiştir. TOB'in emisyon şiddetini azalttığı ve bunun TOB konsantrasyonu ile orantılı olabileceği görülmüştür. Ardından TOB için metot optimizasyonu aşamasına geçilmiştir.

AMİ ve GEN için ise konsantrasyona karşı emisyon şiddetindeki azalmanın düzensiz olduğu ve doğrusallık göstermediği bulunmuştur. Bunun üzerine sülfat anyonunun Eu floresansında artışa neden olduğu, AMİ ve GEN'in floresans sönümlenmesine karşı etki yaptığı düşünülmüştür ve bu nedenle AMİ ve GEN sülfattan arındırılmıştır. Bunun için asitli ortamda $BaCl_2$ eklenerek sülfatın çöktürülmesi planlanmıştır. Ancak bundan önce $BaCl_2$ 'ün emisyon sinyallerine herhangi bir etkisi olup olmadığı test edilmiştir. $BaCl_2$ 'nin girişim yapmadığından emin olunduktan sonra asidik ortamda (0,1 M HCl), numunenin sülfat içeriğinden yüksek miktarda $BaCl_2$ eklenmesiyle numunelerdeki tüm sülfatın çökmesi sağlanmıştır. Sülfattan arındırılmış GEN ve AMİ için metot optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

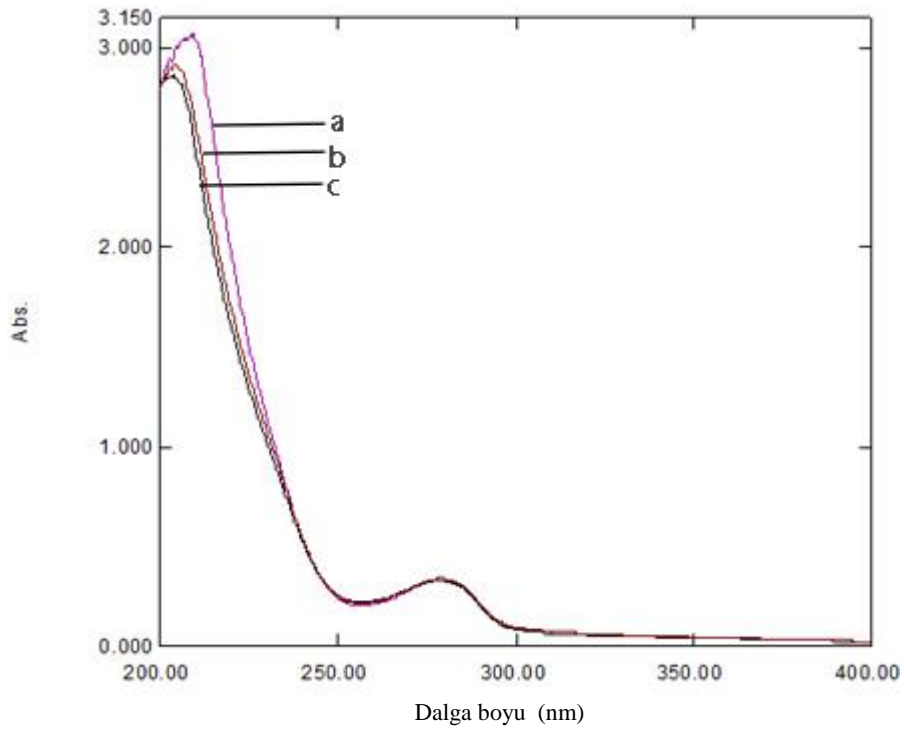
3.3.1. Floresans Sönümlenme Türünün Belirlenmesi

Floresans sönümlenmesinin belirlenmesi deneylerinde öncelikle EuNP ile aminoglikozidlerin etkileşiminin UV spektrumları incelenmiştir. Bunun için TOB eklenmiş ve eklenmemiş EuNP'ların spektrumları ölçülmüştür (Şekil 3.27).



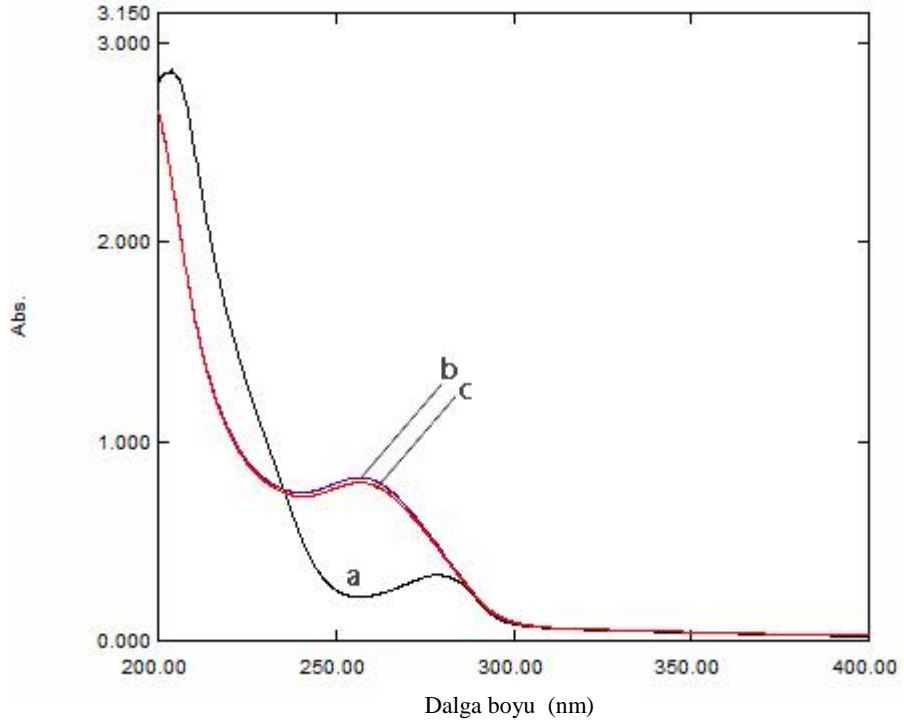
Şekil 3.27. Öropyum nanoparçacıkların tobramisın a) eklenmemiş ve b) eklenmiş haldeki spektrumları

AMİ ve GEN'in EuNP ile etkileşimi ölçüldüğünde TOB'den farklı olarak UV spektrumunda kayda değer bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 3.28).



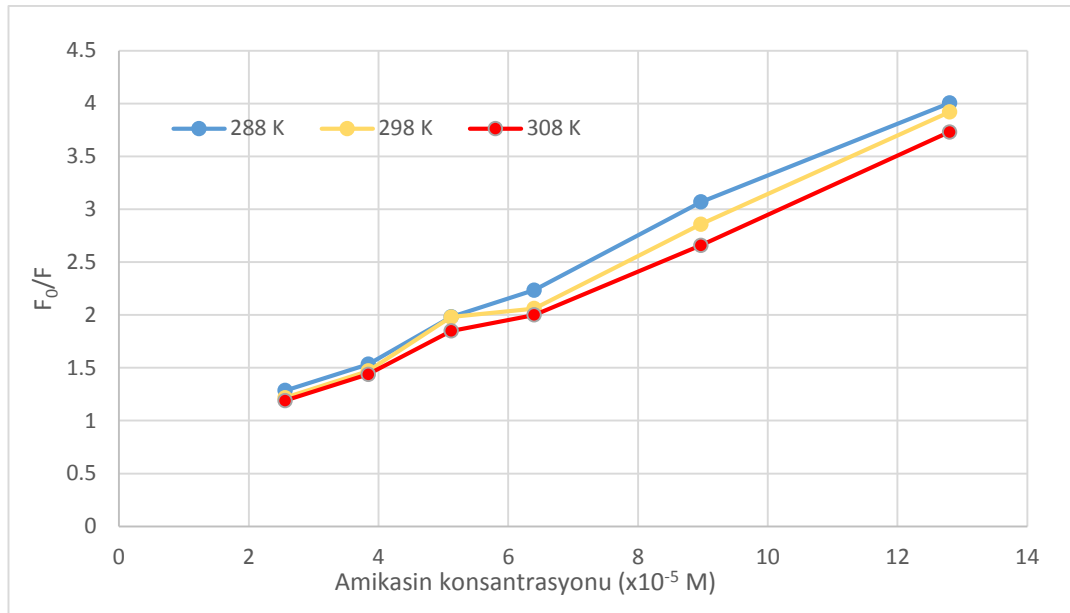
Şekil 3.28. Öropyum nanoparçacıkların a)kör çözelti b) amikasin sülfat eklenmiş c)gentamisin sülfat eklenmiş haldeki spektrumları

Sülfattan arındırılmış AMİ ve GEN ile NHS/EDC ile aktive edilmiş lipoik asit kaplı EuNP etkileşimi yine UV spektrumları alınarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.29).

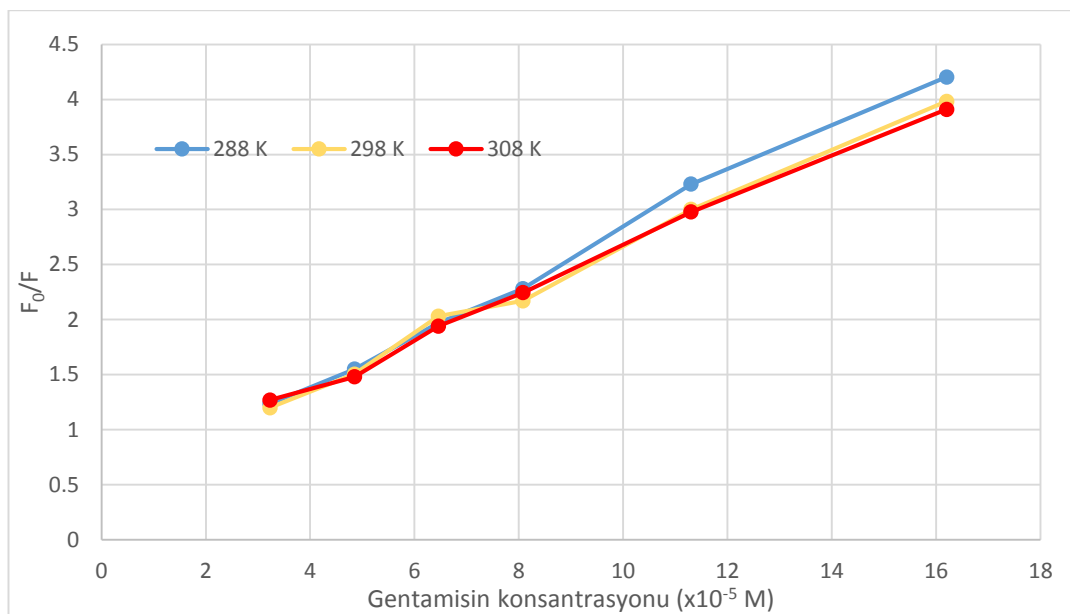


Şekil 3.29. NHS/EDC aktive edilmiş lipoik asitle modifiye Öropyum nanoparçacıkların a)kör çözelti b) amikasin eklenmiş c)gentamisin eklenmiş haldeki spektrumları

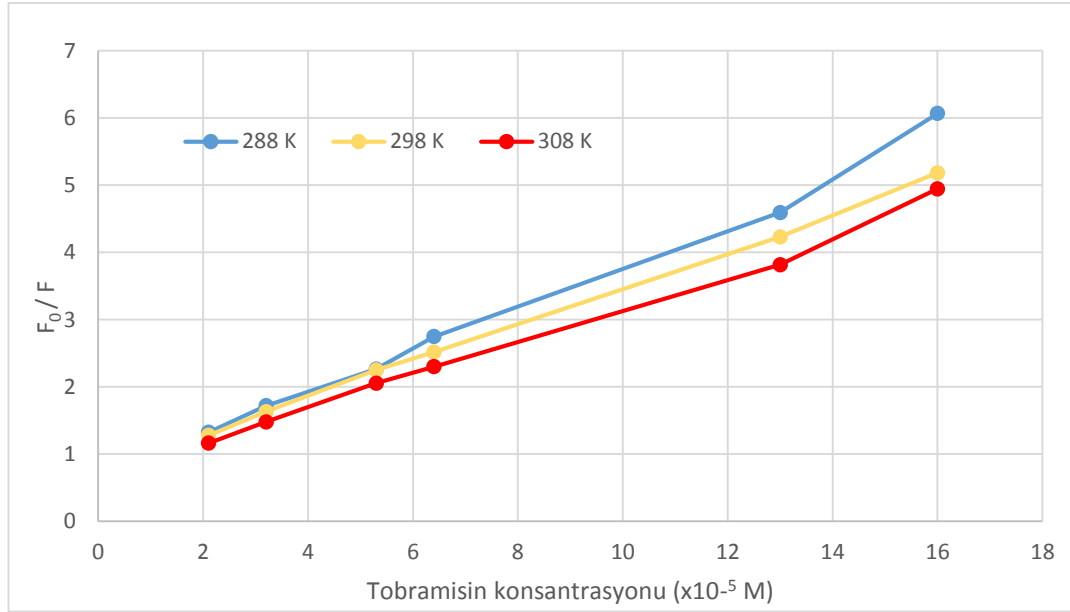
Floresans sönümlenme türünün belirlenmesi için ikinci olarak F_0/F' 'e karşı C_Q grafikleri çizilmiş (Şekil 3.30-3.32) ve eğrilerin doğrusal olup olmadığına bakılarak sönümlenmenin statik ve dinamik sönümlenmenin bir karışımı mı yoksa sadece tek bir tür sönümlenmeden mi kaynaklandığı belirlenmiştir.



Şekil 3.30. Amikasin konsantrasyonuna karşı F_0/F grafiği (Stern-Volmer eğrileri)



Şekil 3.31. Gentamisin konsantrasyonuna karşı F_0/F grafiği (Stern-Volmer eğrileri)



Şekil 3.32. Tobramisin konsantrasyonuna karşı F_0/F grafiği (Stern-Volmer eğrileri)

Floresans sönümlenme türü için yapılan deneylerden elde edilen son bulgular, farklı sıcaklıklarda yapılan deneylerden elde edilen Stern-Volmer sabitlerinin (K_{sv}) hesaplanmasıdır. Farklı sıcaklıklardaki (288 K, 298 K ve 308 K) K_{sv} değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve ortalamaları alınmıştır (Çizelge 3.19). Bu K_{sv} değerleri aynı zamanda yukarıdaki grafikte görülen eğrilerin kesme değerleri 1 olarak alındığındaki eğimleridir.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} C_Q$$

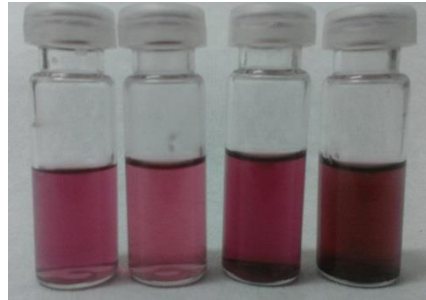
Burada F_0 , aminoglikozidler eklenmeden önceki floresans şiddeti, F aminoglikozidler eklendikten sonraki floresans şiddeti, C_Q ise eklenen aminoglikozidlerin molar konsantrasyonudur.

Çizelge 3.19. Farklı sıcaklıklardaki Stern-Volmer sabitleri

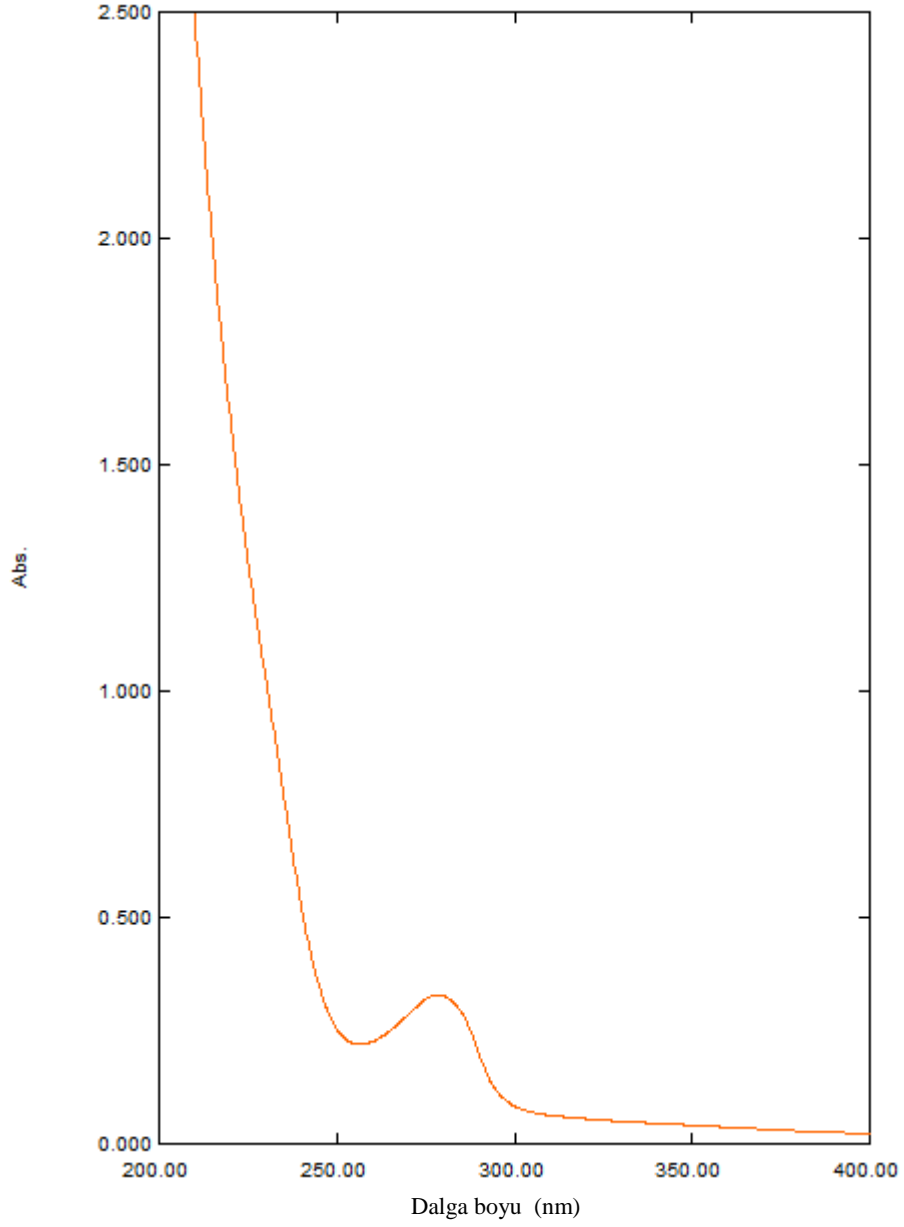
	K_{sv} değerleri		
	288 K	298 K	308 K
Amikasin	18342	16657	15133
Gentamisin	14829	13930	13850
Tobramisin	24986	21278	20939

3.3.2. Altın ve Öropyum Nanoparçacıkların Karakterizasyonları

Bölüm 2.2.2.'de anlatıldığı gibi sentezlenen EuNP ve AuNP, UV-GB spektrumları ve TEM görüntüleri alınarak karakterize edilmişlerdir. Sentezlenen AuNP'lar boyutlarına ve şekillerine göre farklı renklindedirler (Şekil 3.33).

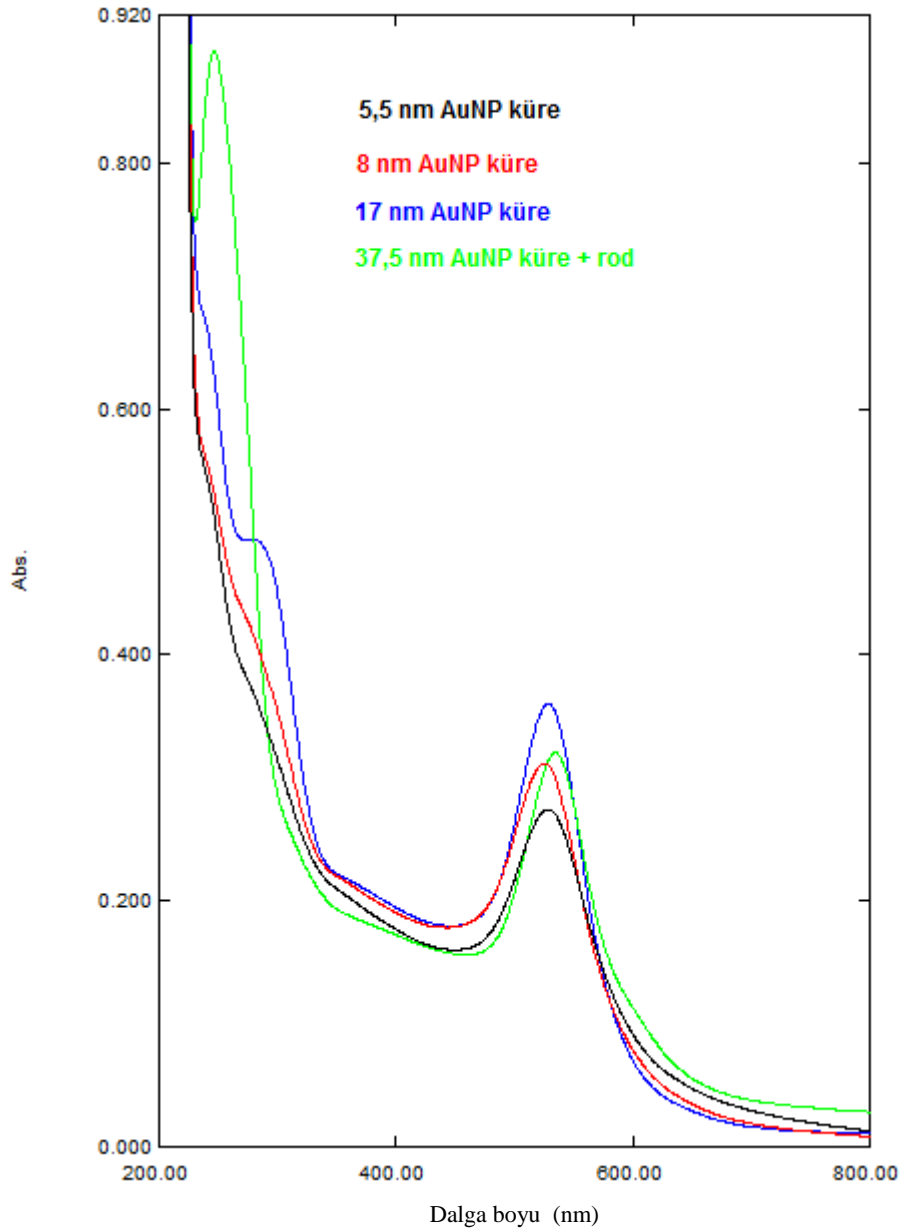
**Şekil 3.33.** Sentezlenen altın nanoparçacıklar

EuNP'ın UV spektrumunda 280 nm'de bir pik görülmektedir (Şekil 3.34).



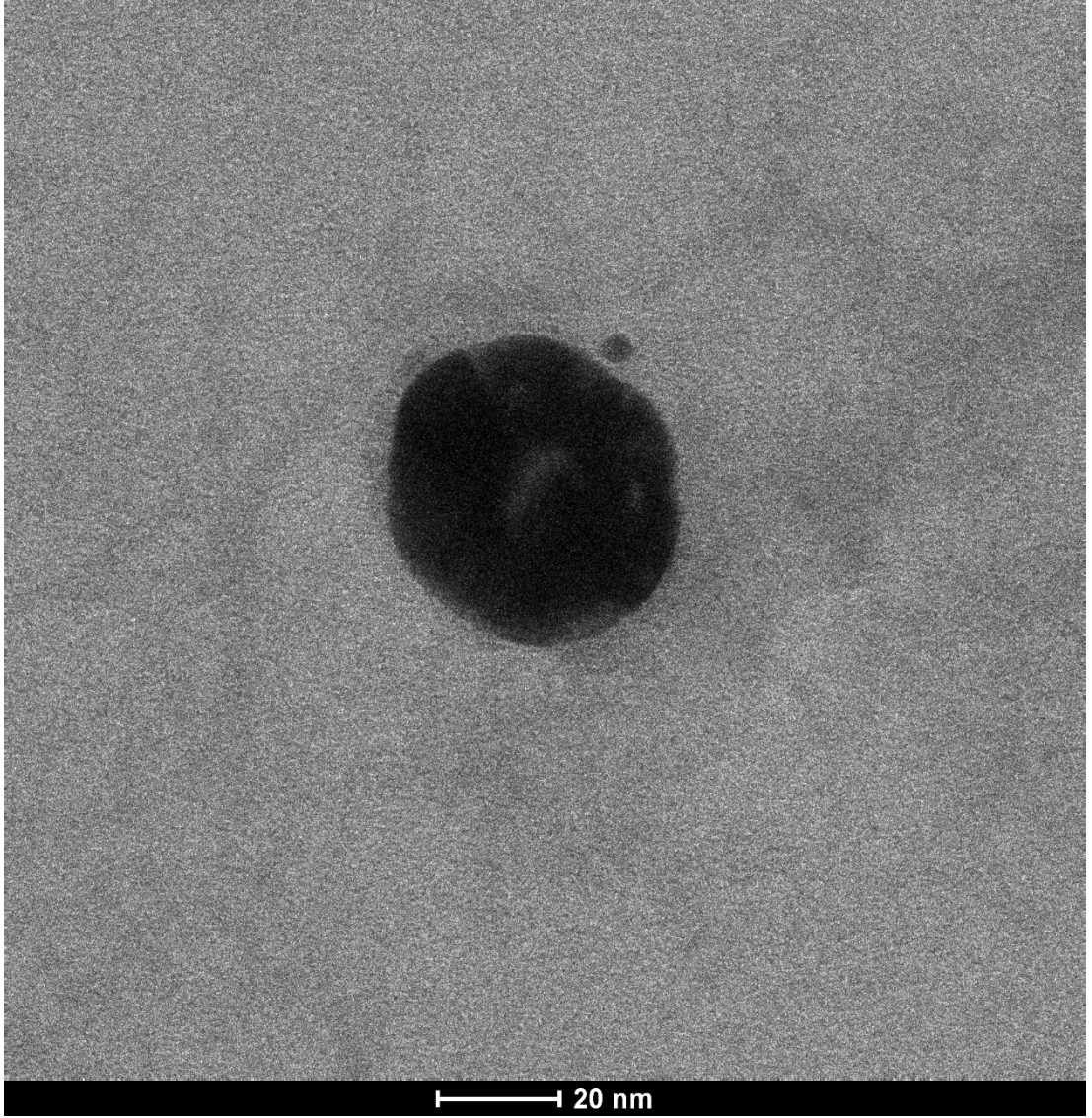
Şekil 3.34. Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların UV spektrumu

Şekil 3.35’de boyutlarına ve şekillerine göre AuNP’ların UV-GB spektrumları görülmektedir.

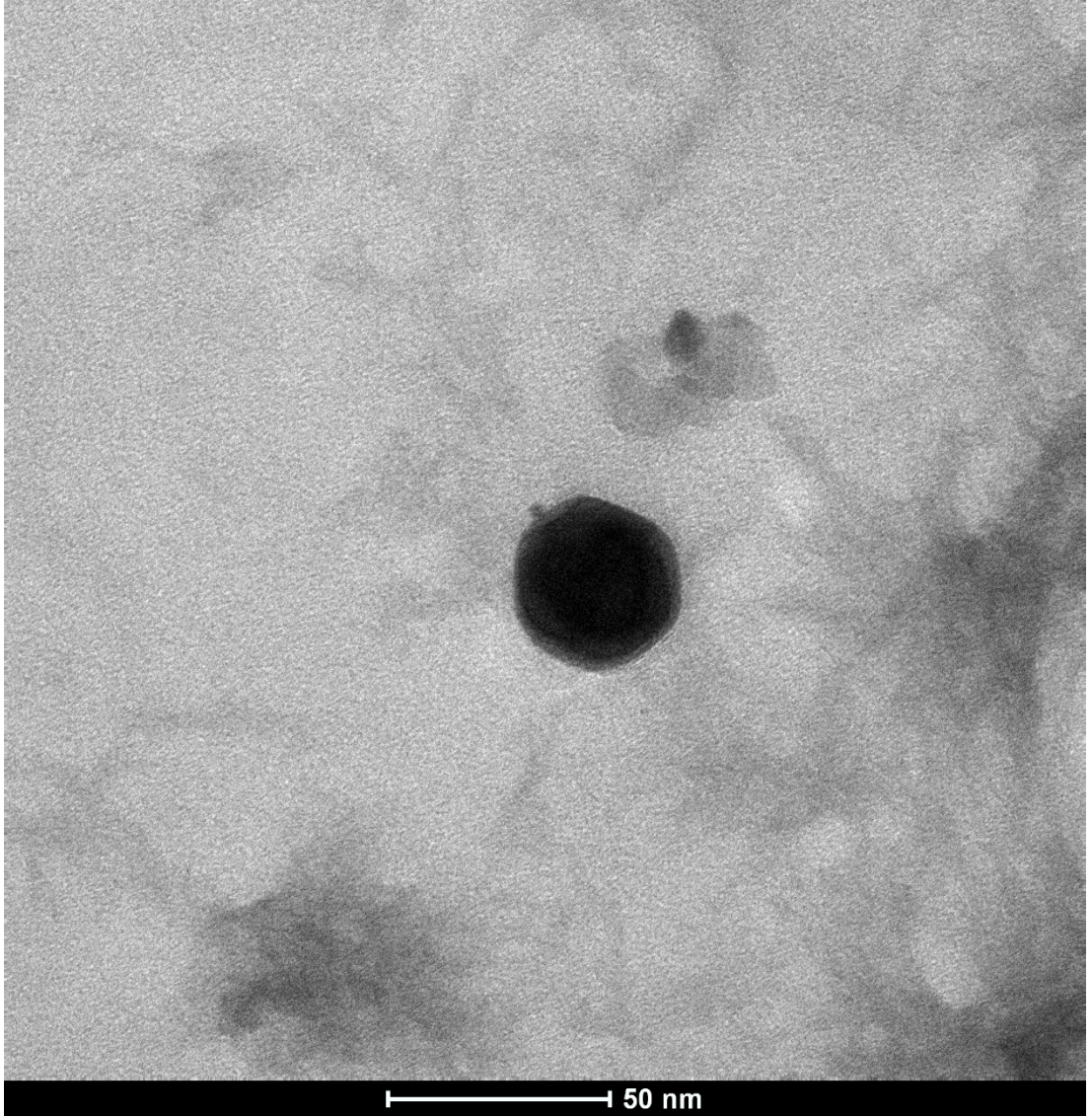


Şekil 3.35. Altın nanoparçacıkların UV-GB spektrumları

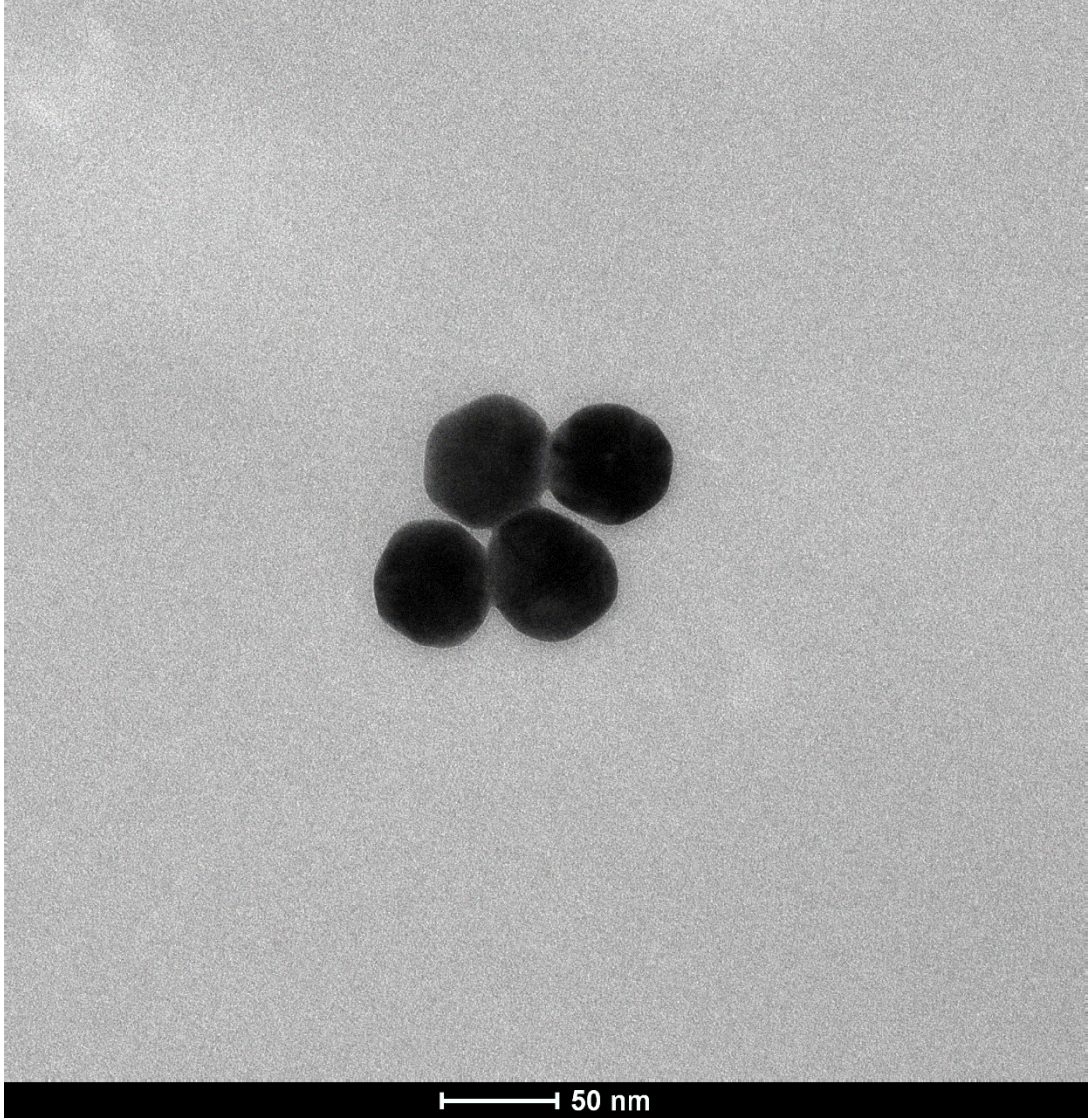
EuNP ve AuNP'ların TEM görüntülemeleri Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır (Şekil 3.36-3.37)



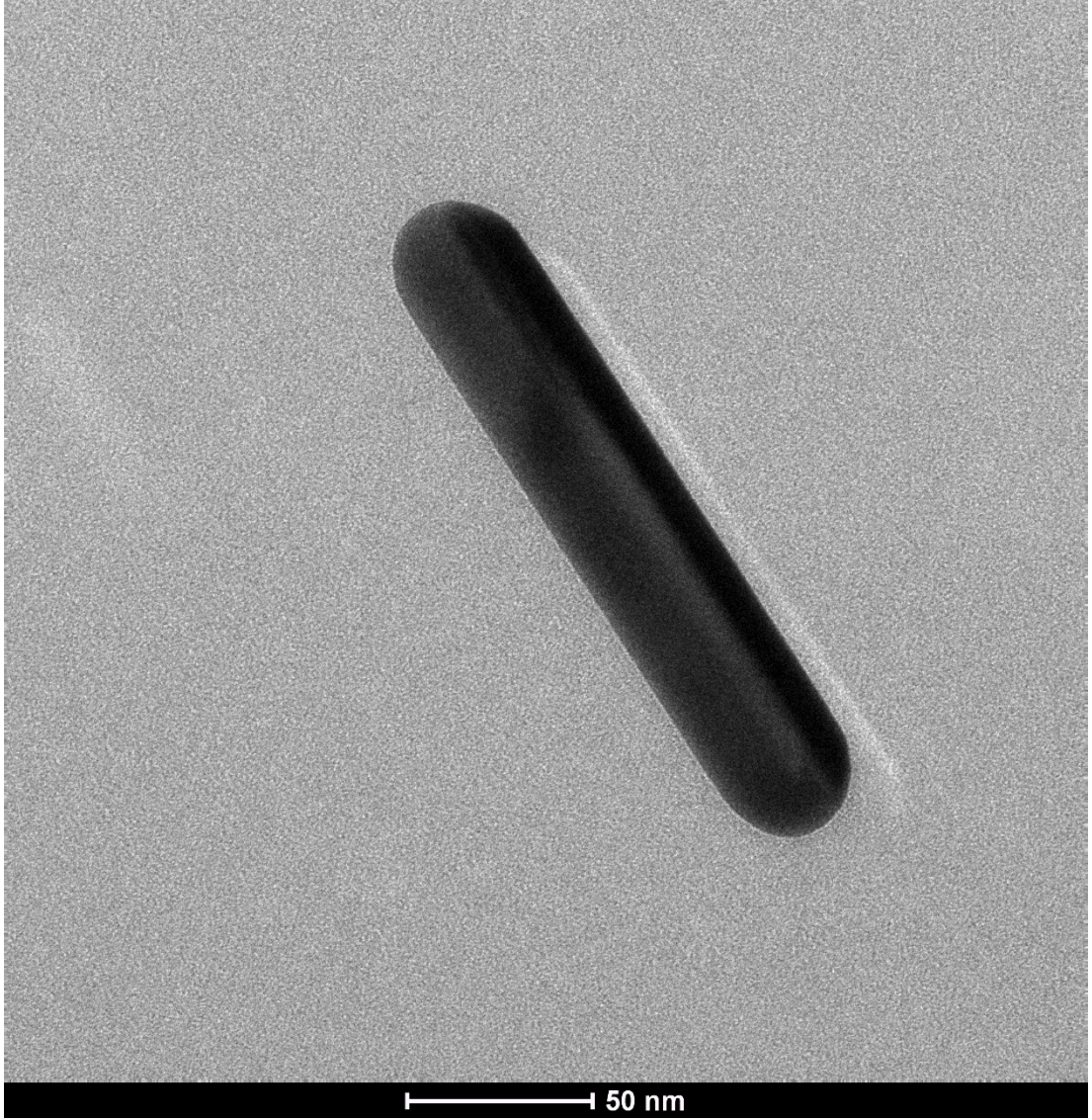
Şekil 3.36.a. Öropyum nanoparçacıklarının Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü



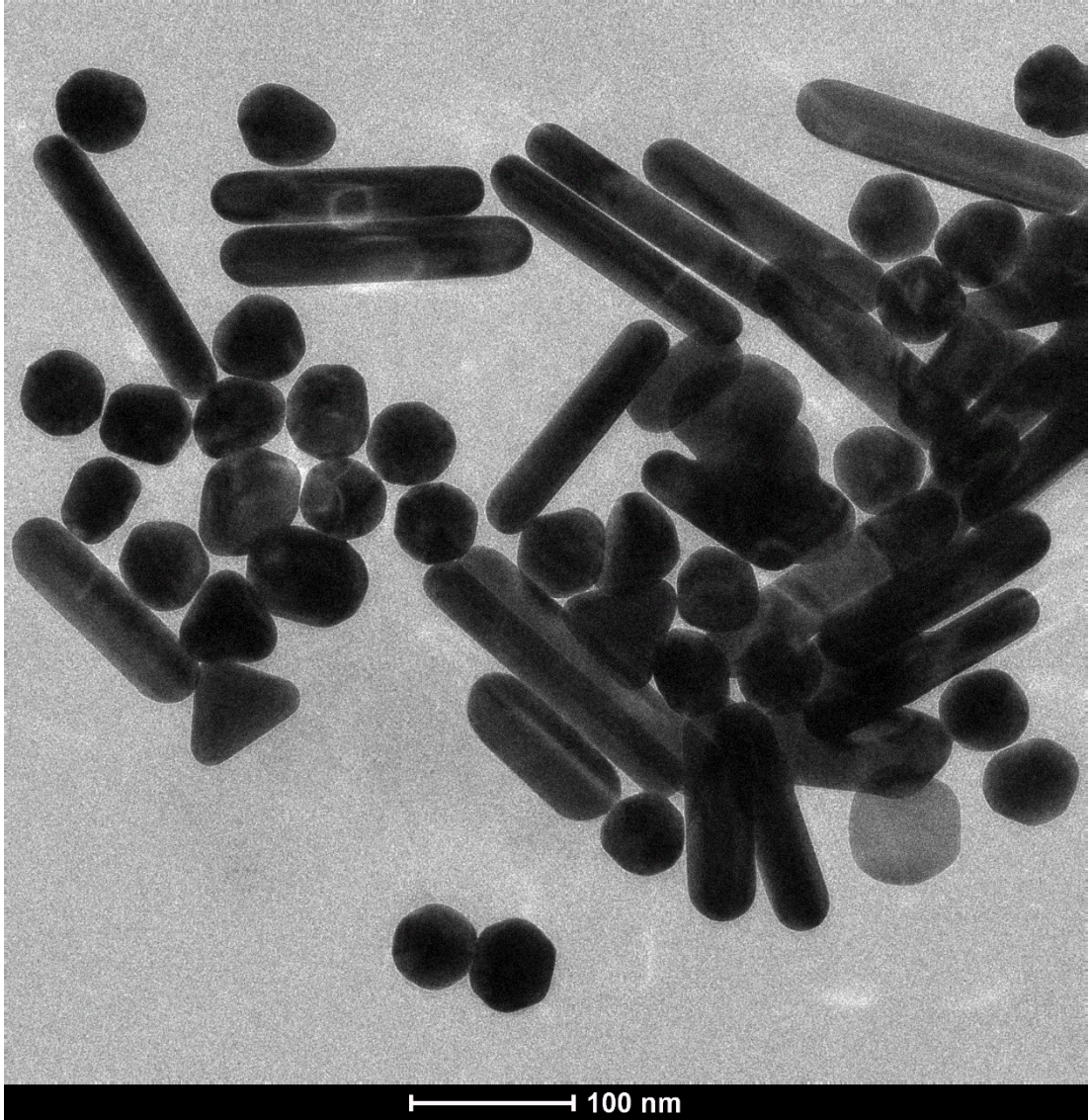
Şekil 3.36.b. Öropyum nanoparçacıklarının Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü



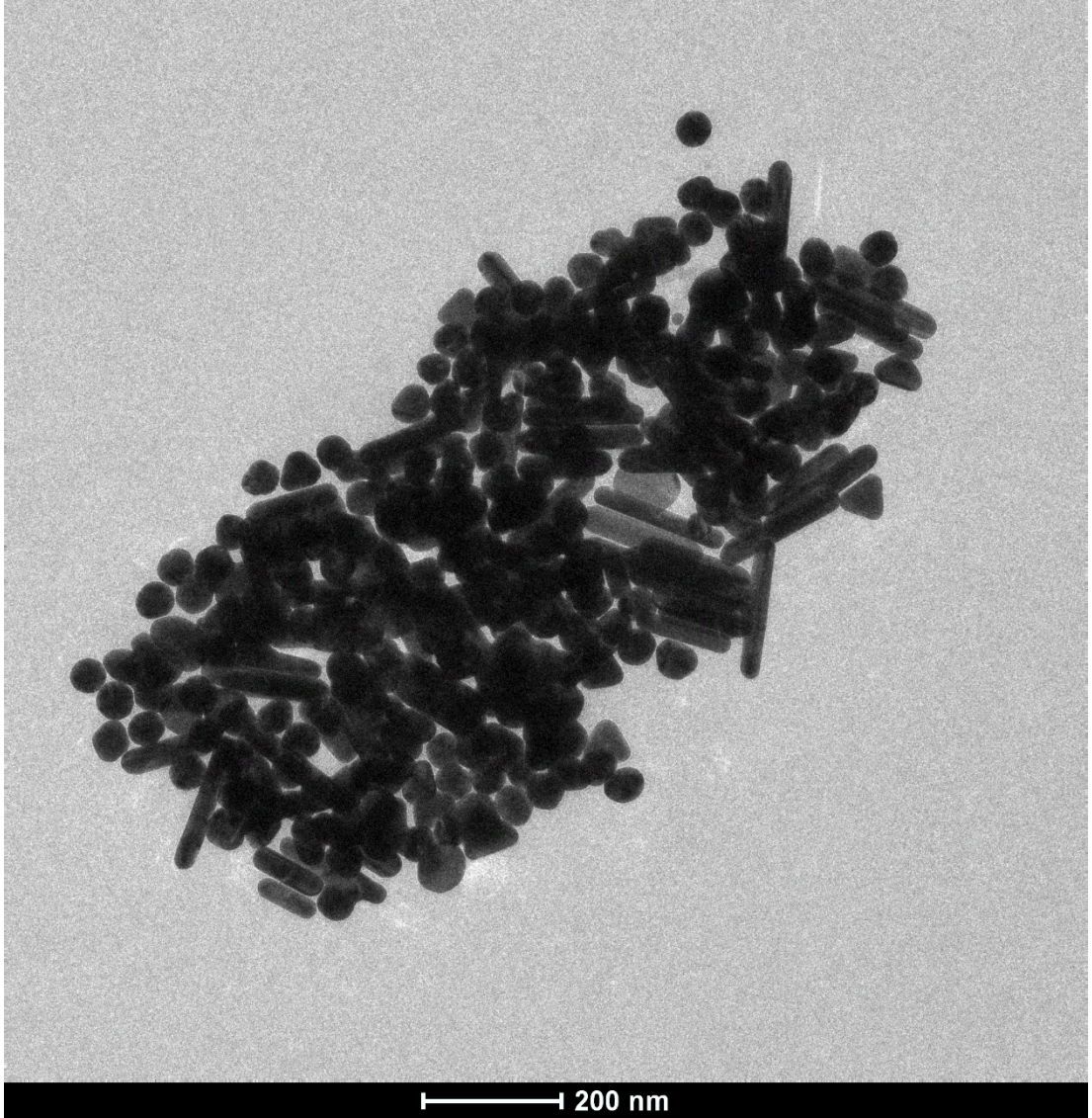
Şekil 3.37.a. Küre ve çubukların karışımı halinde sentezlenen altın nanoparçacıkların Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü



Şekil 3.37.b. Küre ve çubukların karışımı halinde sentezlenen altın nanoparçacıkların Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü



Şekil 3.37.c. Küre ve çubukların karışımı halinde sentezlenen altın nanoparçacıkların Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü



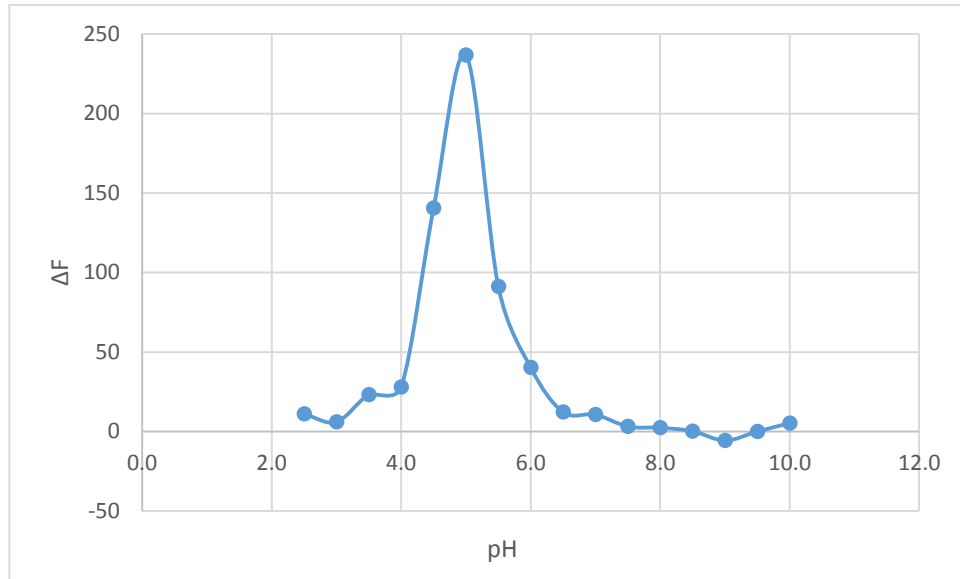
Şekil 3.37.d. Küre ve çubukların karışımı halinde sentezlenen altın nanoparçacıkların Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü

3.3.3. Metot Optimizasyonu

3.3.3.1. TOB için metot optimizasyon deneyleri

3.3.3.1.1. pH

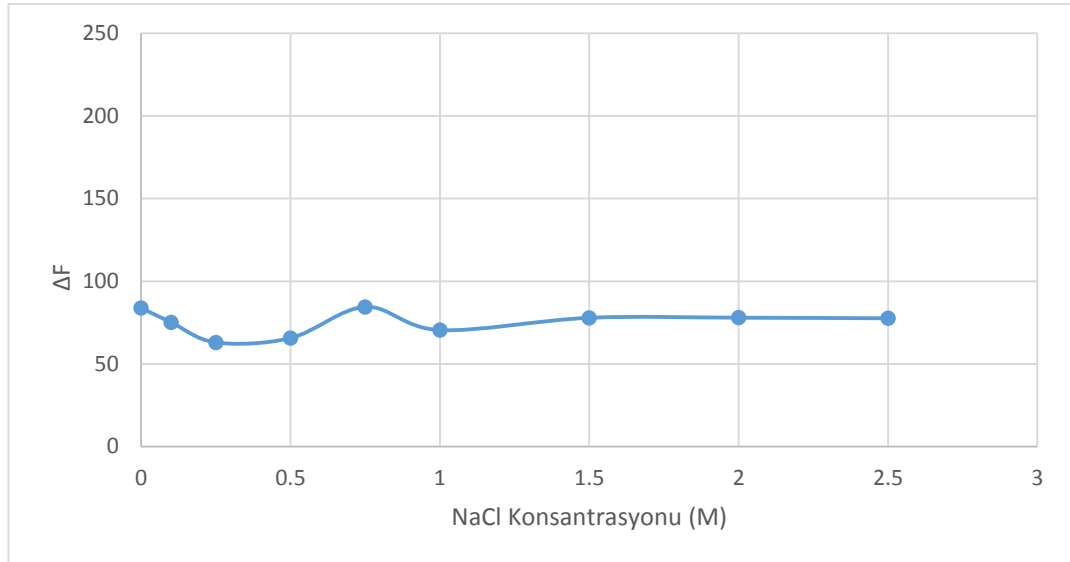
Kör çözeltiler ile numuneler arasında emisyon sinyalindeki şiddet azalışı (ΔF) pH'a karşı grafiğe geçirildiğinde en yüksek ΔF 'in pH 5,0'da görülmüştür (Şekil 3.38). Bazık bölgede lipoik asit kaplı EuNP'ların emisyon sinyallerinin çok düşük seviyelere düştüğü gözlenmiştir. pH 4'den daha düşük değerlerde ise emisyon sinyalleri yüksek iken floresans sönümlenmesi azalmıştır.



Şekil 3.38. Lipoik asit modifiye öropyum nanoparçacıkların tobramisin ($30 \mu\text{g/mL}$) ile etkileşimi sonucu floresans azalmasının pH'a karşı değişimi ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 315 \text{ nm}$).

3.3.3.1.2. İyonik Şiddet

pH optimizasyonundan sonra iyonik şiddetin etkisi ölçülmüştür. pH 5,0'da hazırlanan tamponlara değişik oranlarda NaCl çözeltisi eklenmiş ve kör ile tobramisin içeren EuNP'ler arasındaki fark grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.39). Sonuçlar değerlendirildiğinde NaCl konsantrasyonunun ΔF 'e önemli bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. İyonik şiddet yüksek tutularak gerçek numunelere yapılacak ön işlemler sırasında eklenecek reaktiflerin ihmal edilebilir düzeylerde kalması ve bütün ölçümlerin aşağı yukarı aynı iyonik şiddette yapılması için deneylerde 2,5 M NaCl'li ortamın kullanılmasına karar verilmiştir.



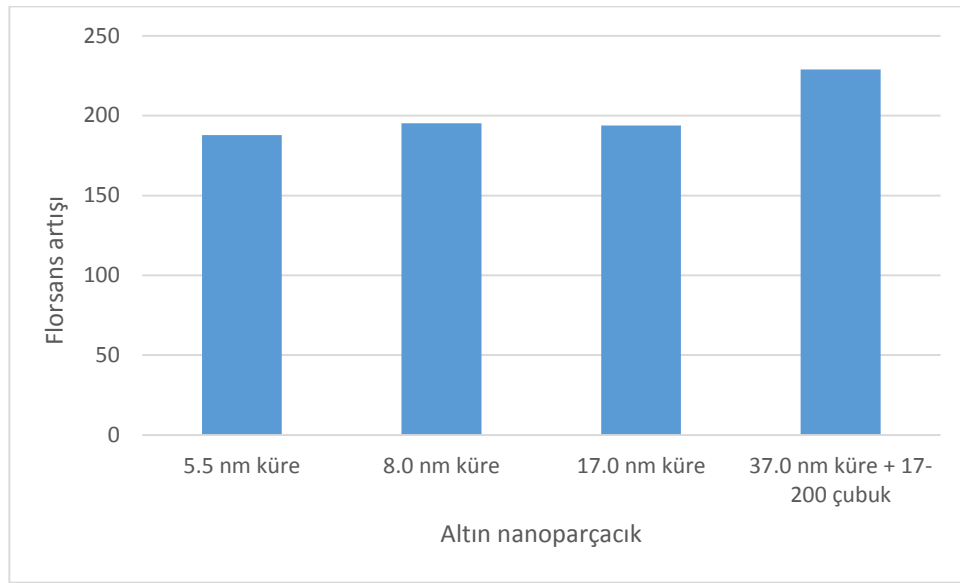
Şekil 3.39. Lipoik asit modifiye öropyum nanoparçacıkların tobramisin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile etkileşimi sonucu floresans azalmasının iyonik şiddete karşı değişimi (pH 5,0 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 315 \text{ nm}$).

3.3.3.1.3. Altın nanoparçacık boyutu

25 °C'de gerçekleştirilen deneylerde, bu şartlarda TOB için gözlenebilme sınırı aşağı yukarı 200 ppb olarak bulunmuştur. Duyarlılığı artırmak için metalle

zenginleştirilmiş floresans yöntemini kullanılmıştır. Bunun için değişik boyutlarda ve şekillerde AuNP hazırlanmış (Jana ve ark., 2001) ve EuNP çözeltisine eklenmiştir.

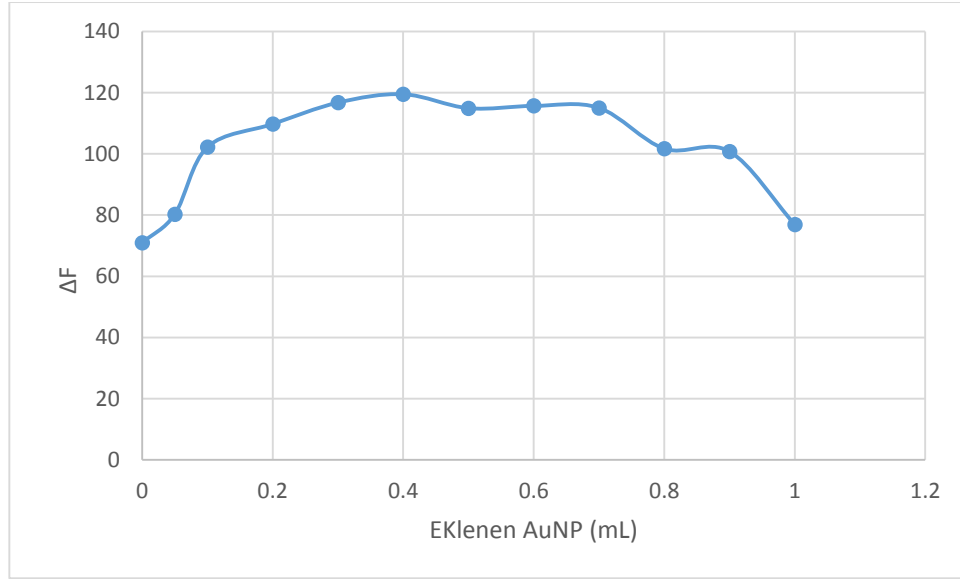
Hazırlanan bu AuNP'lar aynı miktardaki kör ve numunelere (pH 5,0 ve NaCl konsantrasyonu 2,5 M) eklendikten sonra emisyon spektrumları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre 37 nm'lik küre ve 17-200 nm çubuk karışımı diğer AuNP'lara göre sinyalleri daha fazla zenginleştirmiştir (Şekil 3.40) . Bu nedenle sonraki ölçümlerde bu parçacıklar kullanılmıştır.



Şekil 3.40. Tobramisin için altın nanoparçacık boyutuna ve şekline bağlı lipoik asit kaplı öropyum nanoparçacıklarının floresansındaki artış

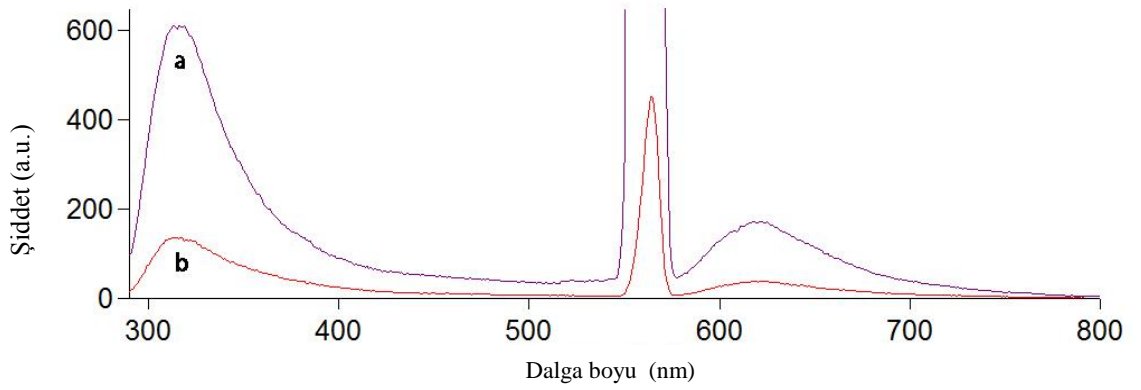
3.3.3.1.4. Altın nanoparçacık konsantrasyonu

Metalle zenginleştirilmiş floresansın optimizasyonunda eklenen nanoparçacığın miktarı belirlenmiştir. Bunun için yine kör ve tobramisin içeren çözeltilere, çözeltilerin son hacimleri aynı olacak şekilde değişik hacimlerde AuNP çözeltisinden eklenmiştir. Sonuçlar 0,4 mL AuNP eklemenin, sinyalleri en güçlü oranda zenginleştirdiğini göstermiştir (Şekil 3.41).



Şekil 3.41. Tobramisin için altın nanoparçacıkların (37 nm küre ve 17-200 nm çubuk karışımı) miktarına karşı floresans sönümlenmesinin grafiği ($\lambda_{ex} = 280$ nm $\lambda_{em} = 315$ nm).

Bu sonuçlara göre 0,4 mL 37 nm'lik küre ve 17-200 nm çubuk karışımdan oluşan AuNP'lar kör numunedeki emisyon sinyallerini yaklaşık 4,5 kat zenginleştirmiştir. TOB ölçümlerindeki duyarlılık açısından ise ΔF 'i yaklaşık 3 kat artırmıştır. Bu şartlarda TOB için YS 60 ppb, TAS ise yaklaşık 200 ppb olarak görülmüştür. Şekil 3.42'de AuNP eklenmiş ve eklenmemiş AuNP'ların emisyon spektrumlarını zenginleştirmesi görülmektedir.



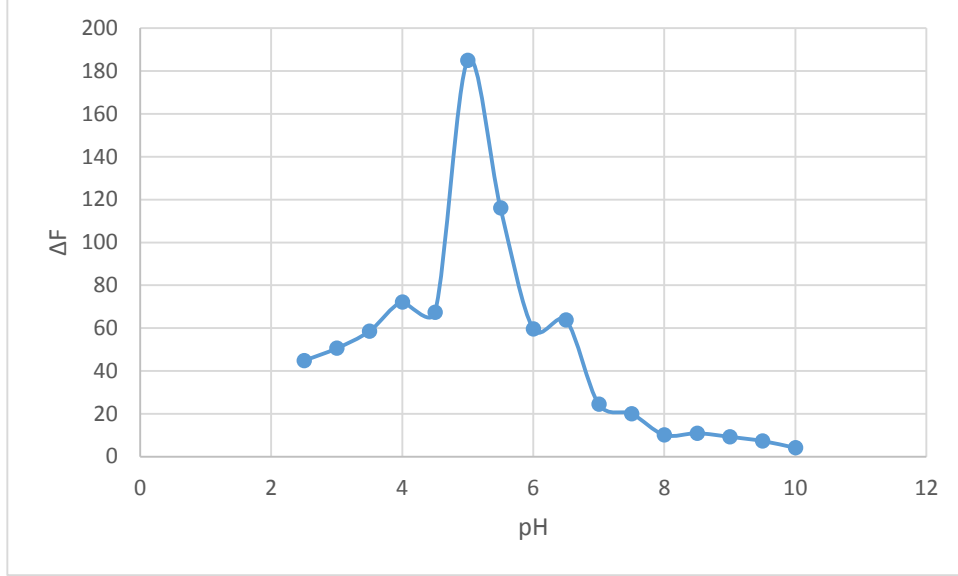
Şekil 3.42. Öropyum nanoparçacıklarının floresansının altın nanoparçacıklar kullanılarak zenginleştirilmesini gösteren emisyon spektrumları. a) altın nanoparçacık eklenmiş b) altın nanoparçacık eklenmemiş haldeki spektrumlar

3.3.3.2. AMİ ve GEN için metot optimizasyonu

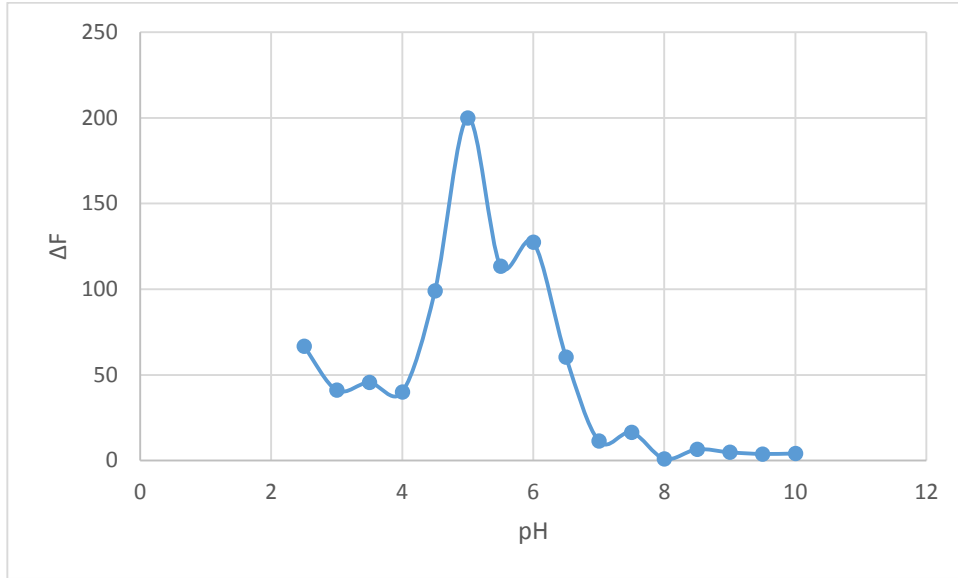
AMİ ve GEN sülfattan arındırıldıktan sonra metot optimizasyonu aşamaları TOB’de olduğu gibi uygulanmıştır.

3.3.3.2.1. pH

TOB deneylerinde belirlenen floresans dalga boyları ve slitleri kullanılarak, pH taraması 0,5 birim aralıklarla yapılmıştır. pH 2,5 – 7,5 aralığı sitrik asit-fosfat tamponu kullanılarak, pH 8,0-10,0 aralığı ise borat tamponu kullanılarak yapılmıştır. pH 2,5-7,5 aralığındaki tamponlar 25 mM sitrik asit ve 50 mM disodyum hidrojen fosfatın değişik oranlarda karıştırılması ile; pH 8,0-10,0 bölgesi ise 25 mM borik asitin pH’ının 100 mM NaOH kullanılarak ayarlanması ile hazırlanmıştır. Daha sonra floresans ölçümleri için her bir pH’da ayrı ayrı hazırlanan AMİ ve GEN numunelerinden alınan 0,5 mL’lik kısım, 2 mL EuNP çözeltisine eklenmiş ve emisyon spektrumları ölçülmüştür. pH’a karşı ΔF grafiğe geçirildiğinde en yüksek ΔF ’in pH 5,0’da görüldüğü bulunmuştur (Şekil 3.43 – 3.44).



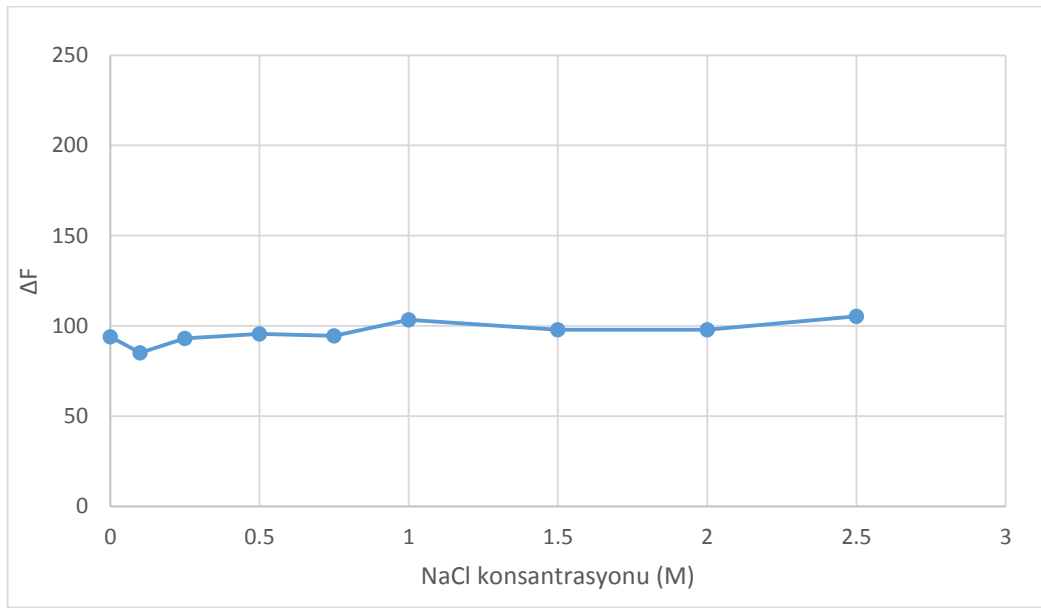
Şekil 3.43. Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların amikasin (30 $\mu\text{g/mL}$) ile etkileşimi sonucu floresans şiddeti azalmasının pH'a karşı değişimi ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 315 \text{ nm}$).



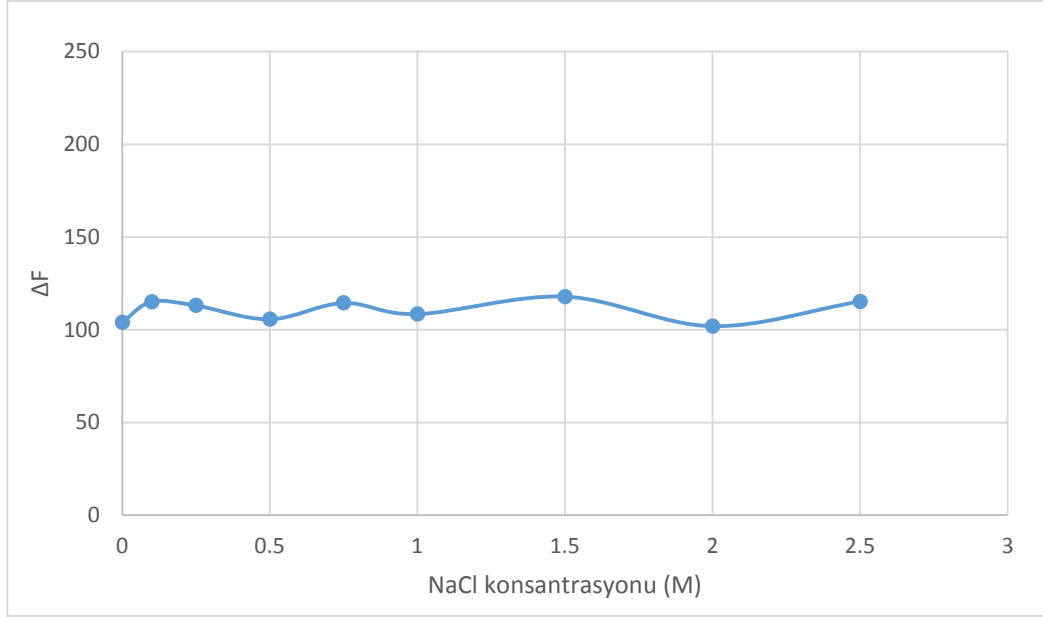
Şekil 3.44. Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların gentamisin (30 $\mu\text{g/mL}$) ile etkileşimi sonucu floresans şiddeti azalmasının pH'a karşı değişimi ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 315 \text{ nm}$).

3.3.3.2.2. İyonik şiddet

Sülfat anyonunun etkisinden kurtulduktan sonra, iyonik şiddetin etkisini ölçmek için pH 5,0'da hazırlanan tamponlara değişik oranlarda NaCl çözeltisi eklenmiş ve iyonik şiddete karşı ΔF grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.45 – 3.46). Sonuçlara göre TOB'de olduğu gibi NaCl konsantrasyonunun ΔF 'e önemli bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu yüzden AMİ ve GEN için de 2,5 M NaCl'li ortamın kullanılmasına karar verilmiştir.



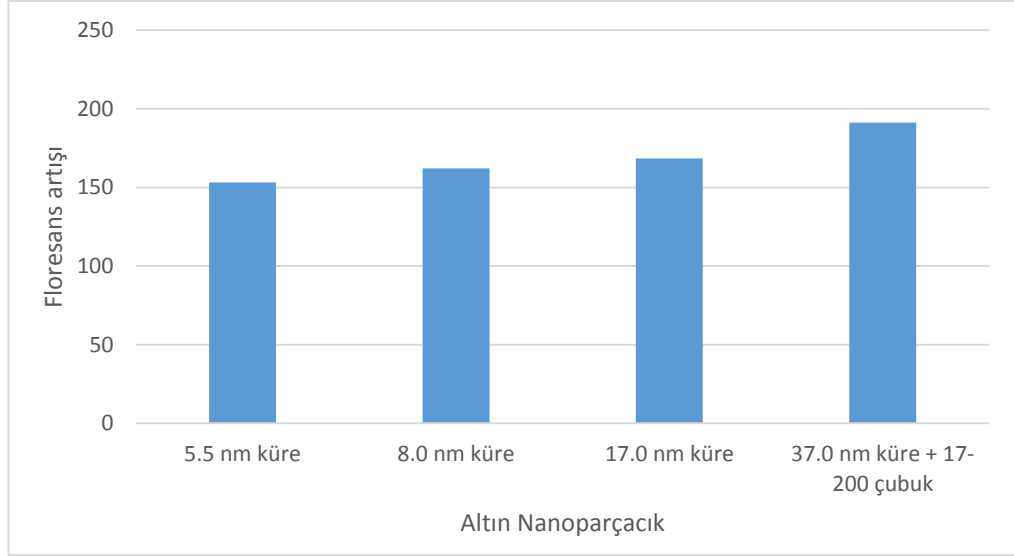
Şekil 3.45. Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıkların amikasin (12,5 $\mu\text{g/mL}$) ile etkileşimi sonucu floresans sönümlenmesinin iyonik şiddete karşı değişimi (pH 5,0; $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 315 \text{ nm}$).



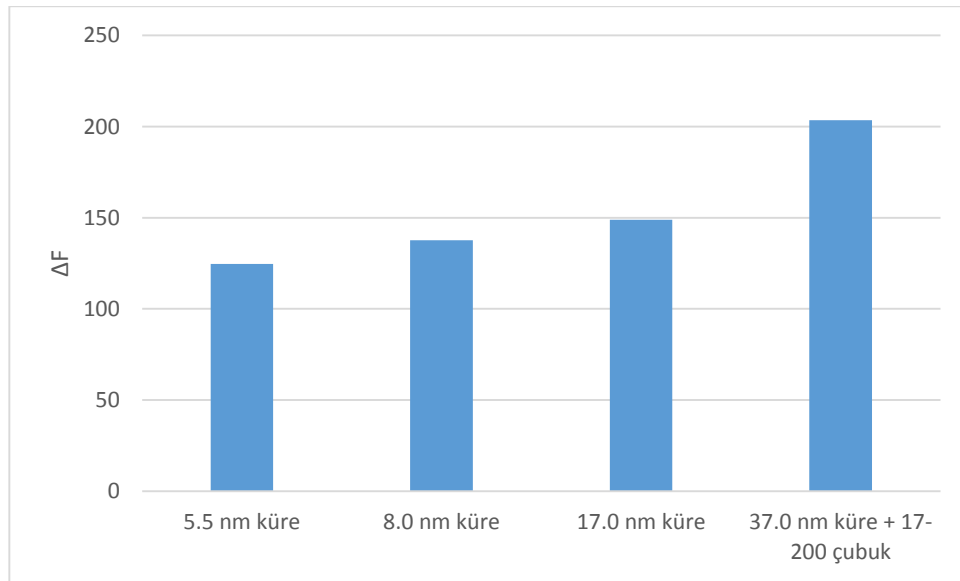
Şekil 3.46. Lipoik asitle modifiye edilmiş öropyum nanoparçacıklarının gentamisin ($12,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) ile etkileşimi sonucu floresans şiddeti azalmasının iyonik şiddete karşı değişimi (pH 5,0; $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 315 \text{ nm}$).

3.3.3.2.3. Altın nanoparçacık boyut ve şekilleri

Bölüm 2.2.2.4.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan AuNP’lar AMİ ve GEN için sinyal güçlendirmesinde kullanılmıştır. AuNP’ler aynı miktardaki kör ve numunelere (pH 5,0 ve NaCl konsantrasyonu 2,5 M) eklendikten sonra emisyon spektrumları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre TOB’de olduğu gibi 37 nm’lik küre ve 17-200 nm çubuk karışımı, diğer AuNP’lara göre sinyalleri daha fazla zenginleştirmiştir (Şekil 3.47 – 3.48) .



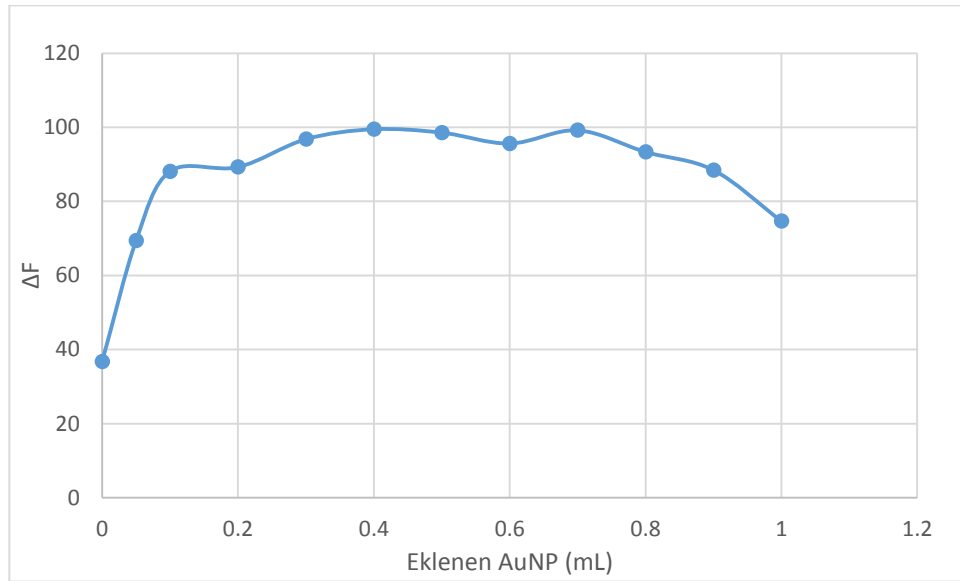
Şekil 3.47. Amikasin için altın nanoparçacık boyutuna ve şekline göre lipoik asit kaplı öropyum nanoparçacıkların floresansındaki artış



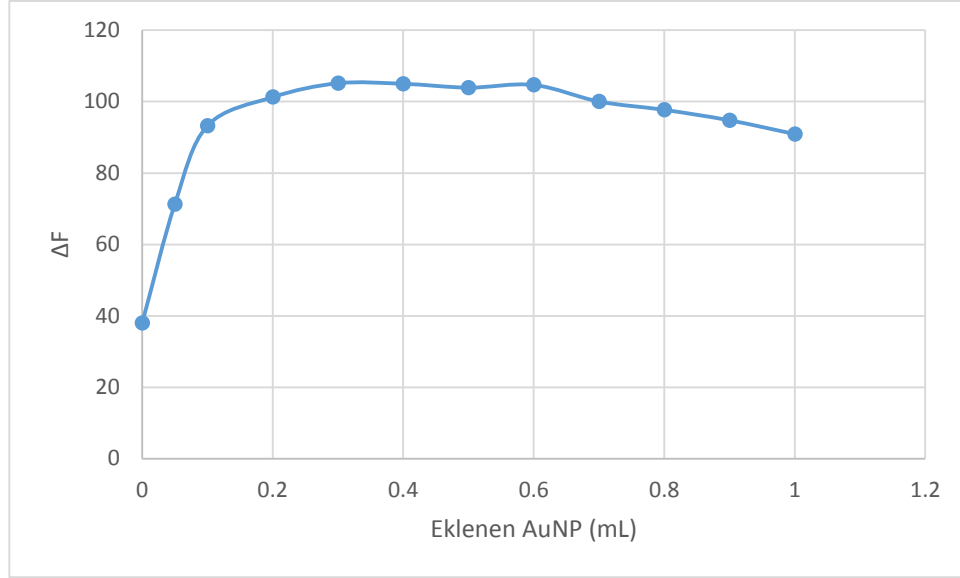
Şekil 3.48. Gentamisin için altın nanoparçacık boyutuna ve şekline göre lipoik asit kaplı öropyum nanoparçacıkların floresansındaki artış

3.3.3.2.4. Altın nanoparçacık konsantrasyonu

En yüksek sinyal zenginleştirmesini elde etmek için eklenmesi gereken nanoparçacığın miktarı belirlenmiştir. Bunun için yine kör ve tobramisin içeren çözeltilere, çözeltilerin son hacimleri aynı olacak şekilde değişik hacimlerde AuNP çözeltisinden eklenmiştir. Sonuçlar, AMİ ve GEN için 0,4 mL AuNP eklemenin, sinyalleri en güçlü oranda zenginleştirdiğini göstermiştir (Şekil 3.49-50).



Şekil 3.49. Amikasin için altın nanoparçacıkların (37 nm küre ve 17-200 nm çubuk karışımı) miktarına karşı floresans sönümlenmesinin grafiği ($\lambda_{ex} = 280$ nm $\lambda_{em} = 315$ nm).



Şekil 3.50. Gentamisin için altın nanoparçacıkların (37 nm küre ve 17-200 nm çubuk karışımı) miktarına karşı floresans sönümlenmesinin grafiği ($\lambda_{ex} = 280$ nm $\lambda_{em} = 315$ nm).

AMİ ve GEN için AuNP ile zenginleştirilmeden önceki YS sırasıyla 600 ppb ve 255 ppb olarak bulunmuştur. AuNP ile zenginleştirildikten sonra bu değer AMİ için 2,7 kat azalarak 223 ppb, GEN için ise 2,8 kat azalma ile 91 ppb olarak bulunmuştur.

3.3.4. Seçicilik Çalışmaları

Bölüm 2.2.2.5’de anlatıldığı gibi AMİ, GEN ve TOB içeren ilaçlarda kombine halde bulunan diğer etken maddeler, yardımcı maddeler, laktoz ve bazı sıkça rastlanan iyonların tolerans limitleri deneysel sonuçlardan yola çıkarak hesaplanmıştır. Bu maddelerin deney sonuçlarını $\pm\%5$ oranında etkilediği konsantrasyonlar tolerans limitleri olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.20).

Çizelge 3.20. Spektroflorimetrik metodun bazı maddelere karşı tolerans limitleri

Maddeler	Tolerans limitleri (µg/mL)
Metil- <i>p</i> -hidroksibenzoat	>1522
Propil- <i>p</i> -hidroksibenzoat	>400
Benzoat	104
Klorbütanol	>17746
Betametazon dipropiyonat	> 130
Laktoz	>34230
Gliserin	126000
Nitrit	445
Nitrat	1061
Potasyum	>7460
Karbonat	59
Asetat	727
Sodyum	>10000
Klorür	>10000

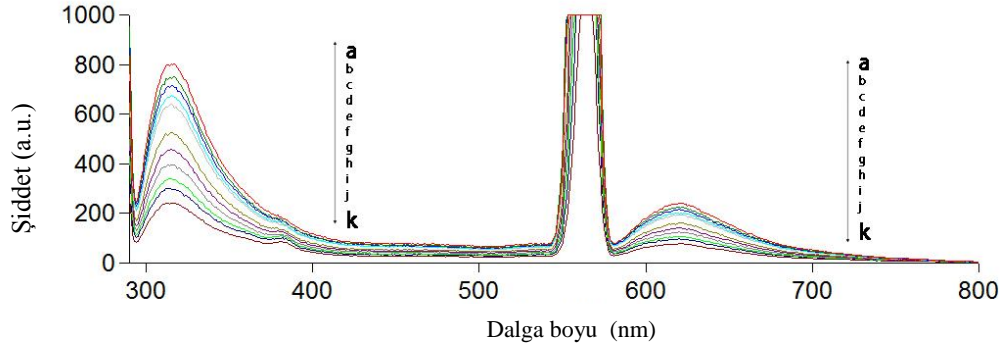
3.3.5. Spektroflorimetrik Miktar Tayini Çalışmaları

3.3.5.1. Tobramisin'in spektroflorimetrik miktar tayini

Metot optimizasyonu sonrası TOB için çalışma aralığı 0,20 – 25 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. TOB'in 2,5 M NaCl içeren pH 5,0 fosfat-sitrat tampon içerisinde, çözeltileri 3 set olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden alınan 0,5'er mL'lik kısım 1,5 mL EuNP çözeltilisine eklendikten sonra üzerine 0,4 mL AuNP eklenmiş ve hemen emisyon spektrumları ölçülmüştür. Ölçümlerde TOB konsantrasyonu arttıkça spektrumun floresans sinyallerinin azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.51). Konsantrasyona karşı ΔF grafiğe geçirildiğinde, doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. Doğrusallığın bir göstergesi olarak korelasyon katsayısı 0,9969'dur. YS $3\sigma/m$ formülünden 59,7 ng/mL olarak, TAS ise $10\sigma/m$ formülünden 199 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

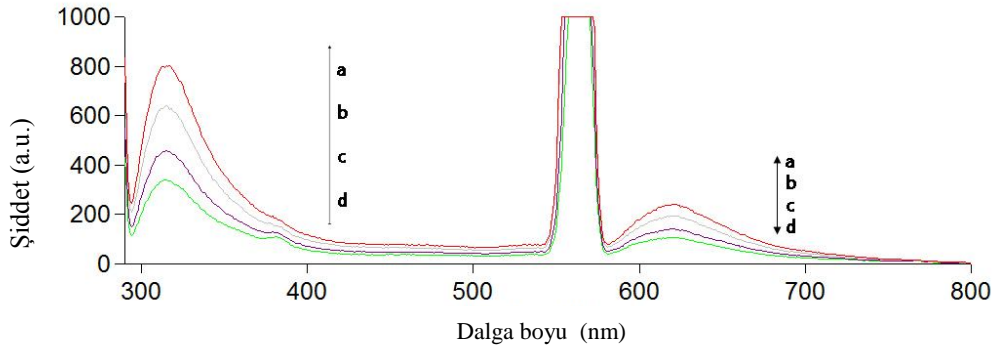
Çizelge 3.21. Tobramisin'in spektroflorimetrik analizinden elde edilen regresyon verileri

Çalışma aralığı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,20-25
Yakalama sınırı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,060
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,199
Eğim	20,58
Kesim	43,37
Korelasyon katsayısı	0,9969
Eğimin standart hatası	4,306
Kesimin standart hatası	0,303



Şekil 3.51. Artan tobramisin konsantrasyonuna [a)0 $\mu\text{g/mL}$, b)0,20 $\mu\text{g/mL}$, c)0,75 $\mu\text{g/mL}$, d)2,0 $\mu\text{g/mL}$, e)4,0 $\mu\text{g/mL}$, f)6,0 $\mu\text{g/mL}$, g)10 $\mu\text{g/mL}$, h)15 $\mu\text{g/mL}$, i)17,5 $\mu\text{g/mL}$, j)20 $\mu\text{g/mL}$, k)25 $\mu\text{g/mL}$] karşı öropyum nanoparçacıkların floresans sönümlenmesini gösteren spektrumlar

Yöntemin validasyonu için standartlar kullanılarak üçer set halinde 10, 15 ve 20 $\mu\text{g/mL}$ TOB içeren çözeltiler 2,5 M NaCl içeren pH 5,0 fosfat-sitrat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Şekil 3.52’de emisyon spektrumları görünen bu çözeltilerin üç gün süreyle analizlerinden elde edilen sonuçlar yöntemin doğruluk ve kesinlik açısından değerlendirilmesi için kullanılmıştır (Çizelge 3.22).



Şekil 3.52. Tobramisinin validasyon çözeltilerinin [a)0 $\mu\text{g/mL}$, b)10 $\mu\text{g/mL}$, c)15 $\mu\text{g/mL}$, d)20 $\mu\text{g/mL}$] analizlerinden elde edilen emisyon spektrumları

Çizelge 3.22. Tobramisinin standart çözeltileri için spektrofotometrik yöntemden elde edilen gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları

Gün-içi			
Konulan($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan($\mu\text{g/mL}$)	BSS (%)	Bağlı hata (%)
10	10,12	3,64	1,21
15	14,52	0,82	-3,20
20	20,61	1,12	3,06
Günler arası			
Konulan($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan($\mu\text{g/mL}$)	BSS (%)	Bağlı hata (%)
10	10,09	2,34	0,86
15	14,98	3,88	-0,17
20	20,53	2,35	2,67

Dayanıklılık testlerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.23’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.23. Tobramisin için pH’a bağlı olarak spektrofotometrik dayanıklılık testi sonuçları

pH	Geri kazanım (%)
4,95	103,00
5,00	102,38
5,05	101,51

3.3.5.1.1. Yöntemin tobramisin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması

3.3.5.1.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

Yardımcı maddelerin etkisi tolerans limitleri ile Çizelge 3.17'de verilmiştir. Spetroflorimetrik yöntem TOBRASED® merhemde bulunan yardımcı maddelerden klorbütanole uygulandığında herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Klorbütanol dışındaki diğer bir yardımcı madde olan vazelin suyla karışmadığı için süzme işlemi sırasında ayrılmaktadır. Farmasötik preparatlara uygulamadan önce standart ekleme yöntemi uygulanmıştır. TOBRASED® çözeltilerine standart TOB'den % 50, 75 ve 100 oranlarında eklendikten sonra miktar tayinleri yapılmış ve deney sonuçlarına herhangi bir girişim olup olmadığı test edilmiştir. Geri kazanım değerleri doğruluk parametresini göstermektedir (Çizelge 3.24).

Çizelge 3.24. TOBRASED® göz merhemi (% 0,3 TOB içermektedir; Parti no: 1041039B)'ne standart ilavesinden sonra TOB için yapılan spektrofiorimetrik deneylerin sonuçları

Eklene TOB (%)	Bulunan TOB (%)	Geri Kazanım (%)
50	50,59	101,17
50	50,23	100,47
50	49,15	98,31
75	75,68	100,90
75	72,99	97,32
75	73,02	97,36
100	101,08	101,08
100	102,05	102,05
100	97,26	97,26
Ortalama		99,55
SS		1,95
BSS		1,96
GA (p=0,05 için)		1,21

Bu işlemlerin ardından merhemlerin analizi için 1 g TOBRASED® göz merhemi (% 0,3; Parti no: 1041039B) tartılmış ve 25 mL fosfat-sitrat tamponunda çözülmüştür. Altı set olarak hazırlanan bu ilaç çözeltilerinin çözünme işleminde 10 dakika ultrasonik banyoda tutulduktan sonra, 20 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Çözeltiler 0,45 µm'lik süzgeç kağıtlarından süzülüp süzüntüden alınan 0,1 mL'lik kısım 10 mL'lik balonjojeye alınmış ve tamponla tamamlanmıştır. Buradan alınan 0,5 mL çözelti 1,5 mL EuNP çözeltisi üzerine eklendikten sonra 0,4 mL AuNP eklenmiş ve hemen ardından spektrumlar alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.25'de görülmektedir.

Çizelge 3.25. TOBRASED® göz merhemi (% 0,3 TOB içermektedir; Parti no: 1041039B)'ne spektrofotometrik yöntem uygulandığında elde edilen sonuçlar

TOB miktarı	Bulunan TOB (%)	Geri Kazanım (%)
0,30	0,31	104,3
0,30	0,30	98,5
0,30	0,31	104,5
0,30	0,30	98,9
0,30	0,31	104,8
0,30	0,30	100,5
Ortalama	0.31	101,9
SS	0.01	2,96
BSS	2.90	2,90
Bağlı hata	1,92	1,92
GA (p=0,05)	0.01	2,43

3.3.5.1.1.2.Yöntemin süte uygulanması

TOB katılmış süt örnekleri Bölüm 2.2.2.6'da anlatıldığı gibi protein ve yağlardan arındırılmıştır. EDC/NHS ile aktive edilmiş EuNP'lara numuneler eklendikten sonra AuNP eklenmiş ardından floresans sönümlenmesi üzerinden miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.26).

Çizelge 3.26. Tobramisin için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları

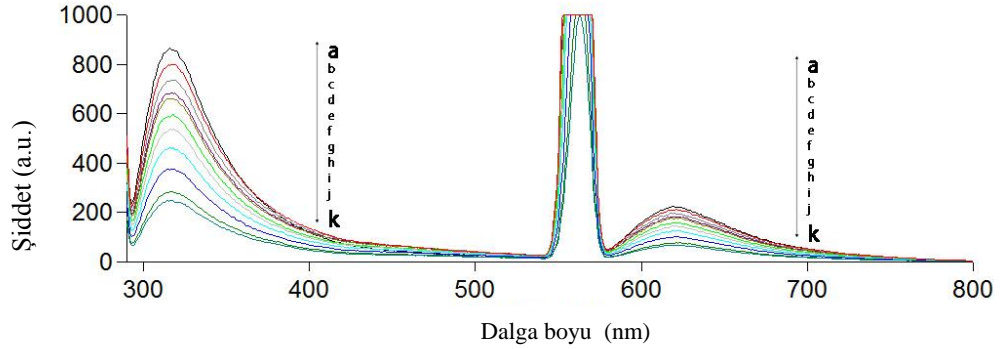
Eklenen($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)	BSS(%)
10	10,81	108,11	6,18
15	14,79	98,63	2,44
20	22,14	110,70	3,08

3.3.5.2. Gentamisin'in spektrofotometrik miktar tayini

Baryum katyonu kullanılarak sülfattan arındırılan GEN için çalışma aralığı 0,40 – 26 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. GEN'in 2,5 M NaCl içeren pH 5,0 fosfat-sitrat tampon içerisinde, çözeltileri 3 set olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden alınan 0,5'er mL'lik kısım 1,5 mL AgNP çözeltisi üzerine eklendikten sonra üzerine 0,4 mL AuNP eklenmiş ve belirlenen parametrelerde emisyon spektrumları alınmıştır. Artan GEN konsantrasyonuna karşı ΔF 'in arttığı görülmüştür (Şekil 3.53). Konsantrasyona karşı ΔF grafiğe geçirildiğinde, doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. Kalibrasyon çözeltileri için korelasyon katsayısı 0,9966'dır. Yöntemin YS $3\sigma/m$ formülünden 91,4 ng/mL olarak, TAS ise $10\sigma/m$ formülünden 304 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

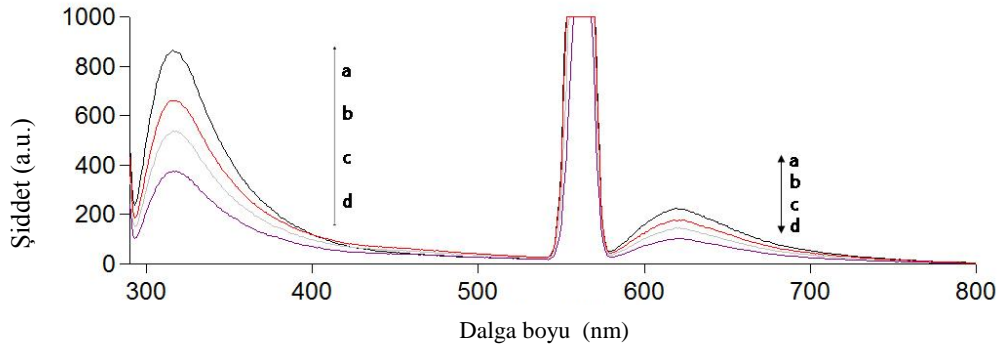
Çizelge 3.27. Gentamisinin spektrofotometrik analizinden elde edilen regresyon verileri

Çalışma aralığı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,40-26
Yakalama sınırı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,091
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,304
Eğim	21,59
Kesim	59,98
Korelasyon katsayısı	0,9966
Eğimin standart hatası	6,432
Kesimin standart hatası	0,432



Şekil 3.53. Artan gentamisin konsantrasyonuna [a)0 $\mu\text{g/mL}$, b)0,40 $\mu\text{g/mL}$, c)2,5 $\mu\text{g/mL}$, d)5,0 $\mu\text{g/mL}$, e)7,5 $\mu\text{g/mL}$, f)10 $\mu\text{g/mL}$, g)12,5 $\mu\text{g/mL}$, h)15 $\mu\text{g/mL}$, i)20 $\mu\text{g/mL}$, j)24 $\mu\text{g/mL}$, k)26 $\mu\text{g/mL}$] karşı öropyum nanoparçacıkların floresans sönümlenmesini gösteren spektrumlar

Yöntemin validasyonu için standartlar kullanılarak üç set halinde 10, 15 ve 20 $\mu\text{g/mL}$ GEN içeren çözeltiler 2,5 M NaCl içeren pH 5,0 fosfat-sitrat tampon içerisinde hazırlanmıştır. Şekil 3.54’de emisyon spektrumları görünen bu çözeltilerin üç gün süreyle analizlerinden elde edilen sonuçlar yöntemin doğruluk ve kesinlik açısından değerlendirilmesi için kullanılmıştır (Çizelge 3.28).



Şekil 3.54. Gentamisinin validasyon çözeltilerinin [a)0 µg/mL, b)10 µg/mL, c)15 µg/mL, d)20 µg/mL) analizlerinden elde edilen emisyon spektrumları

Çizelge 3.28. Gentamisinin standart çözeltileri için spektrofotometrik yöntemden elde edilen gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları

Gün-içi			
Konulan(µg/mL)	Bulunan(µg/mL)	BSS (%)	Bağlı hata (%)
10	9,74	2,26	-2,57
15	14,78	1,77	-1,48
20	20,55	0,92	2,76
Günler arası			
Konulan(µg/mL)	Bulunan(µg/mL)	BSS (%)	Bağlı hata (%)
10	9,78	1,46	-2,18
15	14,93	1,30	-0,47
20	20,52	1,00	2,59

pH 5,00 ±0,05 seviyelerinde gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçların geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.29).

Çizelge 3.29. Gentamisin için pH'a bağlı olarak spektrofotometrik dayanıklılık testi sonuçları

pH	Geri kazanım (%)
4,95	97,41
5,00	98,31
5,05	97,67

3.3.5.2.1. Yöntemin gentamisin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması

3.3.5.2.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

Spketroflorimetrik yöntem BELOGENT[®] (1mg GEN/g ; Parti no: 25063101) merhemde bulunan diğer etken madde olan betametazona uygulandığında herhangi bir girişim gözlenmemiştir (Çizelge 3.17). Standart ekleme işleminde BELOGENT[®] çözeltilerine standart GEN'den % 50, 75 ve 100 oranlarında eklendikten sonra miktar tayinleri yapılmış ve herhangi bir girişim gözlenmemiştir (Çizelge 3.30).

Çizelge 3.30. BELOGENT® merheme (1mg GEN/g ; Parti no: 25063101) standart ilavesinden sonra GEN için yapılan spektrofotometrik deneylerin sonuçları

Eklenen GEN (%)	Bulunan GEN (%)	Geri Kazanım (%)
50	51,62	103,23
50	51,09	102,18
50	51,83	103,66
75	73,77	98,37
75	74,38	99,18
75	74,30	99,06
100	104,57	104,57
100	102,49	102,49
100	100,42	100,42
Ortalama		101,46
SS		2,26
BSS		2,23
GA (p=0,05 için)		1,40

Farmasötik preparat analizi için 1 g BELOGENT® (1mg GEN/g ; Parti no: 25063101) merhem tartıldıktan sonra 4 mL 0,1 M HCl'de çözülmüştür. 10 dakika ultrasonik banyoda tutulan numune 20 dakika karıştırılmıştır. Üzerine 1 mL 0,1 M BaCl₂ çözeltisi eklenerek numunedeki sülfat anyonları çöktürülmüştür. Şırınga ucu filtre (0,45 µm delik büyüklüğünde) ile süzülen numune 20 mL'lik balon jojeye alındıktan sonra üzerine asidik ortamı nötralleştirmek amacıyla 0,1 M NaOH çözeltisinden 4 mL eklenmiştir. Balon jojedeki çözelti, 2,5 M NaCl içeren pH 5 fosfat-sitrat tamponu kullanılarak 20 mL'ye tamamlanmıştır. Altı set olarak hazırlanan bu çözeltilerden 1,5 mL alınarak 5 mL'ye yine aynı tampon ile seyreltilmiştir. Buradan

alınan 0,5 mL numune 1,5 mL EuNP çözeltisine eklendikten sonra 0,4 mL AuNP eklenmiş ve hemen ardından spektrumlar alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.31’de görülmektedir.

Çizelge 3.31. BELOGENT® merhem’in (1 mg GEN / 1 g merhem) miktar tayini sonuçları

GEN miktarı (mg)	Bulunan GEN (mg)	Geri Kazanım (%)
1,00	0,97	97,48
1,00	0,98	98,05
1,00	1,00	99,80
1,00	1,00	99,85
1,00	1,01	101,15
1,00	1,01	101,42
Ortalama	1.00	99,62
SS	0.02	1,59
BSS	1.60	1,60
Bağlı hata	-0,38	-0,38
GA (p=0,05 için)	0.01	1,29

3.3.5.2.1.2. Yöntemin süte uygulanması

Bölüm 2.2.2.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan GEN eklenmiş süt örneklerinin spektrofotometrik analizleri gerçekleştirilmiştir. Üç konsantrasyonda üç set halinde hazırlanan örneklerin sonuçları Çizelge 3.32’de görülmektedir.

Çizelge 3.32. Gentamisin için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları

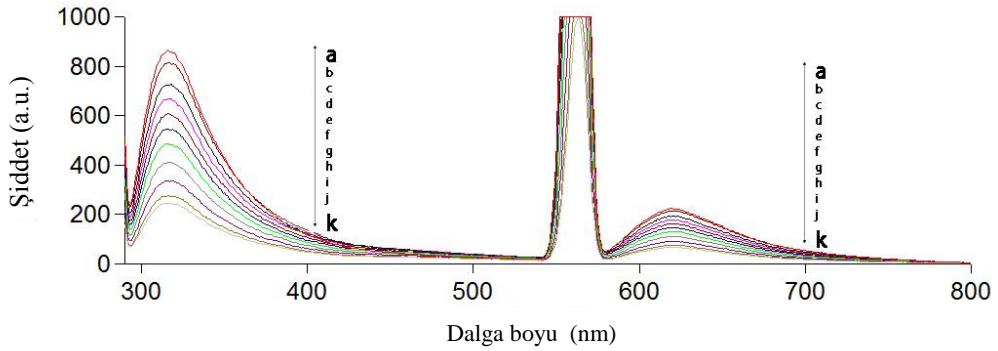
Eklenen($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)	BSS(%)
10	11,27	112,72	3,98
15	16,92	112,82	1,04
20	20,81	104,05	0,90

3.3.5.3. Amikasinin spektrofotometrik miktar tayini

GEN için olduğu gibi, sülfattan arındırılan AMİ için çalışma aralığı 0,75 – 27,5 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. GEN'in 2,5 M NaCl içeren pH 5,0 fosfat-sitrat tampon içerisinde, çözeltileri 3 set olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden alınan 0,5'er mL'lik kısım 1,5 mL AgNP çözeltisi üzerine eklendikten sonra üzerine 0,4 mL AuNP eklenmiş ve belirlenen parametrelerde emisyon spektrumları alınmıştır. Artan GEN konsantrasyonuna karşı ΔF 'in arttığı görülmüştür (Şekil 3.55). Konsantrasyona karşı ΔF grafiğe geçirildiğinde, doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. Kalibrasyon çözeltileri için korelasyon katsayısı 0,9965'dir. Yöntemin YS $3\sigma/m$ formülünden 223 ng/mL olarak, TAS ise $10\sigma/m$ formülünden 746 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

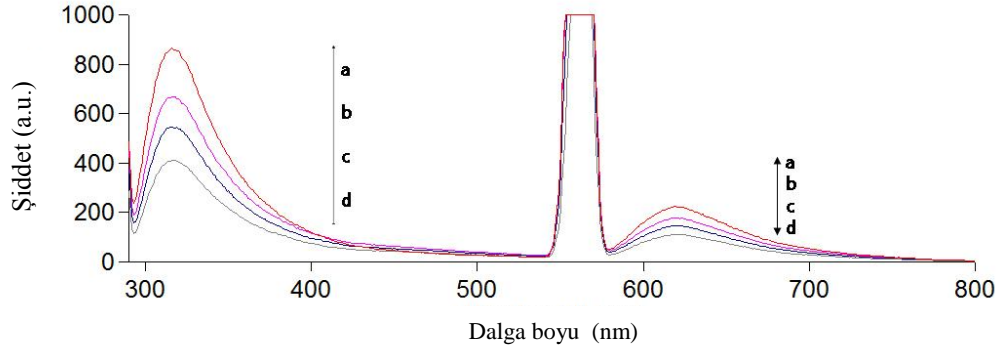
Çizelge 3.33. Amikasinin spektrofotometrik analizinden elde edilen regresyon verileri

Çalışma aralığı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,75-27,5
Yakalama sınırı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,223
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,746
Eğim	21,60
Kesim	36,82
Korelasyon katsayısı	0,9965
Eğimin standart hatası	4,485
Kesimin standart hatası	0,443



Şekil 3.55. Amikasin konsantrasyonuna [a)0 $\mu\text{g/mL}$, b)0,75 $\mu\text{g/mL}$, c)5,0 $\mu\text{g/mL}$, d)7,5 $\mu\text{g/mL}$, e)10 $\mu\text{g/mL}$, f)12,5 $\mu\text{g/mL}$, g)15 $\mu\text{g/mL}$, h)20 $\mu\text{g/mL}$, i)22,5 $\mu\text{g/mL}$, j)25 $\mu\text{g/mL}$, k)27,5 $\mu\text{g/mL}$] karşı öropyum nanoparçacıkların floresans sönümlenmesini gösteren spektrumlar

Yöntemin geçerliliğini test etmek için standartlar kullanılarak üç set halinde 10, 15 ve 20 $\mu\text{g/mL}$ AMİ içeren çözeltiler 2,5 M NaCl içeren pH 5,0 fosfat-sitrat tampon içerisinde hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar (Şekil 3.56) yöntemin doğruluk ve kesinlik açısından değerlendirilmesi için kullanılmıştır (Çizelge 3.34).



Şekil 3.56. Amikasinin validasyon çözeltilerinin analizlerinden elde edilen emisyon spektrumları [a) 0 µg/mL, b)10 µg/mL, c)15 µg/mL, d)20 µg/mL]

Çizelge 3.34. Amikasinin standart çözeltileri için spektrofotometrik yöntemden elde edilen gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları

Gün-içi			
Konulan(µg/mL)	Bulunan(µg/mL)	BSS (%)	Bağlı hata (%)
10	10,26	1,00	2,64
15	14,91	0,87	-0,57
20	20,01	0,36	0,03
Günler arası			
Konulan(µg/mL)	Bulunan(µg/mL)	BSS (%)	Bağlı hata (%)
10	10,11	1,86	1,10
15	14,97	1,07	-0,17
20	19,87	1,06	-0,67

Bölüm 2.2.2.5’de anlatıldığı gibi pH için gerçekleştirilen dayanıklılık testinin geri kazanım sonuçları Çizelge 3.35’de görülmektedir.

Çizelge 3.35. Amikasin için pH'a bağlı olarak spektrofotometrik dayanıklılık testi sonuçları

pH	Geri kazanım (%)
4,95	98,14
5,00	100,70
5,05	99,11

3.3.5.3.1. Yöntemin amikasin içeren farmasötik preparatlara ve süte uygulanması

3.3.5.3.1.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

Spketroflorimetrik yöntem DRAMIGEL[®] jelde (%5 AMİ; Parti No: C0681) bulunan yardımcı maddelerden metil paraben, propil paraben ve gliserine uygulandığında herhangi bir girişim gözlenmemiştir (Çizelge 3.17). Farmasötik preparata uygulamaya geçmeden önce standart ekleme yöntemi uygulanmıştır. Bu işleminde DRAMIGEL[®] çözeltilerine standart AMİ'den % 50, 75 ve 100 oranlarında eklendikten sonra miktar tayinleri yapılmış ve yardımcı maddelerden herhangi bir girişim gözlenmemiştir (Çizelge 3.36).

Çizelge 3.36. DRAMIGEL® jele (%5 AMİ; Parti No: C0681) standart ilavesinden sonra AMİ için yapılan spektrofotometrik deneylerin sonuçları

Eklenen AMİ (%)	Bulunan AMİ (%)	Geri Kazanım (%)
50	50,37	100,74
50	50,58	101,16
50	49,25	98,50
75	74,90	99,87
75	73,37	97,83
75	73,07	97,42
100	97,78	97,78
100	97,92	97,92
100	98,67	98,67
Ortalama		98,88
SS		1,38
BSS		1,39
GA (p=0,05 için)		0,85

Farmasötik preparat analizi için 0,5 g DRAMIGEL® (% 5 AMİ; Parti no: C0681) jel tartıldıktan sonra 20 mL 0,1 M HCl'de çözülmüştür. 10 dakika ultrasonik banyoda tutulan numune 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Üzerine 5 mL 0,1 M BaCl₂ çözeltisinde eklenerek numunedeki sülfat anyonları çöktürülmesi sağlanmıştır. Süzgeç kağıdı ile süzülen numune 100 mL'lik balon jøjeye alındıktan sonra üzerine asidik ortamı nötralleştirmek amacıyla 0,1 M NaOH çözeltisinden 20 mL eklenmiştir. Balon jøjedeki çözelti, 2,5 M NaCl içeren pH 5 fosfat-sitrat tamponu kullanılarak 100 mL'ye tamamlanmıştır. Altı set olarak hazırlanan bu çözeltilerden 0,75 mL alınarak 10 mL'ye yine aynı tampon ile seyreltilmiştir. Buradan alınan 0,5 mL çözelti 1,5 mL

EuNP çözeltisi üzerine eklendikten sonra 0,4 mL AuNP eklenmiş ve hemen ardından spektrumlar alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.37’de görülmektedir.

Çizelge 3.37. DRAMIGEL® (% 5 AMİ; Parti no: C0681) miktar tayini sonuçları

AMİ miktarı (%)	Bulunan AMİ (%)	Geri Kazanım (%)
5,00	5,09	101,79
5,00	5,17	103,40
5,00	5,12	102,30
5,00	5,03	100,70
5,00	4,96	99,29
5,00	5,21	104,17
Ortalama	5,10	101,94
SS	0,09	1,78
BSS	1,74	1,74
Bağlı hata	1,94	1,94
GA (p=0,05 için)	0,07	1,46

3.3.5.3.1.2. Yöntemin süte uygulanması

Proteinler ve yağlardan arındırılan (Bölüm 2.2.2.6) AMİ katılmış süt örneklerinin spektrofotometrik analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerin sonuçları Çizelge 3.38’de görülmektedir.

Çizelge 3.38. Amikasin için sütte yapılan spektrofotometrik analizlerin sonuçları

Eklenen($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)	BSS(%)
10	10,48	104,80	9,23
15	14,47	96,45	2,34
20	22,58	112,89	3,80

4. TARTIŞMA

4.1. Spektrofotometrik Çalışmalar

Spektrofotometrik çalışmalarda modifiye edilmemiş AgNP ile AMİ, GEN ve TOB'un tayinleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan AgNP'ların indirgenmesi için NaBH₄, stabilizasyonu için ise SDS kullanılmıştır. Genel olarak kolloidal çözeltilerde stabilizasyon mekanizmalarının beş yolla yürüdüğü düşünülür: elektrostatik stabilizasyon, sterik stabilizasyon, hidrasyon kuvvetleriyle stabilizasyon, tüketme stabilizasyonu ve Van der Waals kuvvetleriyle stabilizasyon (DOBIAS ve ark., 1999). İnorganik kolloidlerde sistemin stabilizasyonu elektrostatik itme kuvvetleri ve Van der Waals kuvvetleri ile olurken, SDS gibi parçacıkların yüzeyine tutunan polimerik materyallerde, stabilizasyon mekanizması biraz karmaşıktır. SDS'in stabilizasyon mekanizmasının yukarıda bahsedilen mekanizmalardan üçü ile olduğunu varsaymaktayız. Bunlar; elektrostatik stabilizasyon, sterik stabilizasyon ve hidrasyon kuvvetleridir (Kim ve ark., 2004). Bu yöntemde kullanılan SDS'in konsantrasyonu AgNP'ların büyüklüğü ve dağılımı üzerindeki en etkili faktördür. Sentezde SDS/AgNO₃ ve NaBH₄/AgNO₃ oranları 5 tutularak, dar ve güçlü absorbansa sahip pikler elde edilmiştir. UV-GB spektrumunda 394 nm'de bu dar ve yüksek pik görülmektedir (Şekil 3.5).

Yine sentezlenen sarı renkli AgNP'ların TEM görüntülerinden parçacıkların küresel oldukları görülmektedir (Şekil 3.6).

Aynı zamanda kesin veriler alınamamakla birlikte, DLS yöntemiyle parçacıkların boyutu 98% oranında 9-11 nm aralığında olduğu görülmüştür. Hem TEM görüntülerinden hem de UV-GB spektrumundan elde edilen sonuçlar, bu DLS ölçümlerini doğrulamaktadır. UV-GB spektrumunda 394 nm'de elde edilen pik, parçacık boyutunun 10 nm civarında olduğunu göstermektedir. Solomon ve ark.nın (2007) AgNP sentezi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, parçacık boyutu 10-14 nm aralığında olduğunda λ_{max} 'ın 395-405 nm aralığında; parçacık boyutu 35-50 nm

aralığında olduğunda λ_{\max} 'ın 420 nm civarında; parçacık boyutu 60-80 nm aralığında olduğunda ise λ_{\max} 'ın 438 nm civarında olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca sentezlediğimiz AgNP'dan elde edilen pikin yarı maksimumundaki pik genişliği 47 nm'dir ve bu değer de parçacık boyutu - λ_{\max} değerleriyle uyumludur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Gümüş nanoparçacıkların partikül büyüklüğü ve spektral özellikleri (Solomon ve ark., 2007)

Parçacık boyutu (nm)	λ_{\max} (nm)	Yarı maksimumdaki pik genişliği (nm)
10-14	395-405	50-70
35-50	420	100-110
60-80	438	140-150

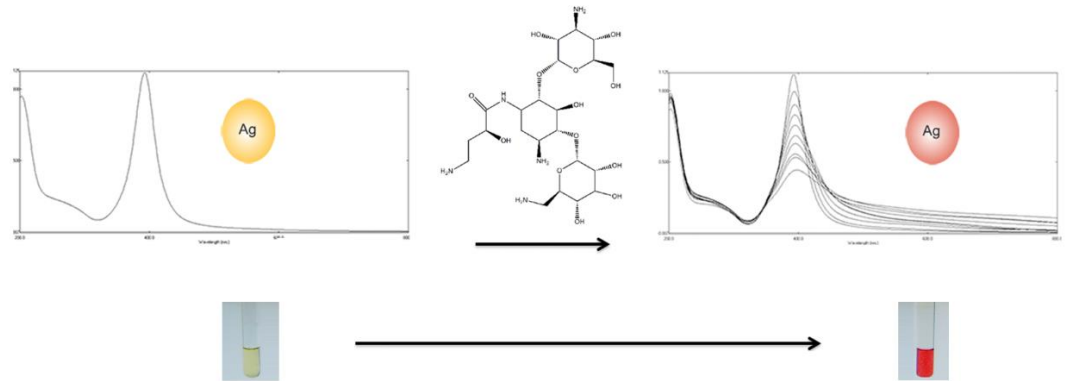
AgNP'ların spektrumları; nanoparçacıkların büyüklüğüne, şekline, ortamın bileşimine, yüzeyindeki türlere ve agregasyon seviyesine bağlıdır. Aminoglikozidlerin AgNP'a eklenmesi, AgNP'ın renginin sarıdan turuncu ve kırmızıya doğru değişmesine ve spektrumda 394 nm'deki pikin şiddetindeki azalmaya ve daha yüksek dalga boylarında ise artışa yol açmaktadır. Bunun nedenleri şöyle olabilir:

- Tiol, amin ve fosfin gibi elektron veren gruplar, inorganik yüzeylere karşı yüksek afinite göstermektedirler. Bu nedenle de bu grupları içeren moleküller nanoparçacık sentezinde stabilizör olarak kullanılabilirler. İnorganik yüzeylere karşı nanoparçacığın yüzeyindeki stabilizörden daha yüksek afinite gösteren bir molekül ortama eklendiğinde ligand-değişimi gözlenebilir. Tiol, amin fosfin gibi grupları içeren ligandlar etkili bir şekilde organik yüzey aktif maddeler ile yer değiştirebilirler (Sperling, 2008). Dolayısıyla SDS ile stabilize edilmiş AgNP'ların yüzeyinde, amin grupları içeren aminoglikozidler ile SDS yer değiştirmiş olabilir. Böyle bir yer değiştirme nanoparçacıkların optik özelliklerinde değişime yol açacaktır çünkü metal nanoparçacıkların optik özellikleri yüzeyinde bulunan türlere bağlıdır (Zhang ve ark 2002).

Aminoglikozidler AgNP'lara eklendiğinde gözlenen renk ve buna bağlı olarak spektrum değişimlerinin nedenlerinden biri bu olabilir.

- b) Bir başka neden ise aminoglikozidlerin SDS ile etkileşime girerek AgNP'ların stabilizasyonunu bozması ve AgNP'ların aggregasyonuna neden olması olabilir. Aminoglikozidlerin varlığında AgNP'ların aggregasyon seviyesinde gerçekleşecek bir değişim, spektrumda ve dolayısıyla çözeltinin renginde de değişimlere yol açacaktır.

Ayrıca bu değişim; AgNP'ların sarı renkli çözeltilerinin renklerinin değişmesine de neden olmuş ve gözle tayin yapmak mümkün olmuştur (Şekil 3.10 – 3.12 ve 4.1). AgNP'ların rengi aminoglikozidler eklendiğinde sarıdan turuncuya ve kırmızıya doğru konsantrasyona ve zamana bağlı olarak değişmektedir.



Şekil 4.1. Aminoglikozidlerin spektrofotometrik analizlerinin şematik gösterimi

Metot optimizasyonu çalışmalarında deneysel faktörler olarak pH, iyonik şiddet ve zaman belirlenmiştir. pH ve iyonik şiddet optimizasyonunda ΔA değerini en yüksek tutacak koşullar en uygun koşullar olarak belirlenirken, zaman çalışmasında spektrumun sabitlendiği süre uygun süre olarak belirlenmiştir.

pH çalışmasında en uygun değerler olarak belirlenen değerler hafif asidik bölgededir. AMİ için optimum pH değeri 5,0 olarak bulunurken (Şekil 3.14), GEN ve

TOB için pH 4,5 (Şekil 3.15 - 3.16) olarak bulunmuştur. Çok düşük pH'larda AgNP kendi kendine aggregasyona uğradığı için AgNP'ların pik şiddeti azalmaktadır. Dolayısıyla düşük pH'larda ΔA değeri de düşük olmaktadır. Bazik bölgede ise AgNP kendi kendine aggregasyona uğramamakla birlikte, aminoglikozidlerin ortama eklenmesi spektrumda çok az ya da hiç etki göstermemektedir. ΔA değerleri bazik bölgede çok düşük olarak görülürken hafif asidik bölgede yüksek olmasının nedeni aminoglikozidlerin amin gruplarının protonlanmasından kaynaklanabilir. En uygun pH değerleri olarak belirlenen değerler, aminoglikozidlerin protonlandığı ama AgNP'ların kendi kendine aggregasyona uğramadığı pH'lardır.

Spektrofotometrik deneylerde iyonik şiddeti optimize edilmesi için NaCl kullanılmıştır. pH kadar etkili olmasa da iyonik şiddetin de kontrol altına alınması gerektiği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre en uygun NaCl konsantrasyonları AMİ için 2,5 mM, GEN ve TOB için ise 5,0 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 3.17 – 3.19).

Kontrol edilmesi gereken bir diğer faktör ise süredir. Aminoglikozidler AgNP'lara eklendikten sonra hem spektrumlarında hem de renklerdeki değişimin zamana bağlı olduğu görülmüştür. Belli aralıklarla alınan spektrumlara göre AMİ için 50 dakika, GEN ve TOB için ise 60 dakikadan sonra spektrumlarda bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 3.20 – 3.22). Kantitatif tayinleri gerçekleştirmek için bu sürenin beklenmesi hem duyarlılık açısından hem de yöntemin doğruluk ve kesinliği açısından önemli olduğu anlaşılmıştır.

Metot optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum şartlarda yapılan deneylerde gözlenen tayin sınırları, aynı deneyin saf suda yapıldığındaki tayin sınırlarından yaklaşık 10 kat kadar daha düşüktür.

Analitik işlemlerin validasyonu ile ilgili ICH kılavuzlarında ilaç analizleri için zorunlu olarak belirtilen parametrelerden YS, TAS, doğrusalılık, çalışma aralıkları, doğruluk, kesinlik, seçicilik gibi parametreler spektrofotometrik yöntemin validasyonu için belirlenmiştir.

YS ve TAS değerleri açısından, geliştirilen yöntemin tezin amaçları arasında yer alan sütte kalıntı analizlerine imkan verecek duyarlılıkta bir yöntem olduğu görülmektedir. Yöntemde GEN için YS değeri 2,85 ng/mL, TAS değeri 8,63 ng/mL olarak bulunmuştur. Bu değerler yöntemin Avrupa Birliği, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Dünya Sağlık rgt tarafından sütte maksimum kalıntı limitleri olarak belirlenen değerlerin altındadır. AMİ ve TOB için ise YS değerleri sırasıyla 14,94 ng/mL ve 4,67 ng/mL; TAS değerleri ise sırasıyla 45,26 ng/mL ve 14,14 ng/mL'dir.

Doğrusallık; standart zltelerin konsantrasyonu ile ΔA değerleri arasındaki korelasyon katsayıları kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu değerler AMİ, GEN ve TOB için sırasıyla 0,9946; 0,9930 ve 0,9981'dir. Elde edilen bu korelasyon katsayıları yöntemin doğrusallık açısından kabul edilebilir olduğunu göstermektedir.

Çalışma aralıkları belirlenirken ΔA 'nın konsantrasyona karşı doğrusal olarak arttığı sınırlar belirlenmiştir. AMİ, GEN ve TOB için çalışma aralıkları sırasıyla; 60-100 ng/mL; 20-60 ng/mL ve 22,5-60 ng/mL'dir. Bu konsantrasyonların üzerindeki konsantrasyonlarda doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir.

ICH kılavuzu (1994) doğruluk parametresinin, bilinen saflıktaki analitlerin analizleriyle değerlendirilebileceğini belirtmiştir. Çalışmamızda standartlar ile hazırlanan sentetik zlteler analiz edilmiş ve doğruluk değerleri yüzde geri kazanım ve bağıl hata şeklinde belirtilmiştir. Çizelge 3.2, 3.8 ve 3.14'de gün-içi ve günler-arası deneylerinde elde edilen sonuçlar yöntemin doğruluğunu kanıtlamaktadır.

Kesinlik alışmalarında ICH kılavuzunda (1994) belirtilen tekrar edilebilirlik çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada üç farklı konsantrasyonda standartlar kullanılarak hazırlanan zlteler  gün boyunca günde üç kez analiz edilmiştir. Elde edilen bağıl standart sapma değerleri yöntemin kesinliğini değerlendirmekte kullanılmıştır. Çizelge 3.2, 3.8 ve 3.14'deki BSS değerleri yöntemin tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir.

Seçicilik çalışmalarında yöntemi etkilemesi muhtemel yardımcı maddeler, diğer etken maddeler ve süt şekeri olan laktozun yönetime etkisi incelenmiştir. Geliştirilen yöntem çalışılan ilaçlarda yardımcı madde olarak bulunan metil-*p*-hidroksibenzoat, propil-*p*-hidroksibenzoat, gliserin, klorbutanol ve sodyum benzoata karşı seçici olduğu görülmüştür. GEN ile birlikte kombine olarak bulunan betametazon dipropiyonata karşı yapılan deneylerde de yöntemin seçici olduğu kanıtlanmıştır. Molekül yapısı aminoglikozidlere benzeyen ve sütte bulunan laktozun da girişim yapmadığı deneysel olarak gözlenmiştir. EDTA ile yapılan deneylerde ise yöntemin EDTA'ya karşı seçici olmadığı görülmüştür. Ampul preparatları gibi EDTA içeren numunelere yöntem uygulanmak istenirse bir ön işlem ile EDTA'nın uzaklaştırılması gerekmektedir.

Yöntem ilaçlara uygulanmadan önce, standart ekleme işlemi yapılarak yönetime herhangi bir girişim olup olmadığı ve yöntemin ilaçlar için doğru sonuç verip vermeyeceği test edilmiştir. AMİ, GEN ve TOB içeren ilaçlara %50, 75 ve 100 oranlarında standartlardan eklendikten sonra geri kazanım sonuçları değerlendirilmiştir. AMİ için % 99,73; GEN için % 101,23 ve TOB için %98,54 olarak bulunan ortalama geri kazanım değerleri yöntemin doğru sonuçlar verdiğini göstermektedir.

ICH kılavuzlarında (1994) zorunlu olarak belirtilen parametrelerin dışında yöntemin dayanıklılığı da test edilmiştir. Bunun için metot parametrelerinde yapılan değişikliklerde yöntemin güvenilir sonuçlar verip vermediği kontrol edilmiştir. Metot parametreleri olarak pH, iyonik şiddet ve zaman belirlenmiştir. Bu faktörlerin seviyeleri belirsizlik değerleri kullanılarak hesaplanmıştır (Heyden ve ark., 2001). pH dayanıklılık testlerinde belirsizlik kaynağı olarak kullanılan pHmetrenin belirsizliği (0,01), dayanıklılık testlerinde varsayılan katsayı olan 5 ile çarpılarak, optimum pH değerlerinin $\pm 0,05$ seviyelerinde yöntem test edilmiştir. İyonik şiddet deneylerinde ise kullanılan balon jöjelerin, mikropipetlerin, hassas terazinin toplam belirsizliği hesaplanmıştır. Optimum NaCl konsantrasyonu 2,5 mM olan AMİ için belirsizlik değeri 0,01 olarak hesaplanmış ve $\pm 0,05$ seviyelerinde yöntemin dayanıklılığı test edilmiştir. Belirsizlik değerleri 0,02 olan GEN ve TOB için ise, 5,0 mM olan optimum değerinin $\pm 0,10$ seviyelerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçlarına göre

AMİ için pH $\pm 0,05$ değiştirildiğinde geri kazanım değerleri %98,08 – 100,61 arasında; iyonik şiddet $\pm 0,05$ değiştirildiğinde yüzde geri kazanım %99,05 – 99,87 arasında ve zaman için ± 1 dakika değiştirildiğinde; 100,40 – 100,50 arasında sonuçlar elde edilmiştir. GEN için pH çalışmasında %99,82 – 101,94; iyonik şiddet çalışmasında 100,03 – 103,00 ve zaman çalışmasında %102,15 – 102,47 arasında geri kazanım değerleri elde edilmiştir. TOB için bulunan geri kazanım sonuçları pH dayanıklılık deneyinde %98,16 – 101,17; iyonik şiddet dayanıklılık deneyinde % 98,92 – 103,48 ve zaman deneyinde % 101,30 – 101,69 aralığında olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu değerler yöntemin belirlenen faktörlerde dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Valide edilen spektrofotometrik yöntem, farmasötik preparatlara ve standart madde eklenmiş süt örneklerine uygulanmıştır. Aminoglikozidler sulu ortamda çok iyi çözünürler. AMİ, GEN ve TOB, farmasötik preparatlar olarak seçilen jel ve merhemlerden tampon çözeltilere kolayca alınmışlardır. Yapılan analizlerden elde edilen geri kazanımlar belirtilen değerlere oldukça yakındır. %5 AMİ içeren DRAMIGEL® jelde AMİ içeriği %4,97, BSS değeri %1,26 olarak bulunmuştur. BELOGENT® (1 mg GEN/ g) merhemde GEN miktarı 1,03 mg/g, BSS değeri %1,75 olarak bulunmuştur. TOBRASED® göz merheminde (%0,3 TOB) ise TOB miktarı %0,29, BSS %3,11 olarak bulunmuştur.

Süt şekeri olan laktozun AgNP ile etkileşip etkileşmediği test edilmiştir. Bunun için hazırlanan yüksek konsantrasyondaki laktoz çözeltisinden (0,1 M) alınan 1 mL'lik kısım 3 mL AgNP çözeltisine eklenmiştir. AgNP çözeltisinin sarı renginde ve UV-GB spektrumunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

Süt analizleri için marketlerde satılan sütlerden alınan örneklere etken maddeler katılarak analizler yapılmıştır. Eklenen aminoglikozid miktarları validasyon çalışmalarında belirlenen miktarlarda olduğu gibi düşük, orta ve yüksek seviyelerde belirlenmiştir.

Süt analizlerinde öncelikle sütlere aminoglikozid standartlarından eklenmiştir. Analiz işlemlerine geçilmeden önce süt, içerisindeki protein ve yağdan arındırmak için

çeşitli ön işlemlerden geçirilmiştir. Proteinler deney sonuçlarına pozitif girişim yapabilmektedirler, bu yüzden proteinleri dikkatlice ayırmak gereklidir. Bunun için trikloroasetik asit kullanılmıştır ve +4°C’de yüksek hızlarda santrifüj yapılarak proteinlerin etkili bir şekilde çökmesi sağlanmıştır. Aminoglikozidler proteinlere büyük oranda bağlanmazlar (McGlinchey ve ark., 2008), bu nedenle deproteinazyon işlemi sırasında AMİ, GEN ve TOB için kayda değer bir kayıp yaşanmamıştır. Deproteinizasyon işlemi sırasında yüksek hızda santrifüj yapıldığı için sütteki yağlar da numunenin üst kısmında bir faz oluşturmaktadır. Bu faz bir spatül yardımı ile atılabileceği gibi, numune çok çalkalanmadan orta kısmında bir pipet yardımıyla alınarak da yağ tabakasından arındırılabilir. Ancak deneyde yağ fazı etken maddelerin AgNP ile etkileşimini önlemektedir. Bu yüzden etkili bir arındırma için santrifüj tüplerine trikloroasetik asit dışında kloroform da eklenmiştir. Alınan süzüntüye NaOH eklenerek kalan yağlar da çöktürülmüş ve ikinci bir santrifüj ile bunlar da atılmıştır. Ayrıca bütün bu işlemlerden sonra örnekler 0,22 µm’lik membran filtrelerden süzülerek hem kalabilecek yağların hem de sütteki diğer partiküllerin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Bu deneylerde elde edilen spektrumlardan görüldüğü gibi kantitatif tayin için kullanılan 394 nm’de herhangi bir girişim gözlenmezken, 200-240 nm arasında spektruma girişim gözlenmektedir (Şekil 3.25).

Sütlerin analizlerinden elde edilen geri kazanım sonuçları AMİ için %89,93 – 96,52 aralığında; GEN için % 87,08 – 114,83 ve TOB için %90,54 – 93,85 aralığındadır. BSS değerleri ise AMİ için %3,32 – 5,09; GEN için % 4,39 – 9,08; TOB için ise % 3,30 – 9,76 aralığındadır. Bu değerler Avrupa Komisyonu’nun “Yiyecek ve yemlerde kalıntı analizleri için metot validasyonu ve kalite kontrol prosedürleri”nde (2011) belirlenen geri kazanım için % 70 – 120 aralığı; BSS için ise < %20 kriterlerine uygundur.

4.2. Spektroflorimetrik Çalışmalar

Spektroflorimetrik çalışmalarda temel olarak, aminoglikozidlerin lipoik asitle modifiye edilmiş EuNP'ların floresansını sönmülmesi üzerinden tayin gerçekleştirilmiş ve yöntemin duyarlılığı AuNP kullanılarak artırılmıştır.

Floresans sönmülmesinin türünü belirlemek için yapılan çalışmalarda, temel olarak statik bir sönmülme olduğu bulunmuştur. Dinamik sönmülmede; floresans veren türün UV absorpsiyon spektrumu, sönmülmeye neden olan molekülün varlığından etkilenmez (Gong ve ark 2007). Bu tür sönmülmede, etkileşim, floresans veren türün uyarılmış halinde gerçekleşir. Statik sönmülmede ise floresans yapan tür ile sönmüleyiciden yeni bir bileşik oluştuğu için UV spektrumunda değişimler gözlenir. Yapılan deneylerde EuNP'ın UV spektrumlarının TOB varlığında ciddi oranda değiştiği gözlenmiştir (Şekil 3.27). Bu sönmülme türünün statik olabileceğine dair ilk bulgularımızdır. AMİ ve GEN için ise sülfatlı formlarında spektrumda çok az değişim gözlenirken (Şekil 3.28), sülfattan arındırılmış formlarında UV spektrumlarının büyük oranda değiştiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.29). Bu deneylerden çıkarılacak sonuç; aminoglikozidler ile lipoik asit ile modifiye edilmiş EuNP arasında reaksiyon gerçekleşmektedir, ancak bu reaksiyon sülfat anyonunun varlığında verimli bir şekilde gerçekleşmemektedir. AMİ ve GEN'in sülfat tuzlarının, EuNP'ların floresans spektrumlarına etkisi incelendiğinde de anlamlı bir eğilim gözlenmemiştir. Bunun nedeni de sülfatın EuNP'ın floresansını artıran etkisi ve/veya aminoglikozidlerle parçacıkların etkileşimini sterik perdelemekten dolayı engellemesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

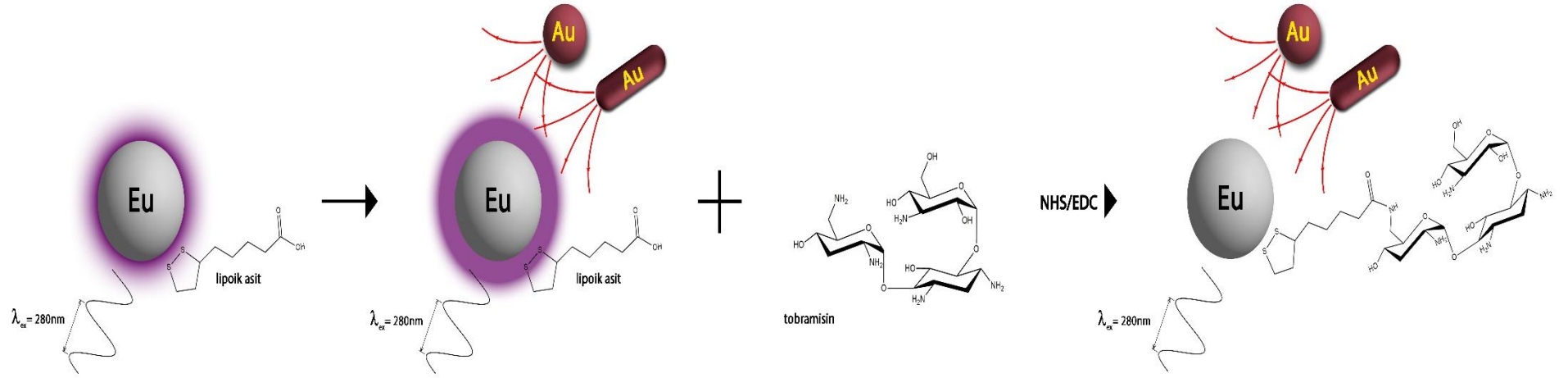
İkinci olarak, floresans sönmülme verileri kullanılarak çizilen Stern-Volmer denkleminde yararlanılmıştır. Stern-Volmer eşitliği:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} C_Q$$

şeklinde ifade edilmektedir ve burada F_0 EuNP'ın floresansı; F aminoglikozidlerin varlığında EuNP'ın floresansı, K_{sv} Stern-Volmer sönümlenme sabiti ve C_Q ise aminoglikozidlerin konsantrasyonlarıdır.

Belirli bir konsantrasyon aralığı için aminoglikozid konsantrasyonuna karşı F_0/F grafiği (Stern-Volmer eğrisi) doğrusal ise, bu o aralıktaki sönümlenmenin ya tek başına statik, ya da tek başına dinamik sönümlenme olduğunu gösterir. Eğer yukarıya doğru bir eğilim gösteriyorsa bu sönümlenmenin statik ve dinamik sönümlenmenin bir karışımı olduğunu göstermektedir. Bu grafiklerdeki eğrilerin şekillerinden elde edilen sonuçlar sönümlenmenin türü hakkında bir bilgi vermekten çok, sönümlenmenin tek bir türe mi ait yoksa her iki sönümlenme türünün bir karışımı mı olduğunu cevaplamaktadır. Şekil 3.30 – 3.32'deki eğrilerin doğrusal olduğu söylenebilir. Dolayısıyla AMİ, GEN ve TOB için sönümlenme ya tek başına statik ya da tek başına dinamik sönümlenmedir.

Üçüncü yöntemde ise sıcaklığın Stern-Volmer sönümlenme sabitine (K_{sv})'ne olan etkisi incelenmiştir. Dinamik sönümlenmede K_{sv} sıcaklıkla birlikte artarken, statik sönümlenmede sıcaklık artırıldıkça K_{sv} 'nin azaldığı gözlenir. Bunun nedeni; sıcaklık arttırıldıkça difüzyon artışı nedeniyle çarpışmalar artacağı için, sönümlenme dinamik ise, K_{sv} 'de artış gözlenecektir. Statik sönümlenmede ise sıcaklık artışı zayıf bir şekilde bağlanmış kompleksleri disosiye edeceğinden, K_{sv} bu sönümlenme türünde sıcaklık artışı ile birlikte azalır (Lakowicz, 2006 s.:280). Çizelge 3.19'da sıcaklık artıldıkça (288 K, 298 K ve 308 K) K_{sv} değerlerinin her üç aminoglikozid için de düştüğü gözlenmektedir. 288 K'den 308 K'e doğru gidildikçe AMİ için K_{sv} değerleri sırasıyla 18342, 16657 ve 13930 L.mol⁻¹; GEN için 14829, 13930 ve 13850 L.mol⁻¹ ve TOB için 24986, 21278 ve 20939 L.mol⁻¹'dür. Sıcaklık artışı ile birlikte azalan K_{sv} değerleri sönümlenmenin statik olduğunu göstermektedir. Böylece EuNP yüzeyindeki lipoik asit ile aminoglikozidlerin reaksiyona girerek floresans özelliği göstermeyen yeni bir tür oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.2. Amingolikozidlerin spektrofotometrik tayininin şematik gösterimi

Aminoglikozidler için tasarlanan florimetrik yöntemin çalışma mekanizması, EuNP'ların yüzeyine bağlanan, sensör işlevi görecek olan lipoik asitin aminoglikozidler ile reaksiyona girmesi üzerine kurulmuştur (Şekil 2.2 ve 4.2). Elde edilen sonuçların statik sönümlenmeye işaret etmesi bu reaksiyonun gerçekleştiğini ve nanoparçacığın seçici bir şekilde aminoglikozidlere bağlandığını göstermektedir.

Aminoglikozidlerin EuNP'ın floresansını konsantrasyona bağımlı bir şekilde sönümleyebileceği görüldükten sonra, kullanılan EuNP'ın ve sinyal güçlendirmesinde kullanılacak AuNP'ın karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bunun için UV-GB spektrumları ve TEM görüntüleri kullanılmıştır. EuNP'ların UV-GB spektrumunda 280 nm civarında görülen pik (Şekil 3.34) referans yöntemde de (Gao ve ark., 2007) gözlenmektedir. Sentezlenen EuNP'ların TEM görüntülerinde (Şekil 3.36) beklendiği gibi 20 nm civarında küresel biçimde nanoparçacıklar sentezlendiği anlaşılmaktadır. AuNP'ların UV-GB spektrumları Şekil 3.35 'de görülmektedir. AuNP'ın şekilleri ve boyutları değiştikçe piklerde dalga boyu kaymaları ve absorbans farkları gözlenebilmektedir. Ayrıca beklenildiği gibi, çubuk şeklindeki nanoparçacıklar oluşmaya başladıkça 250 nm civarında ikinci bir pikin oluştuğu görülmektedir. AuNP'ın şekillerine ve boyutlarına bağlı olarak renklerdeki değişim de (Şekil 3.33) istenilen nanoparçacıkların sentezlendiğini kanıtlamaktadır. Optimizasyon deneyleri sonucunda sinyal güçlendirici olarak seçilen çubuk ve küre karışımı AuNP'ın TEM görüntülemesi yapılmıştır. Görüntülerde (Şekil 3.37) çubuklar ve küreler açıkça görülmektedir. Literatür yönteminde (Jana ve ark., 2001) 37 ± 5 nm'lik küreler ve ortalama boyutları 200×17 nm olacak çubuklar beklenmektedir. TEM görüntüleri sentezlenen AuNP'ların beklenen boyutlarda ve şekilde olduklarını göstermektedir.

Metot optimizasyonunda faktörler pH, iyonik şiddet, AuNP boyutu ve AuNP konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. pH optimizasyonunda her üç aminoglikozid için de pH 5,0'ın en hassas sonuçlar verdiği görülmüştür. Bazik bölgede lipoik asit kaplı EuNP'ın floresans şiddetinin çok düşük olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla ΔF değerleri de oldukça düşüktür. Çok asidik bölgede ise EuNP'ın floresans sinyalleri yüksek iken ΔF değerlerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun NHS/EDC aktivasyon

reaksiyonunun en verimli olarak pH 4,5-7,2 aralığında gerçekleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Floresans sönümlenmesi, lipoik asitin karboksil grubunun, NHS/EDC aktivasyonu sonrası aminoglikozidlerin amin gruplarıyla reaksiyonundan ileri geldiği için, bu reaksiyonun verimi düştüğünde ΔF değerleri de düşmektedir.

İyonik şiddetin sönümlenme deneylerinde sabit tutulması önemlidir (Lakowicz, 2006 s.:289). Bunun için tolerans seviyesi çok yüksek olan NaCl'in yüksek konsantrasyonu (2,5 M) kullanılarak iyonik şiddet sabit tutulmuştur. Bu sayede numune hazırlama aşamasında ortama eklenecek iyonların iyonik şiddete etkisinin ihmal edilebilir düzeyde kalması sağlanmıştır.

AuNP'in boyut ve şekilleri değiştirilerek, sinyal güçlendirmesi optimize edilmiştir. Sonuçlarda çok radikal farklar olmasa da 37 ± 5 nm küre ve 17-200 nm çubuk karışımının sinyalleri daha çok güçlendirdiği gözlenmiştir. Bu nedenle bu AuNP karışımı sinyal güçlendirici olarak seçilmişlerdir. Metal nanoparçacıkların UV-GB spektrumunun absorpsiyon ve saçılımdan kaynaklandığı bilinmektedir. Nanoparçacıkların boyutu küçüldükçe absorpsiyon baskın hale gelirken, boyut büyüdüğünde saçılımın spektruma katkısı artmaktadır. Metalle zenginleştirilmiş floresansın, nanoparçacıkların eşleşmiş plazmon saçılımından kaynaklandığı düşünülmektedir (Aslan ve Geddes, 2010). Daha büyük parçacıklarda saçılım absorpsiyona göre daha baskın olacağı için sinyalleri de daha fazla güçlendirmesi beklenmektedir. Bu da optimizasyonda denenilen AuNP arasında en büyük boyutlardaki nanoparçacıkların, sinyalleri neden daha fazla güçlendirdiğini açıklamaktadır.

AuNP'ların boyut ve şekline karar verildikten sonra eklenecek miktar optimize edilmiştir. Eklenen AuNP miktarına bağlı olarak floresans sinyallerinin ve dolaylı olarak ΔF 'in önce artış gösterdiği, belli bir konsantrasyon aralığında neredeyse sabit kaldığı ve daha fazla eklendikçe de azalmaya başladığı gözlemlenmiştir. Bunun, yüksek konsantrasyonlarda AuNP'in plazmon elektronlarının birbiriyle etkileşiminden kaynaklı, elektrik alanlarının birbirini bozmasından

kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Böylece AuNP'ın yüksek konsantrasyonlarında birbirleriyle etkileşiminden kaynaklı elektrik alanı azalacak ve dolayısıyla florofor türlere sağlayacağı elektrik alanı azalacağı için de sinyal güçlendirme miktarı da azalacaktır.

Optimizasyonlar sonucunda elde edilen veriler, küre-çubuk karışımı AuNP'ların lipoik asitle modifiye edilmiş EuNP'ların sinyallerini 4,5 kat kadar güçlendirdiğini göstermektedir. ΔF değerlerini ise TOB için 2,9 kat; AMİ için 2,7 kat; GEN için ise 2,8 kat artırdığını göstermektedir. Floresans sönümlenmesindeki bu güçlenme yakalama sınırı ve tayin alt sınırı değerlerine yansiyarak bu değerleri de düşürmüştür. Böylece floresans zenginleşmesi ile birlikte deneyin duyarlılığı artırılmıştır. Ancak beklendiği gibi, duyarlılık artışı yüzey çalışmalarından elde edilebilecek olan artışlardan daha düşük seviyededir (Aslan ve ark, 2004). Buna karşılık elde edilen doğruluk kesinlik gibi validasyon parametreleri, genellikle yüzey çalışmalarından elde edilenlere göre çok daha iyi seviyelerde olduğu görülmektedir. Ayrıca numune hazırlama aşaması düşünüldüğünde çözelti ortamında çalışmak yüzey çalışmalarına göre daha basittir.

Spektroflorimetrik çalışmalarda da analitik işlemlerin validasyonu için YS, TAS, doğrusallık, çalışma aralıkları, doğruluk, kesinlik, seçicilik ve dayanıklılık parametreleri belirlenmiştir.

Geliştirilen spektroflorimetrik yöntemin YS ve TAS değerleri; AMİ için 223 ng/mL ve 746 ng/mL; GEN için 91 ng/mL ve 304 ng/mL; ve TOB için 59,7 ng/mL ve 199 ng/mL olarak bulunmuştur. GEN için YS değeri Avrupa Birliği, Dünya Sağlık Örgütü ve Kanada tarafından sütte maksimum kalıntı limitleri olarak belirlenen değerin (100 ng/mL) altındadır. Ancak Amerika Birleşik Devletleri'nin belirlediği maksimum kalıntı limiti olan 30 ng/mL değerine bu yöntemle inilememiştir.

ICH kılavuzlarında (1994) minimum beş konsantrasyonda hazırlanan standartların sonuçlarına lineer regresyon uygulanması önerilmektedir. Spektroflorimetrik çalışmalarda hazırlanan on farklı konsantrasyondaki standart

çözeltilerin ΔF değerlerinden yola çıkılarak lineer regresyon uygulanmıştır. Elde edilen korelasyon katsayıları doğrusallık parametresinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Bu değerler AMİ, GEN ve TOB için sırasıyla 0,9965; 0,9966 ve 0,9986'dır. 1'e yakın olan bu korelasyon katsayıları yöntemin doğrusallık açısından uygun olduğunu göstermektedir.

Spektroflorimetrik yöntem için kabul edilebilir doğrusallık, doğruluk ve kesinliğin elde edildiği çalışma aralıkları belirlenmiştir. Çalışma aralıkları AMİ için 0,75 – 27,5 $\mu\text{g/mL}$; GEN için 0,40 – 26 $\mu\text{g/mL}$; ve TOB için ise 0,20 – 25 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

Doğruluk ve kesinlik parametreleri, laboratuvarında hazırlanan üç farklı konsantrasyonda üç set halinde hazırlanan standart çözeltilerin analizlerinin sonuçlarıyla değerlendirilmiştir. Her üç aminoglikozid için de 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$ ve 20 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler üç gün boyunca analiz edilmiştir. Elde edilen bağıl hata değerleri AMİ için % -0,67 ile %2,64 aralığında; GEN için % -2,57 ile % 2,76 aralığında; TOB için ise % -3,20 ile %3,06 aralığında değişmektedir. Bu bağıl hata değerleri yöntemin doğru sonuçlar verdiğini göstermektedir. Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik açısından üç gün süresince analiz edilen örneklerden elde edilen % bağıl standart sapma değerleri AMİ için \leq %1,86; GEN için \leq % 2,26; ve TOB için \leq %3,88'dir. Bu bağıl standart sapma değerleri florimetrik deneyler açısından yöntemin tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir.

Seçicilik çalışmalarında yardımcı maddelerin ve bazı iyonların tolerans limitleri hesaplanmıştır. Tolerans limitleri; örneklerin, floresans sinyallerini \pm %5 oranında değiştirdikleri konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.20). Tolerans limitleri belirlenen maddelerden laktoz, Na^+ , K^+ ve Cl^- çok yüksek konsantrasyonlarda bile yöntemi etkilemediği görülmüştür. Metil paraben ve propil paraben için suda çözünürlükleri düşük olması nedeniyle bu maddelerin doymuş çözeltileri hazırlanmış ve bu değerlerde analiz sonuçlarını etkilemedikleri gözlenmiştir. Çalışılan diğer maddeler için tolerans limitleri Çizelge 3.20'de verilmiştir. Buna göre BELOGENT® merhemde GEN ile birlikte GEN'in yarısı oranında bulunan betametazon

dipropiyonatın, GEN için çalışma aralığının üst limiti olan 26 ppm'den 5 kat daha konsantrasyona hazırlanmıştır ve yöntemi etkilemediği görülmüştür. Diğer yardımcı maddelerin tolerans limitleri de oldukça yüksektir. Seçilen matrikslerde bulunmayan ancak çok bilinen bazı iyonların da tolerans limitleri hesaplanmış ve tablo edilmiştir. Buna göre, yöntemin başka matrikslere uygulanması durumunda dikkat edilmesi gereken iyonlar ve konsantrasyonları görülmektedir.

Dayanıklılık için pH faktöründe yapılan küçük ama anlamlı değişikliklerin etkisi incelenmiştir (Çizelge 3.23, 3.29 ve 3.35). Elde edilen sonuçlar spektrofotometrik metodun pH'daki küçük değişimlere karşı dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Yöntem ilaçlara uygulanmadan önce standart ekleme yöntemiyle test edilmiştir. AMİ, GEN ve TOB içeren ilaçlara % 50, 75 ve 100 oranlarında standartlardan eklendikten sonra geri kazanım sonuçları değerlendirilmiştir. Bu deneylerde ortalama geri kazanım değerleri AMİ için % 98,88; GEN için % 101,46 ve TOB için % 99,55 bulunmuştur ve deney sonuçlarına herhangi bir girişim olmadığı görülmüştür.

Spektrofotometrik yöntemin uygulamaları seçilen farmasötik preparatlara ve standart madde eklenmiş süt örneklerine yapılmıştır. Aminoglikozidler sulu ortama ekstraksiyonu yapılmış ve gerekli seyreltmelerden sonra analiz edilmişlerdir. Analizler sonucunda % 5 AMİ içeren DRAMIGEL® jelde AMİ içeriği % 5,10; BSS değeri % 1,74 olarak bulunmuştur. BELOGENT® (1 mg GEN/ g) merhemde GEN miktarı 1,00 mg/g, BSS değeri % 1,60 olarak bulunmuştur. TOBRASED® göz merheminde (% 0,3 TOB) ise TOB miktarı % 0,31; BSS % 2,90 olarak bulunmuştur.

Süt numuneleri, etken maddeler eklenerek hazırlanmıştır. Eklenen aminoglikozid miktarları validasyon çalışmalarında belirlenen miktarlarda olduğu gibi düşük, orta ve yüksek seviyelerde belirlenmiştir. Örneklerin; yağdan, proteinlerden ve partiküllerden arındırılması için spektrofotometrik yöntemde izlenen prosedürler izlenmiştir.

Sütlerin analizlerinden elde edilen geri kazanım sonuçları AMİ için % 96,45 – 112,89 aralığında; GEN için % 104,05 – 112,82 ve TOB için % 98,63 – 110,70 aralığındadır. BSS değerleri ise AMİ için % 2,34 – 9,23; GEN için % 0,90-3,98; TOB için ise % 2,44-6,18 aralığındadır. Bu değerler Avrupa Komisyonu'nun “yiycek ve yemlerde kalıntı analizleri için metot validasyonu ve kalite kontrol prosedürleri”nde (2011) belirlenen geri kazanım için % 70 – 120 aralığı; BSS için ise < % 20 kriterlerine uygundur.

4.3. Yöntemlerin Karşılaştırılması

Geliştirilen spektrofotometrik ve spektroflorimetrik yöntemler YS ve TAS değerleri açısından karşılaştırıldığında, spektrofotometrik yöntemin daha duyarlı sonuçlar verdiği görülmektedir (Çizelge 4.2). Doktora tezinin amaçları arasında sütte maksimum kalıntı limitlerinde analize imkan veren yöntemler geliştirilmesi sayılmıştır. Çalışılan aminoglikozidler içerisinde GEN için bu değer Avrupa Birliği, Dünya Sağlık Örgütü ve Kanada'da 100 ng/mL, ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 30 ng/mL olarak belirlenmiştir. GEN için spektrofotometrik yöntemden elde edilen tayin limitleri bu amaca ulaşıldığını göstermektedir. Spektroflorimetrik yöntemde ise sinyal güçlendirmesi sonrasında Avrupa Birliği'nin belirlediği limitin altına inilebilmiştir.

Çizelge 4.2. Geliştirilen yöntemlerin duyarlılık açısından karşılaştırılması

	Spektrofotometri			Spektroflorimetri		
	AMİ	GEN	TOB	AMİ	GEN	TOB
Yakalama Sınırı (ng/mL)	15	3	5	223	91	60
Tayin Alt Sınırı (ng/mL)	45	9	14	746	304	199

Geliştirilen spektrofotometrik ve spektrofotometrik yöntemler, daha önce geliştirilmiş ve farmasötik preparat ve süte uygulanmış bazı yöntemlerle yakalama sınırı ve doğrusal çalışma aralıkları açısından karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.3). Aminoglikozidlerin analizleri UV absorpsiyonu olmadığı, türevlendirme gerektirdiği, uçucu olmamaları ve yüksek polariteye sahip olmaları gibi nedenlerden dolayı zordur ve genellikle geliştirilen yöntemlerin duyarlılığı düşüktür. Elde edilen veriler, geliştirilen yöntemlerin, literatürde belirtilen kapiler elektroforez, klasik voltametik, spektrofotometrik ve spektrofotometrik yöntemlerden daha duyarlı olduklarını göstermektedir. Aynı zamanda kütle dedektörlü sıvı kromatografisi ve moleküler baskılanmış polimerle modifiye edilmiş camı karbon elektrot kullanılan voltametik yöntemleriyle elde edilen hassasiyete yakın sonuçlar verdiklerini göstermektedir.

Çizelge 4.3. Yöntemlerin yakalama sınırları ve çalışma aralıkları açısından karşılaştırılması

Metot	Analit	YS	Doğrusal aralık	Örnek
LC-MS/MS (Tao ve ark., 2001)	AMI	8 ng/mL	10-100 ng/mL	Süt
	GEN	11 ng/mL	10-100 ng/mL	
	TOB	10 ng/mL	10-100 ng/mL	
CE-UV (Yeh ve ark., 2005)	AMI	200 µg/mL	400 – 2000 µg/mL	İlaç
	TOB	80 µg/mL	100 – 500 µg/mL	
CE-LIF (Yu ve ark., 2009)	AMI	10 ng/mL	30-500 ng/mL	Süt
	TOB	20 ng/mL	60-500 ng/mL	
LC-MS (Turnispeed ve ark., 2009)	GEN	13 ng/mL	15-300 ng/mL	Süt
Voltametri (Gupta ve ark., 2013)	TOB	0,65 ng/mL	2,3-47 ng/mL	Süt ve yumurta
Voltametri (Wang ve ark., 2007)	AMI	0,3 µg/mL	1,0-60 µg/mL	İlaç

Çizelge 4.3. Yöntemlerin yakalama sınırları ve çalışma aralıkları açısından karşılaştırılması Devam

Spektrofotometri (Frutos ve ark., 2000)	GEN	400 ng/mL	30-120 ppm	İlaç
Spektrofotometri (Omar ve ark., 2013)	AMI	3 µg/mL	10-100 µg/mL	İlaç
	GEN	2 µg/mL	10-100 µg/mL	
	TOB	1 µg/mL	2.5-20 µg/mL	
Spektroflorimetri (Tekkeli ve ark., 2013)	TOB	65 ng/mL	0,3-1,5 µg/mL	İlaç ve serum
Spektroflorimetri (Al Majed ve ark., 2003)	GEN	112 ng/mL	0,56-2,8 µg/mL	İlaç
	AMI	15 ng/mL	60-100 ng/mL	
Geliştirdiğimiz spektrofotometrik yöntem	GEN	3 ng/mL	20-60 ng/mL	Süt ve İlaç
	TOB	5 ng/mL	22.5-60 ng/mL	
	AMI	223 ng/mL	0,75-27,5 µg/mL	
Geliştirdiğimiz spektroflorimetrik yöntem	GEN	91 ng/mL	0,40-26 µg/mL	Süt ve İlaç
	TOB	60 ng/mL	0,20-25 µg/mL	
	AMI	223 ng/mL	0,75-27,5 µg/mL	

Geliştirilen yöntemlerin seçicilikle ilgili çalışmaları yapılmıştır. Seçilen ilaçlarda bulunan diğer etken maddeler ve yardımcı maddeler, süt şekeri ve bazı iyonlara karşı yöntemlerin seçici oldukları bulunmuştur. Spektroflorimetrik yöntemlerin genel olarak spektrofotometrik yöntemlere göre daha seçici olduğu bilinmektedir.

Geliştirilen yöntemlerin ilaçlara uygulandığında elde edilen ortalama geri kazanım değerleri ve varyans birbirleriyle t testi ve F testi kullanılarak karşılaştırılmışlardır (Çizelge 4.4). $p=0,05$ değerinde hesaplanan t değerleri ve F değerleri tablo değerlerinden düşük olduğu için yöntemlerin sonuçları arasında doğruluk ve kesinlik açısından anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.4. t ve F testi sonuçları

	Spektrofotometrik yöntemle bulunan ortalama etken madde sonuçları	Spektroflorimetrik yöntemle bulunan ortalama etken madde sonuçları	t değeri	F değeri
DRAMIGEL® (%5 AMİ; n=11)	% 4,97	% 5,10	1,67	2,01
BELOGENT® (1 mg GEN/g; n=11)	1,03	1,00	2,09	1,28
TOBRASED® (%0,3 TOB; n=12)	% 0,29	% 0,31	1,63	1,04

Tablo t değerleri serbestlik derecesi 9 için (AMİ ve GEN için)=2,26; serbestlik derecesi 10 için (TOB için)=2,23'dür. Tablo F değerleri serbestlik dereceleri 4 ve 5 için (AMİ ve GEN için)=6,26; serbestlik dereceleri 5 ve 5 için (TOB için) =5,05'dir.

Her iki yöntem de sütlerde antibiyotik kalıntılarının analizi için kullanılabilir. Bunun için öncelikle sütlerin protein ve yağlardan arındırılması gerekmektedir.

Genel olarak sütlerde antibiyotik kalıntılarının analizi iki aşamalı bir işlemdir. İlk aşamada antibiyotiğin varlığı ve mümkünse hangi sınıf antibiyotik içerdiği bulunur. İkinci aşamada ise kantitatif olarak tayin için uygun bir yöntemle analiz edilir (Plozza ve ark., 2011). AgNP ile geliştirdiğimiz yöntem renk değişiminin gözle takip

edilebilmesi ve basitliği açısından, florimetrik yöntem ise seçiciliğinin daha yüksek olması açısından bu iki aşamalı işlemden herhangi birisi için kullanılabilir kapasitede olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamı içerisinde AMİ, GEN ve TOB için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Bunlar AgNP'in kullanıldığı spektrofotometri ve AuNP'in kullanıldığı spektroflorimetridir.

Spektrofotometrik yöntemde basitçe sentezlenmiş ve modifiye edilmemiş AgNP'lerin, üzerine ilave edilen AMİ, GEN ve TOB konsantrasyonlarına karşı renginin sarıdan, turuncu ve kırmızıya değişmesinden ve UV-GB spektrumunun 394 nm'deki absorbans şiddetindeki azalmadan (ΔA) yararlanılmıştır. Bu ΔA değerlerinin konsantrasyona bağlı olmasından yararlanarak AMİ için 60-100 ng/mL, GEN için 20-60 ng/mL ve TOB için 22,5-60 ng/mL aralığında kantitatif tayin gerçekleştirilebilmiştir. Yöntemde pH, iyonik şiddet ve zaman faktörleri duyarlılığı artırmak için optimize edilmiştir.

Spektroflorimetrik yöntem için EuNP'lar lipoik asit ile modifiye edildikten sonra amin-karboksil bağlayıcı ajanların varlığında, aminoglikozidler ile reaksiyona sokulmuştur. Floresans sönümlenmesi üzerinden kantitatif tayin yapmak mümkün olmuştur. Floresans sönümlenmesinin türünün statik sönümlenme olduğu Stern-Volmer sabitleri üzerinden kanıtlanmıştır. Yöntemin duyarlılığı çubuk ve küre şeklindeki AuNP karışımı ile güçlendirilmiştir. Yöntemde pH ve AuNP'ların şekli, boyutu ve konsantrasyonu parametreleri optimize edildikten sonra AMİ için 0,75-27,5 $\mu\text{g/mL}$, GEN için 0,40-26 $\mu\text{g/mL}$ ve TOB için 0,20-25 $\mu\text{g/mL}$ aralığında konsantrasyonla floresans sönümlenmesi arasında doğrusal ilişki gözlenmiştir.

Geliştirilen her iki yöntem de ICH kılavuzlarında ilaç etken maddelerinin analizleri için geliştirilen kılavuzlara göre valide edilmiştir. Yöntemlerin seçilen ilaçlarda bulunan diğer etken maddeler ve yardımcı maddeler, süt şekeri ve bazı iyonlar varlığında yöntemlerin seçici oldukları bulunmuştur. Ardından seçilen farmasötik preparatlara (merhem ve jel) ve labotatuvarında hazırlanan süt örneklerine başarıyla uygulanmıştır. AMİ, GEN ve TOB için ilk kez geliştirilen bu yöntemler,

amaçlandığı şekilde basit ve ucuz olduğu, doğru ve duyarlı sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Geliştirilen spektrofotometrik yöntemin, lazer ışık kaynaklı ve mikroskoplu floresans cihazı kullanılarak yüzey çalışmalarına aktarılması suretiyle tayin limitlerinin çok daha düşük seviyelere düşürülebileceği düşünülmektedir. Ayrıca AMİ, GEN ve TOB için geliştirilen yöntemlerin yapılacak modifikasyonlar yoluyla bu aminoglikozidlerin seçici olarak tayinlerinin gerçekleştirilebilmesinin sağlanabileceği ve böylece sütlerin rutin analizlerinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

ÖZET

Aminoglikozidlerin altın ve gümüş nanoparçacıklar kullanılarak spektroskopik tayinleri

Bu tez çalışması kapsamında amikasin (AMİ), gentamisin (GEN) ve tobramisin (TOB) tayinleri için spektrofotometrik ve spektroflorimetrik yöntemler geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin sütlerde kalıntı analizlerine imkan verecek duyarlılıkta olması ve spektrofotometre ve spektroflorimetre gibi basit cihazlarla analiz edilebilmesinin yanında gözle varlığının saptanması da sağlanmıştır.

Geliştirilen spektrofotometrik yöntemde gümüş nanoparçacıklar kullanılmıştır. Gümüş nanoparçacıklarla AMİ, GEN ve TOB'in etkileşimi sonucunda, gümüş nanoparçacıkların renkleri sarıdan kırmızıya doğru konsantrasyona bağımlı olarak değişmekle birlikte spektrumunda da 394 nm'deki pik şiddetinde azalma gözlenmiştir. 394 nm'deki pik şiddetinin azalması üzerinden gerçekleştirilen tayin pH, iyonik şiddet ve zaman faktörleri açısından optimize edilmiştir. Yöntemde yakalama sınırları ve tayin alt sınırları sırasıyla AMİ için 15 ve 45 ng/mL, GEN için 3 ve 9 ng/mL ve TOB için 5 ve 14 ng/mL olarak bulunmuştur.

Geliştirilen spektroflorimetrik yöntemde ise floresans özelliği gösteren öropyum nanoparçacıkların yüzeyi lipoik asit ile modifiye edildikten sonra aminoglikozidlere bağlanmış ve floresans sönümlenmesi üzerinden aminoglikozidlerin tayini gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemin duyarlılığı 37 nm çapındaki küre ve 17-200 nm çubuk formundaki altın nanoparçacıkların karışımı ile güçlendirilmiştir. Bu güçlendirme ve pH, iyonik şiddet gibi faktörlerin optimizasyonu sonrasında elde edilen yakalama ve tayin alt sınırları sırasıyla AMİ için 223 ve 746 ng/mL, GEN için 91 ve 304 ng/mL, TOB için ise 60 ve 199 ng/mL olarak bulunmuştur.

Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan yöntemler merhem ve jel formülasyonlarına ve AMİ, GEN ve TOB katılmış süt örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Amikasin, Altın nanoparçacık, Gentamisin, Gümüş nanoparçacık, Tobramisin

SUMMARY

Spectroscopic determination of aminoglycosides by using gold and silver nanoparticles

In this PhD thesis, spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of amikacin (AMI), gentamicin (GEN) and tobramycin (TOB) were developed. The residue analysis of milk and detection with simple instruments like spectrophotometer and spectrofluorimeter, as well as detection with naked eyes were also achieved with these methods.

Silver nanoparticles were used in the spectrophotometric method. Interaction of silver nanoparticles with AMI, GEN and TOB resulted in a color change from yellow to red depending on the concentrations of AMI, GEN and TOB. This also leads to a decrease in the intensity of the peak at 394 nm. Determination based on the decrease of the intensity at 394 nm was optimized according to pH, ionic strength and time factors. Limit of detection and limit of quantitation were found as 15 and 45 ng/mL for AMI, 3 and 9 ng/mL for GEN and 5 and 14 ng/mL for TOB respectively.

In the spectrofluorimetric method, surface of fluorescent europium nanoparticles were modified with lipoic acid, then aminoglycosides reacted with them and determination of aminoglycosides were carried out via fluorescence quenching. Sensitivity of this method was enhanced by AuNPs (37 nm spheres and 17-200 nm rods). After this enhancement and optimization of factors like pH and ionic strength; limit of detection and limit of quantitation were determined as 223 and 746 ng/mL for AMI, 91 and 304 ng/mL for GEN and 60 and 199 ng/mL for TOB respectively.

These validated methods were applied to ointment and gel formulations and AMI, GEN and TOB spiked milk samples successfully.

Keywords: Amikacin, Gentamicin, Gold nanoparticle, Silver nanoparticle, Tobramycin

KAYNAKLAR

- ACKERMANS, M. T., EVERAERTS, F. M. & BECKERS, J. L. (1992) Determination of aminoglycoside antibiotics in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection coupled with micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr.* **606**: 229-235.
- ADAMS, E. & HOOGMARTENS, J. (2004) The application of pulsed electrochemistry to the detection of aminoglycoside antibiotics in liquid chromatography. *Curr. Top. Electrochem.* **10**: 63-70.
- ADAMS, E., ROELANTS, W., DE PAEPE, R., ROETS, E. & HOOGMARTENS, J. (1998a) Analysis of gentamicin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18**: 689-698.
- ADAMS, E., VAN, V. G., ROETS, E. & HOOGMARTENS, J. (1998b) Analysis of amikacin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **819**: 93-97.
- AGARWAL, V. K. (1989) High performance liquid chromatography determination of gentamycin in animal tissue. *J. Liq. Chromatogr.* **12**: 613-628.
- AIST (2014) Integrated Spectral Database System of Organic Compounds. (Data were obtained from the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan))
- ALAM, A.M., KAMRUZZAMAN, M., LEE, S.H., KIM, Y.G., SO YEON KIM, S.Y., KIM, G.M., JO, H.J., KIM, S.H. (2012) Determination of catecholamines based on the measurement of the metal nanoparticle-enhanced fluorescence of their terbium complexes. *Microchimica Acta*, **176**: 153-161.
- AL-AMOUD, A. I., CLARK, B. J. & CHRYSTYN, H. (2002) Determination of gentamicin in urine samples after inhalation by reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **769**: 89-95.
- ALBRACHT, J. H. & DE WIT, M. S. (1987) Analysis of gentamicin in raw material and in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **389**: 306-311.
- ALLWOHN, J., EBEL, S. & KANG, J. S. (1988) Analysis of aminoglycoside antibiotics by HPTLC and electrophoretic procedures. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC* **1**: 50-53.
- AL-MAJED, A. A. (2008) A New LC Method for Determination of Some Aminoglycoside Antibiotics in Dosage Forms and Human Plasma Using 7-Fluoro-4-nitrobenz-2-oxa-

1,3-diazole as a Fluorogenic Pre-Column Label. *Chromatographia* **68**: 927-934.

- AL-MAJED, A. A., BELAL, F., ABOUNASSIF, M. A. & KHALIL, N. Y. (2003) Fluorimetric determination of gentamicin in dosage forms and biological fluids through derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl). *Mikrochim. Acta* **141**: 1-6.
- ALMEIDA, M. P., REZENDE, C. P., SOUZA, L. F. & BRITO, R. B. (2012) Validation of a quantitative and confirmatory method for residue analysis of aminoglycoside antibiotics in poultry, bovine, equine and swine kidney through liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam., Part A* **29**: 517-525.
- AL-SABHA, T. A. N. (2010) Spectrophotometric determination of amikacin sulphate via charge transfer complex formation reaction using tetracyanoethylene and 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone reagents. *Arabian J. Sci. Eng., Sect. A* **35**: 27-40.
- ANHALT, J. P. & BROWN, S. D. (1978) High-performance liquid-chromatographic assay of aminoglycoside antibiotics in serum. *Clin. Chem. (Winston-Salem, N. C.)* **24**: 1940-1947.
- ARA, J., GANS, Z., SWEENEY, R. & WOLF, B. (1995) Dot-ELISA for the rapid detection of gentamicin in milk. *J. Clin. Lab. Anal.* **9**: 320-324.
- ARCELLONI, C., COMUZZI, B., VAIANI, R. & PARONI, R. (2001) Quantification of gentamicin in Mueller-Hinton agar by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **753**: 151-156.
- ARGEKAR, A. P., RAJ, S. V. & KAPADIA, S. U. (1996) Determination of amikacin in parenteral dosage forms by high-performance thin-layer chromatography. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC* **9**: 459-461.
- ASLAN, K., GEDDES, C. D. (2010) Metal enhanced fluorescence: progress towards a unified plasmon-fluorophore description In: *Metal Enhanced Fluorescence* Ed: C. D. Geddes, Wiley, New Jersey, p.1-23.
- ASLAN, K., LAKOWICZ, J.R., SZMACINSKI, H., GEDDES, C. D. (2004) Metal-enhanced fluorescence solution-based platform. *J. Fluoresc.* **14**:677-679.
- ATHANASIOU-MALAKI, E., KOUPPARIS, M. A. & HADJIIOANNOU, T. P. (1989) Kinetic determination of primary and secondary amines using a fluoride-selective electrode and based on their reaction with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Anal. Chem.* **61**: 1358-1363.
- ATTEMA-DE JONGE, M. E., BEKKERS, J. M., OUDEMANS-VAN STRAATEN, H. M., SPARIDANS, R. W. & FRANSSEN, E. J. F. (2008) Simple and sensitive method for quantification of low tobramycin concentrations in human plasma using HPLC-

MS/MS. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **862**: 257-262.

- BABIN, Y. & FORTIER, S. (2007) A high-throughput analytical method for determination of aminoglycosides in veal tissues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with automated cleanup. *J. AOAC Int.* **90**: 1418-1426.
- BAIETTO, L., D'AVOLIO, A., DE ROSA, F. G., GARAZZINO, S., MICHELAZZO, M., VENTIMIGLIA, G., SICCARDI, M., SIMIELE, M., SCIANDRA, M. & DI PERRI, G. (2010) Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**: 791-798.
- BARANOWSKA, I., MARKOWSKI, P. & BARANOWSKI, J. (2006) Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. *Anal. Chim. Acta* **570**: 46-58.
- BARBIER, Y. & GALVAIN, D. (1979) Radioimmunological determination of gentamicin. *Int. J. Nucl. Med. Biol.* **6**: 133-137
- BARENDS, D. M., BLAUW, J. S., SMITS, M. H. & HULSHOFF, A. (1983) Determination of amikacin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **276**: 385-394.
- BARENDS, D. M., BROUWERS, J. C. A. M. & HULSHOFF, A. (1987) Fast pre-column derivatization of aminoglycosides with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **5**: 613-617.
- BARENDS, D. M., VAN DER SANDT, J. S. F. & HULSHOFF, A. (1980) Micro determination of gentamicin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **182**: 201-210.
- BARENDS, D. M., ZWAAN, C. L. & HULSHOFF, A. (1981) Improved microdetermination of gentamicin and sisomicin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **222**: 316-323.
- BIO-RAD/SADTLER IR DATA COLLECTION (2014) BIORAD: Infrared spectral data from the Bio-Rad/Sadtler IR Data Collection was obtained from Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA. USA.
- BOGIALLI, S., CURINI, R., DI CORCIA, A., LAGANA, A., MELE, M. & NAZZARI, M. (2005) Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1067**: 93-100.
- BOHM, D. A., STACHEL, C. S. & GOWIK, P. (2013) Validation of a method for the determination of aminoglycosides in different matrices and species based on an in-house concept. *Food Addit. Contam., Part A* **30**: 1037-1043.

- BONCHEV, P., PAPAZOVA, P., KONFINO, M. & DIMOVA, D. (1984) Spectrophotometric method for determination of tobramycin, apramycin and kanamycin in formulations. *Mikrochim. Acta* **3**: 459-465.
- BRAJANOSKI, G., HOOGMARTENS, J., ALLEGAERT, K. & ADAMS, E. (2008) Determination of amikacin in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **867**: 149-152.
- BROUGHTON, A., STRONG, J. E., PICKERING, L. K. & BODEY, G. P. (1976) Radioimmunoassay of iodinated tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**: 652-656.
- BRUST, M., WALKER, M., BETHELL, D., SCHIFFRIN, D.J., WHYMAN, R. (1994). Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **7**: 801-802.
- BUYNAK, J.D. Medicinal Chemistry Lecture Notes. Southern Methodist University Dallas. Erişim: [http://faculty.smu.edu/jbuynak/Medicinal_Outline_11_4_04.pdf]. Erişim Tarihi: 26.01.2012
- CABANES, A., CAJAL, Y., HARO, I., GARCIA ANTON, J. M., ARBOIX, M. & REIG, F. (1991) Gentamicin determination in biological fluids by HPLC, using tobramycin as internal standard. *J. Liq. Chromatogr.* **14**: 1989-2010
- CAI, Y., CAI, Y., CHENG, J., MOU, S. & LU, Y. (2005) Comparative study on the analytical performance of three waveforms for the determination of several aminoglycoside antibiotics with high performance liquid chromatography using amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **1085**: 124-130.
- CAI, Y.-Q. & MOU, S.-F. (2005) Optimizing the quadruple-potential waveform for the determination of gentamicin sulfate by high performance liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *Chin. J. Chem.* **23**: 1207-1212.
- CALDERON, C.B., SABUNDAYO, B.P. (2007). Antimicrobial Classifications: Drugs for Bugs. In: *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, Ed.: SCHWALBE, R., STEELE-MOORE. L., GOODWIN. A.C. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols: CRC Press. Taylor & Frances Group.
- CALDERON, L., BRUNETTO, R., LEON, A., BURGUERA, J. L. & BURGUERA, M. (1996) HPLC determination of gentamicin in pharmaceutical dosage forms by postcolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Am. Lab. (Shelton, Conn.)* **28**: 56-59.
- CASLEY, D. J., ATKINS, R. C., MURPHY, G. F. & JOHNSTON, C. I. (1978) Radioimmunoassay for serum tobramycin levels using iodine-125-labeled tobramycin. *Pathology* **10**: 307-315.

- CATURLA, M. C., CUSIDO, E. & WESTERLUND, D. (1992) High-performance liquid chromatography method for the determination of aminoglycosides based on automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. *J. Chromatogr.* **593**: 69-72.
- CAUDRON, E., BAGHRICHE, S., PROGNON, P. & PRADEAU, D. (2013) Simultaneous quantification of gentamicin and colistin sulfate in pharmaceuticals using ion-pairing and polarity gradient chromatography with low-UV detection. *Chromatographia* **76**: 747-755.
- CAZORLA-REYES, R., ROMERO-GONZALEZ, R., FRENICH, A. G., RODRIGUEZ MARESCA, M. A. & MARTINEZ VIDAL, J. L. (2014) Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **89**: 203-212.
- CHANG, X.-J., PENG, J.-D. & LIU, S.-P. (2010) A simple and rapid high performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the estimation of amikacin in plasma - application to preclinical pharmacokinetics. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei, Taiwan)* **57**: 34-39.
- CHERLET, M., DE BAERE, S. & DE BACKER, P. (2000) Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **35**: 1342-1350.
- CHOPRA, S., MANYANGA, V., HOOGMARTENS, J. & ADAMS, E. (2013) LC with electrochemical and UV detection for analysis of a formulation containing gentamicin and parabens. *Anal. Methods* **5**: 2491-2496.
- CHOPRA, S., VANDERHEYDEN, G., HOOGMARTENS, J., VAN SCHEPDAEL, A. & ADAMS, E. (2010) Comparative study on the analytical performance of different detectors for the liquid chromatographic analysis of tobramycin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**: 151-157.
- CLAES, P. J., BUSSON, R. & VANDERHAEGHE, H. (1984) Determination of the component ratio of commercial gentamicins by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.* **298**: 445-457.
- CLAROT, I., CHAIMBAULT, P., HASDENTEUFEL, F., NETTER, P. & NICOLAS, A. (2004) Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* **1031**: 281-287.
- CLAROT, I., STORME-PARIS, I., CHAMINADE, P., ESTEVENON, O., NICOLAS, A. & RIEUTORD, A. (2009) Simultaneous quantitation of tobramycin and colistin sulphate by HPLC with evaporative light scattering detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50**: 64-67.

- COLVIN, V., MITTLEMAN, D. Nanotechnology: The Basics, on-line course from Rice University, Erişim: [<https://www.coursera.org/course/nanotech>] Erişim Tarihi:01.12.2013
- CONFINO, M. & BONTCHEV, P. (1990) Spectrophotometric determination of amikacin, kanamycin, neomycin, and tobramycin. *Mikrochim. Acta* **3**: 305-309.
- CROES, S.; KOOP, A. H.; VAN, G. S. A.; NEEF, C. (2012) Efficacy, nephrotoxicity and ototoxicity of aminoglycosides, mathematically modelled for modelling-supported therapeutic drug monitoring. *Eur. J. Pharm. Sci.* **45**: 90–100.
- CURIEL, H., VANDERAERDEN, W., VELEZ, H., HOOGMARTENS, J. & VAN SCHEPDAEL, A. (2007) Analysis of underivatized gentamicin by capillary electrophoresis with UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**: 49-56.
- DAS GUPTA, V., STEWART, K. R. & GUNTER, J. M. (1983) Quantitation of amikacin, kanamycin, neomycin, and tobramycin in pharmaceutical dosage forms using the Hantzsch reaction. *J. Pharm. Sci.* **72**: 1470-1471.
- DASH, A. K. & SURYANARAYANAN, R. (1991) A liquid-chromatographic method for the determination of tobramycin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **9**: 237-245.
- DEUBNER, R. & HOLZGRABE, U. (2004) Micellar electrokinetic capillary chromatography, high performance liquid chromatography, and nuclear magnetic resonance - Three orthogonal methods for characterization of critical drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**: 459-467.
- DOBIAS, B., QIU, X., RYBINSKI, W.V., *Solid-Liquid Dispersions, Surfactant Science Series*, vol. 81 Marcel Dekker Inc., New York (1999) p.12.
- D'SOUZA, J. & OGILVIE, R. I. (1982) Determination of gentamicin components C1a, C2 and C1 in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **232**: 212-218.
- EL KOSASY, A. M., ABDEL GHANY, M. F., AYAD, M. F. & ABDEL FATTAH, L. E. (2003b) TLC and scanning densitometric method for determination of gentamicin and tobramycin in pure, dosage forms and in mixture with dexamethazone. *Bull. Fac. Pharm. (Cairo Univ.)* **41**: 169-177.
- EL KOSASY, A. M., GHANY, M. F. A., AYAD, M. F. & FATTAH, L. E. A. (2003a) Colorimetric and spectrofluorimetric determination of gentamicin and tobramycin pure, dosage forms and in mixture with dexamethasone. *Bull. Fac. Pharm. (Cairo Univ.)* **41**: 89-108.
- EL-ATTUG, M. N., ADAMS, E. & VAN SCHEPDAEL, A. (2012a) Development and validation of a capillary electrophoresis method with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C4D) for the analysis of amikacin and its related substances. *Electrophoresis* **33**: 2777-2782.

- EL-ATTUG, M. N., CHOPRA, S., DHULIPALLA, R. L., ALLEGAERT, K., SMITS, A., SCHEPDAEL, A. & ADAMS, E. (2012b) Development and Validation of a Chromatographic and Electrophoretic Method for the Determination of Amikacin and Urea in Bronchial Epithelial Lining Fluid. *Chromatographia* **75**: 761-766.
- EL-ATTUG, M. N., HOOGMARTENS, J., ADAMS, E. & VAN SCHEPDAEL, A. (2012c) Optimization of capillary electrophoresis method with contactless conductivity detection for the analysis of tobramycin and its related substances. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **58**: 49-57.
- EL-ATTUG, M. N., VAN SCHEPDAEL, A. & ADAMS, E. (2012d) Application of capacitively coupled contactless conductivity detection for the analysis of aminoglycoside antibiotics. *Curr. Top. Anal. Chem.* **9**: 31-38.
- EL-DIDAMONY, A. M., AMIN, A. S., GHONEIM, A. K. & TELEBANY, A. M. (2006) Indirect spectrophotometric determination of gentamicin and vancomycin antibiotics based on their oxidation by potassium permanganate. *Cent. Eur. J. Chem.* **4**: 708-722.
- EL-SHABRAWY, Y. (2002) Fluorometric determination of aminoglycoside antibiotics in pharmaceutical preparations and biological fluids. *Spectrosc. Lett.* **35**: 99-109.
- EMEA (2000) (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) Comitee for veterinary medicinal drugs, Gentamicin summary report. EMEA/MRL/003/95.
- ESSERS, L. (1984) An automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of aminoglycosides in serum using pre-column sample clean-up and derivatization. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **305**: 345-352.
- EUROPEAN COMMISSION, Method Validation And Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed, Document N° SANCO/12495/2011
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA. (2005). 5th Edition.
- FABRE, H., SEKKAT, M., BLANCHIN, M. D. & MANDROU, B. (1989) Determination of aminoglycosides in pharmaceutical formulations. II. High-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**: 1711-1718.
- FEDENIUK, R.W., SHAND, P.J. (1998). Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices. *J Chromatogr A*, **812**: 3-15.
- FELDHEIM, D.L., FOSS, C.A. (2002) Metal Nanoparticles, synthesis, characterization and applications, Marcel Dekker Inc. New York, USA
- FENG, C. H., LIN, S. J., WU, H. L. & CHEN, S. H. (2001a) Trace analysis of amikacin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* **53**: S213-S217.

- FENG, C.-H., CHEN, S.-H., WU, H.-L., LIN, S.-J., KOU, H.-S. & WU, S.-M. (2001b) Trace analysis of amikacin by derivatization and high performance liquid chromatography. *Chin. Pharm. J. (Taipei, Taiwan)* **53**: 313-326.
- FENG, C.-H., LIN, S.-J., WU, H.-L. & CHEN, S.-H. (2001c) Trace analysis of amikacin in commercial preparation by derivatization and HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **24**: 381-392.
- FENG, C.-H., LIN, S.-J., WU, H.-L. & CHEN, S.-H. (2002) Trace analysis of tobramycin in human plasma by derivatization and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **780**: 349-354.
- FENNELL, M. A., UBOH, C. E., SWEENEY, R. W. & SOMA, L. R. (1995) Gentamicin in Tissue and Whole Milk: An Improved Method for Extraction and Cleanup of Samples for Quantitation on HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1849-1852.
- FINBERG, R.W., MOELLERING, R.C., TALLY, F.P., CRAIG WA, PANKEY, G.A., DELLINGER, E.P., WEST, M.A., JOSHI, M., LINDEN, P.K., ROLSTON, K.V., ROTSCHAFER, J.C., RYBAK, M.J. (2004). The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 1314–1320.
- FLEMMING, J. (1989) Determination of gentamicin by differential-pulse polarography. *Pharmazie* **44**: 270-271.
- FOYE, W. O., LANGE, W. E., SWINTOSKY, J. V., CHAMBERLAIN, R. E., GUARINI, J. R. (1955) Metal chelates of streptomycin. *J. Am.Pharm. Assoc.* **44**: 261–263.
- FRANCKE, E. L., SRINIVASAN, S., LABTHAVIKUL, P. & NEU, H. C. (1981) Rapid, reproducible enzyme immunoassay for tobramycin. *J. Clin. Microbiol.* **13**: 93-96.
- FREEMAN, M., HAWKINS, P. A., LORAN, J. S. & STEAD, J. A. (1979) The analysis of gentamicin sulfate in pharmaceutical specialities by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **2**: 1305-1317.
- FRUTOS, P., TORRADO, S., PEREZ-LORENZO, M. E. & FRUTOS, G. (2000) A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**: 1149-1159.
- FUJITA, Y., MORI, I., KITANO, S. (1984). Application of o-hydroxyhydroquinonephthalein-uranium (VI) complex to determination of neomisin and tobramycin. *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 1214-1218.
- GALANAKIS, E. G., MEGOULAS, N. C., SOLICH, P. & KOUPPARIS, M. A. (2006) Development and validation of a novel LC non-derivatization method for the determination of amikacin in pharmaceuticals based on evaporative light scattering detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**: 1114-1120.

- GAMBARDELLA, P., PUNZIANO, R., GIONTI, M., GUADALUPI, C., MANCINI, G. & MANGIA, A. (1985) Quantitative determination and separation of analogs of aminoglycoside antibiotics by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **348**: 229-240.
- GAO, X.B., YU, J., LI, N., YIN, H.Y., YANG, J.H. (2007) The preparation and fluorescence properties of europium nanoparticles. *Chinese Chemical Letters* **18**: 1289–1292.
- GERSON, B., DEAN, L. & BELL, F. (1981) Quantitation of tobramycin by solid-phase immunofluorescence. *Ther. Drug Monit.* **3**: 167-169.
- GETEK, T. A., HANEKE, A. C. & SELZER, G. B. (1983) Determination of gentamicin sulfate C1a, C2, and C1 components by ion pair liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**: 172-175.
- GETEK, T. A., VESTAL, M. L. & ALEXANDER, T. G. (1991) Analysis of gentamicin sulfate by high-performance liquid chromatography combined with thermospray mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **554**: 191-203
- GHANY, M. F. A., EL KOSASY, A. M., AYAD, M. F. & FATTAH, L. E. A. (2003) Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of gentamicin and tobramycin using 1,4-benzoquinone. *Bull. Fac. Pharm. (Cairo Univ.)* **41**: 69-88.
- GILMARTIN, MARIEKE R., MCLAREN, J., SCHACHT, J. (2000). Confounding factors in lanthanide ion probe spectrofluorometric assay of aminoglycoside antibiotics, *Analytical Biochemistry* **283**: 116–119.
- GONG, A., ZHU, X., HU, Y., YU, S. (2007) A fluorescence spectroscopic study of the interaction between episteride and bovin serum albumine and its analytical application. *Talanta* **73**: 668-673.
- GONZALEZ-FERNANDEZ, E., DE-LOS-SANTOS-ALVAREZ, N., LOBO-CASTANON, M. J., MIRANDA-ORDIERES, A. J. & TUNON-BLANCO, P. (2011) Aptamer-Based Inhibition Assay for the Electrochemical Detection of Tobramycin Using Magnetic Microparticles. *Electroanalysis* **23**: 43-49.
- GOTELLI, G. R., WINTER, M. F. & MITCHELL, M. (1984) Liquid-chromatographic analysis for tobramycin in samples giving discrepant results by enzyme immunoassay and fluoroimmunoassay. *Clin. Chem. (Winston-Salem, N. C.)* **30**: 1110.
- GRABAREK, Z., GERGELY, J. (1990). Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem* **185**: 131-5.
- GRAHAM, A. E., SPEICHER, E. & WILLIAMSON, B. (1997) Analysis of gentamicin sulfate and a study of its degradation in dextrose solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**: 537-543.
- GRIFFITHS, W. C., DEXTRAZE, P. & DIAMOND, I. (1977) Analysis of serum for

gentamicin by radioimmunoassay. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **7**: 141-145.

GUBERNATOR, J., DRULIS-KAWA, Z. & KOZUBEK, A. (2006) A simple and sensitive fluorometric method for determination of gentamicin in liposomal suspensions. *Int. J. Pharm.* **327**: 104-109.

GUO, L., ZHONG, J., WU, J., FU, F., CHEN, G., ZHENG, X., LIN, S. (2010). Visual detection of melamine in milk products by label-free gold nanoparticles, *Talanta*. **82**: 1654-1658.

GUO, M. X., WRISLEY, L. & MAYGOO, E. (2006) Measurement of tobramycin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta* **571**: 12-16.

GUPTA, V. K., YOLA, M. L., OZALTIN, N., ATAR, N., USTUNDAG, Z. & UZUN, L. (2013) Molecular imprinted polypyrrole modified glassy carbon electrode for the determination of tobramycin. *Electrochim. Acta* **112**: 37-43.

HAICK, H. Nanotechnology and nanosensors, on-line course from TECHNION (Israel Institute of Technology), Erişim: [<https://www.coursera.org/course/nanosensors>] Erişim Tarihi: 03.03.2014

HAJIZADEH, S., FARHADI, K., FOROUGH, M., SABZI, E. (2011) Silver nanoparticles as a cyanide colorimetric sensor in aqueous media. *Analytical Methods*, **3**: 2599-2603.

HAUGHEY, D. B., JANICKE, D. M., ADELMAN, M. & SCHENTAG, J. J. (1980) High-pressure liquid chromatography analysis and single-dose disposition of tobramycin in human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**: 649-653.

HE, S., CHEN, Q., SUN, Y., ZHU, Y., LUO, L., LI, J. & CAO, Y. (2011) Determination of tobramycin in soil by HPLC with ultrasonic-assisted extraction and solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**: 901-907.

HEALTH CANADA (2014) List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods. Vol 147 No:11.

HEICK, H. M. C., MACKENZIE, A. M. R., CHAN, F., GOLAS, C. & MOHAMMED, A. (1982) Enzyme immunoassay of gentamicin with the Abbott ABA-100 Analyzer. *Clin. Biochem. (Ottawa)* **15**: 217-218.

HELLER, D. N., PEGGINS, J. O., NOCHETTO, C. B., SMITH, M. L., CHIESA, O. A. & MOULTON, K. (2005) LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **821**: 22-30.

HENGLEIN, A., GIERSIG, M. (1999). Formation of colloidal silver nanoparticles: capping action of citrate. *J Phys Chem B*, **103**: 9533-9539.

- HEYDEN, Y.V. , NIJHUIS, A., SMEYERS-VERBEKE, J., VANDEGINSTE B.G.M., MASSART, D.L. (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **24**: 723–753.
- HU, X. L., LIU, S. P. & LI, N. (2003) Resonance Rayleigh scattering spectra for studying the interaction of aminoglycoside antibiotics with pontamine sky blue and their analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**: 42-48.
- HU, X.-L., AN, L.-X., LIU, S.-P., LIU, Z.-F. & LI, C.-X. (2010) Resonance light scattering method for determination of amikacin with potassium ferrioxalate as a probe. *Chem. Res. Chin. Univ.* **26**: 366-370.
- HUBICKA, U., KRZEK, J., WOLTYNSKA, H. & STACHACZ, B. (2009) Simultaneous identification and quantitative determination of selected aminoglycoside antibiotics by thin-layer chromatography and densitometry. *J. AOAC Int.* **92**: 1068-1075.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline prepared within the Third International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Text on Validation of Analytical Procedures, 1994, (<http://www.ifpma.org/ich1.html>).
- ISOHERRANEN, N. & SOBACK, S. (2000) Determination of gentamicin after trimethylsilylimidazole and trifluoroacetic anhydride derivatization using gas chromatography and negative ion chemical ionization ion trap mass spectrometry. *Analyst (Cambridge, U. K.)* **125**: 1573-1576.
- ISOHERRANEN, N. & SOBACK, S. (2000) Determination of gentamicins C1, C1a, and C2 in plasma and urine by HPLC. *Clin. Chem. (Washington, D. C.)* **46**: 837-842.
- JANA, N.R., GEARHEART, L., MURPHY, C.J. (2001) Seeding Growth for Size Control of 5-40 nm Diameter Gold Nanoparticles, *Langmuir* **17**: 6782-6786.
- JEANMARIE DL, VAN DUYNE RP. (1977) Surface Raman spectroelectrochemistry, part 1: heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J. Electroanal. Chem.* **84**: 1–20
- JIN, Y., JANG, J.-W., HAN, C.-H. & LEE, M.-H. (2005) Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of gentamicin. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 7639-7643.
- JING, L., SANG, Y., HUANG, C.Z. (2008). Visual colorimetric detection of berberine hydrochloride with silver nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **47**: 860-864.
- JOLLEY, M. E., STROUPE, S. D., WANG, C.-H. J., PANAS, H. N., KEEGAN, C. L., SCHMIDT, R. L. & SCHWENZER, K. S. (1981) Fluorescence polarization immunoassay. I. Monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma. *Clin. Chem. (Winston-Salem, N. C.)* **27**: 1190-1197.

- JOSEPH, A. & RUSTUM, A. (2010) Development and validation of a RP-HPLC method for the determination of gentamicin sulfate and its related substances in a pharmaceutical cream using a short pentafluorophenyl column and a Charged Aerosol Detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**: 521-531.
- JURSIC B.S., ZDRAVKOVSKI, Z. (1993) A Simple Preparation of Amides from Acids and Amines by Heating of Their Mixture, *Synth. Commun.*, **23**: 2761–2770.
- KAALE, E., LEONARD, S., VAN SCHEPDAEL, A., ROETS, E. & HOOGMARTENS, J. (2000) Capillary Electrophoresis analysis of gentamicin sulfate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1,2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid. *J. Chromatogr. A* **895**: 67-79.
- KAALE, E., LONG, Y., FONGE, H. A., GOVAERTS, C., DESMET, K., VAN SCHEPDAEL, A. & HOOGMARTENS, J. (2005) Gentamicin assay in human serum by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **26**: 640-647.
- KAALE, E., VAN GOIDSENHOVEN, E., VAN SCHEPDAEL, A., ROETS, E. & HOOGMARTENS, J. (2001) Electrophoretically mediated microanalysis of gentamicin with in-capillary derivatization and UV detection. *Electrophoresis* **22**: 2746-2754.
- KAALE, E., VAN SCHEPDAEL, A., ROETS, E. & HOOGMARTENS, J. (2002a) Determination of tobramycin by capillary electrophoresis. *Bioforum Int.* **6**: 271-274.
- KAALE, E., VAN SCHEPDAEL, A., ROETS, E. & HOOGMARTENS, J. (2002b) Development and validation of capillary electrophoresis method for tobramycin with precapillary derivatization and UV detection. *Electrophoresis* **23**: 1695-1701.
- KAALE, E., VAN SCHEPDAEL, A., ROETS, E. & HOOGMARTENS, J. (2002c) Optimization of a pre-capillary derivatization protocol for tobramycin with capillary electrophoresis and UV detection. *J. Pharm. Belg.*, 20-22.
- KABRA, P. M., BHATNAGAR, P. K. & NELSON, M. A. (1983a) Liquid chromatographic determination of gentamicin in serum with spectrophotometric detection. *J. Anal. Toxicol.* **7**: 283-285.
- KABRA, P. M., BHATNAGAR, P. K., NELSON, M. A., WALL, J. H. & MARTON, L. J. (1983b) Liquid-chromatographic determination of tobramycin in serum with spectrophotometric detection. *Clin. Chem. (Winston-Salem, N. C.)* **29**: 672-674.
- KABRA, P. M., BHATNAGER, P. K. & NELSON, M. A. (1984) Liquid chromatographic determination of amikacin in serum with spectrophotometric detection. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **307**: 224-229.
- KANTOR, N. & SELZER, G. (1968) Chromatographic separation and bioassay of the gentamicin complex. *J. Pharm. Sci.* **57**: 2170-2171.

- KARA, M., KOLAYLI, S. (2010). Kloramfenikolün gıda güvenliği amaçlı tayininde yüzey plazmon rezonans ve moleküler baskılama tekniklerinin kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **5**: 35-47.
- KAUFMANN, A. & MADEN, K. (2005) Determination of 11 aminoglycosides in meat and liver by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **88**: 1118-1125.
- KAUFMANN, A., BUTCHER, P. & MADEN, K. (2012) Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices. *Anal. Chim. Acta* **711**: 46-53.
- KEEVIL, B. G., LOCKHART, S. J. & COOPER, D. P. (2003) Determination of tobramycin in serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with a fluorescence polarisation assay. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **794**: 329-335.
- KHALDEEVA, E. V., MEDYANTSEVA, E. P., IMANAIEVA, N. A. & BUDNIKOV, G. K. (2002) Determination of gentamicin with an amperometric enzyme immunosensor. *J. Anal. Chem.* **57**: 1097-1102.
- KIJAK, P. J., JACKSON, J. & SHAIKH, B. (1997) Determination of gentamicin in bovine milk using liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **691**: 377-382.
- KIM, B.-H., LEE, S. C., LEE, H. J. & OK, J. H. (2003) Reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using pre-column derivatization with phenylisocyanate. *Biomed. Chromatogr.* **17**: 396-403.
- KIM, K.D.; HAN, D.N.; KIM, H.T. (2004) Optimization of experimental conditions based on the Taguchi robust design for the formation nano-sized silver particles by chemical reduction method. *Chem. Eng. J.*, **104**: 55-61.
- KOLOSOVA, A. Y., BLINTSOV, A. N., SAMSONOVA, J. V. & EGOROV, A. M. (1998) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for gentamicin in human blood serum. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **361**: 329-330.
- KOMINAMI, G., NAKAMURA, M., MORI, S. & KONO, M. (1981) An enzyme immunoassay for serum tobramycin. *Clin. Chim. Acta* **117**: 189-197.
- KORANY, M. A.-T., HAGGAG, R. S., RAGAB, M. A. & ELMALLAH, O. A. (2013) Liquid Chromatographic Determination of Amikacin Sulphate after Pre-Column Derivatization. *J Chromatogr Sci. Baskıda.*
- KOWALCZUK, D., PIETRAS, R., PAW, B. & CZERKIES, A. (2010) Applying liquid chromatography with fluorescence detection to determine gentamicin. *Pol. J. Environ. Stud.* **19**: 587-591.

- KRAISINTU, K., PARFITT, R. T. & ROWMAN, M. G. (1982) A high-performance liquid chromatographic method for the determination and control of the composition of gentamicin sulfate. *Int. J. Pharm.* **10**: 67-75.
- KRUSZEWSKI S., WYBRANONWSKI T., CYRANKIEWCZ M., ZIOMKOWSKA B., PAWLACZYK A. (2008) Enhancement of FITC fluorescence by silver colloids and silver island film. *Acta Physica Polonica A*, **113**: 1599-1608.
- KRZEK, J., WOLTYNSKA, H. & HUBICKA, U. (2009) Determination of gentamicin sulphate in injection solutions by derivative spectrophotometry. *Anal. Lett.* **42**: 473-482.
- KUBO, H., KINOSHITA, T., KOBAYASHI, Y. & TOKUNAGA, K. (1984) Micro-scale method for determination of tobramycin in serum using high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **7**: 2219-2228.
- KUBO, H., KOBAYASHI, Y., KINOSHITA, T. & NISHIKAWA, T. (1982) Micro determination of tobramycin in serum by high-performance liquid chromatography. *Bunseki Kagaku* **31**: E263-E268.
- KUEHL, P. J., DE, S., EPPLER, B., MARSTERS, J., MATTHEWS, L., REED, M. D. & TALTON, J. D. (2012) Development and validation of an HPLC assay for dual detection of Gentamicin Sulfate and leucine from a novel dry powder for inhalation. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **3**: 152-156.
- KUMAR, P., RUBIES, A., COMPANYYO, R. & CENTRICH, F. (2012a) Determination of aminoglycoside residues in kidney and honey samples by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **35**: 2710-2717.
- KUMAR, P., RUBIES, A., COMPANYYO, R. & CENTRICH, F. (2012b) Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of aminoglycosides. *J. Sep. Sci.* **35**: 498-504.
- LAKI, M., LUDANYI, K., HAJDU, M., ZAHAR, A., SZENDROI, M., KLEBOVICH, I. & ANTAL, I. (2011) Determination of Gentamicin Released from Orthopedic Carrier System by a Novel HPLC Method. *J. Chromatogr. Sci.* **49**: 177-181.
- LAKOWICZ, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition, Springer, New York, USA, 2006.
- LARSEN, N. E., MARINELLI, K. & HEILESEN, A. M. (1980) Determination of gentamicin in serum using liquid column chromatography. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **221**: 182-187.
- LAW, W. S., KUBAN, P., YUAN, L. L., ZHAO, J. H., LI, S. F. Y. & HAUSER, P. C. (2006) Determination of tobramycin in human serum by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* **27**: 1932-1938.

- LECAROZ, C., CAMPANERO, M. A., GAMAZO, C. & BLANCO-PRIETO, M. J. (2006) Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**: 557-563.
- LEHOTAY, S. J., MASTOVSKA, K., LIGHTFIELD, A. R., NUNEZ, A., DUTKO, T., NG, C. & BLUHM, L. (2013) Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1313**: 103-112.
- LEONHARDT U. (2007). Optical Metamaterials: Invisibility Cup, *Nature Photonics*. **1**: 207-208.
- LI, B., ADAMS, E., VAN SCHEPDAEL, A. & HOOGMARTENS, J. (2005) Analysis of unknown compounds in gentamicin bulk samples with liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**: 393-402.
- LI, D., HE, S., DENG, Y., DING, G., NI, H. & CAO, Y. (2014) Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Amikacin in Water Samples by Solid Phase Extraction and Pre-column Derivatization. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Baskıda.
- LI, N. B., LUO, H. Q. & CHEN, G. N. (2004) Differential pulse anodic stripping voltammetric determination of traces of copper with a tobramycin-nafion modified electrode. *Anal. Sci.* **20**: 825-829.
- LI, T., LIU, S., LIU, Z., HU, X. & ZHANG, L. (2009) Special characteristics of fluorescence and resonance Rayleigh scattering for cadmium telluride nanocrystal aqueous solution and its interactions with aminoglycoside antibiotics. *Sci. China, Ser. B: Chem.* **52**: 76-85.
- LI, Y., ZHANG, Y., CAO, X., WANG, Z., SHEN, J. & ZHANG, S. (2012) Development of a chemiluminescent competitive indirect ELISA method procedure for the determination of gentamicin in milk. *Anal. Methods* **4**: 2151-2155.
- LIN, Y.-F., WANG, Y.-C. & CHANG, S. Y. (2008) Capillary electrophoresis of aminoglycosides with argon-ion laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **1188**: 331-333.
- LINK S, EL-SAYED MA. (1999) Spectral properties and relaxation Dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nano-dots and nano-rods. *J. Phys. Chem. B* **103**: 8410–26
- LINK, S., EL-SAYED M.A. (2000) Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals, *International Reviews in Physical Chemistry*, **19**: 409-453
- LIU, H. & SUNDERLAND, V. B. (2004) Determination of Sulfate in Aminoglycoside Antibiotics by Capillary Electrophoresis with Indirect UV Detection. *J. Liq.*

Chromatogr. Relat. Technol. **27**: 677-687.

LIU, S. P., HU, X. L. & LI, N. B. (2003a) Resonance rayleigh scattering method for the determination of aminoglycoside antibiotics with trypan blue. *Anal. Lett.* **36**: 2805-2821.

LIU, S., HU, X. & LIU, Z. (2006) Study on the resonance Rayleigh scattering spectra and resonance non-linear spectra of congo red-amikacin system and its analytical application. *Sci. China, Ser. B: Chem.* **49**: 507-516.

LIU, S.-P., HU, X.-L. & LUO, H.-Q. (2003b) Resonance rayleigh scattering measurement of aminoglycoside antibiotics with Evans Blue. *Anal. Sci.* **19**: 927-932.

LOFFLER, D. & TERNES, T. A. (2003) Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1000**: 583-588.

LONGMORE, P., ATKINS, R. C., CASLEY, D. & JOHNSTON, C. I. (1976) Radioimmunoassay as an improved method for measurement of serum levels of gentamicin. *Med. J. Aust.* **1**: 738-740.

LU, C., ZHANG, N., LI, Q. (2010). Colorimetric detection of cephadrine in pharmaceutical formulations via fluorosurfactant-capped gold nanoparticles. *Talanta*, 81: 698-702.

LU, C.-Y. & FENG, C.-H. (2007) Micro-scale analysis of aminoglycoside antibiotics in human plasma by capillary liquid chromatography and nanospray tandem mass spectrometry with column switching. *J. Chromatogr. A* **1156**: 249-253.

LUCENA, R., SIMONET, B.M., CARDENAS, S., VALCARCEL, M. (2011). Potential of nanoparticles in sample preparation. *Journal of Chromatography A*, **1218**: 620-637.

MAHON, W. A., EZER, J. & WILSON, T. W. (1973) Radioimmunoassay for measurement of gentamicin in blood. *I. Antimicrob. Agents Chemother.* **3**: 585-589.

MAITRA, S. K., YOSHIKAWA, T. T., STEYN, C. M., GUZE, L. B. & SCHOTZ, M. C. (1978) Amikacin assay in serum by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**: 880-885.

MAITRA, S. K., YOSHIKAWA, T. T., STEYN, C. M., GUZE, L. B. & SCHOTZ, M. C. (1979) Determination of amikacin isomers by high-pressure liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **2**: 823-836.

MANYANGA, V., GRISHINA, O., YUN, Z., HOOGMARTENS, J. & ADAMS, E. (2007) Comparison of liquid chromatographic methods with direct detection for the analysis of gentamicin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**: 257-262.

MANYANGA, V., KREFT, K., DIVJAK, B., HOOGMARTENS, J. & ADAMS, E. (2008)

Improved liquid chromatographic method with pulsed electrochemical detection for the analysis of gentamicin. *J. Chromatogr. A* **1189**: 347-354.

MARPLES, J. & OATES, M. D. G. (1982) Serum gentamicin, netilmicin and tobramycin assays by high performance liquid chromatography. *J. Antimicrob. Chemother.* **10**: 311-318.

MARTOS, P. A., JAYASUNDARA, F., DOLBEER, J., JIN, W., SPILSBURY, L., MITCHELL, M., VARILLA, C. & SHURMER, B. (2010) Multiclass, Multiresidue Drug Analysis, Including Aminoglycosides, in Animal Tissue Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 5932-5944.

MASHAT, M., CHRYSTYN, H., CLARK, B. J. & ASSI, K. H. (2008) Development and validation of HPLC method for the determination of tobramycin in urine samples post-inhalation using pre-column derivatisation with fluorescein isothiocyanate. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **869**: 59-66.

MCGLINCHEY, T.A., RAFTER, P.A., REGAN, F., McMAHON, G.P. A (2 0 0 8). Review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Analytica Chimica Acta*, **624**: 1-15.

MCLAUGHLIN, L. G., HENION, J. D. & KIJAK, P. J. (1994) Multiresidue confirmation of aminoglycoside antibiotics in bovine kidney by ion spray high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* **23**: 417-429.

MEGOULAS, N. C. & KOUPPARIS, M. A. (2004) Development and validation of a novel LC/ELSD method for the quantitation of gentamicin sulfate components in pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**: 73-79.

MEGOULAS, N. C. & KOUPPARIS, M. A. (2005) Development and validation of a novel HPLC/ELSD method for the direct determination of tobramycin in pharmaceuticals, plasma, and urine. *Anal. Bioanal. Chem.* **382**: 290-296.

MERCK INDEX 13th edition (2001) An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ.

MEULEMANS, A., MANUEL, C. & TRAN BA HUY, P. (1981) Radioimmunoassay of gentamicin in microliter and nanoliter samples of biological fluids. *Chemotherapy (Basel)* **27**: 29-33.

MIE, G. (1908) Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen, *Annalen der Physik* **330**: 377-445.

MOROVJAN, G., CSOKAN, P. P. & NEMETH-KONDA, L. (1998) HPLC determination of colistin and aminoglycoside antibiotics in feeds by post-column derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia* **48**: 32-36.

- MOULDS, R., JEYASINGHAM, M. (2010). Gentamicin: a great way to start. *Australian Prescriber*. **33**: 134–135.
- MUNRO, A. J., SMITH, D. S. & SHAW, E. J. (1982) A simplified quenching fluoroimmunoassay for gentamicin and the effects of some potential interfering factors. *J. Antimicrob. Chemother.* **9**: 47-51.
- NAGARAJAN, R. (2008) Chapter 1: Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology Eds: R. Nagarajan, T. Alan Hatton, *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization*, ACS SYMPOSIUM SERIES 996
- NANOCOMPOSIX, *UV/Vis/NIR Spectroscopy Analysis of Nanoparticles*, SAN DIEGO, CA, USA 2012 v1.1.
- Nanotechnology Consumer Products Inventory, The Project of Emerging Nanotechnologies, Erişim:[<http://www.nanotechproject.org/cpi/browse/nanomaterials/>] Erişim Tarihi: 02.03.2014
- NEZHAD, M.R.H., TASHKHOURIAN, J., KHODAVEISI, J. (2010) Sensitive spectrophotometric detection of dopamine, levodopa and adrenaline using surface plasmon resonance band of silver nanoparticles. *Journal of the Iranian Chemical Society*, **7**: S83-S91.
- NG, K., RICE, P. D. & BOBBITT, D. R. (1991) Identification and quantitation of gentamicin in milk using HPLC separation and laser-based polarimetric detection. *Microchem. J.* **44**: 25-33.
- NGO, T. T. & NARINESINGH, D. (2005) Ligand displacement fluorescence immunoassay for gentamicin and human IgG. *Anal. Lett.* **38**: 803-813.
- NICOLI, S. & SANTI, P. (2006) Assay of amikacin in the skin by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 994-997.
- NORDQVIST, C. (2009). What Are Antibiotics? How Do Antibiotics Work?. *Medical News Today*. Erişim: [<http://www.medicalnewstoday.com/articles/10278.php>]. Erişim Tarihi: 01.02.2012
- O'CONNELL, M. E., HEIM, K. L., HALSTENSON, C. E. & MATZKE, G. R. (1984) Analytical accuracy of determinations of aminoglycoside concentrations by enzyme multiplied immunoassay, fluorescence polarization immunoassay, and radioimmunoassay in the presence of heparin. *J. Clin. Microbiol.* **20**: 1080-1082.
- OERTEL, R., NEUMEISTER, V. & KIRCH, W. (2004) Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *J. Chromatogr. A* **1058**: 197-201.
- Official Website of United States National Nanotechnology Initiative. *Nanotechnology 101* Erişim: [<http://www.nano.gov/nanotech-101>] Erişim Tarihi: 02.03.2014

- OGURI, S. & MIKI, Y. (1996) Determination of amikacin in human plasma by high-performance capillary electrophoresis with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **686**: 205-210.
- OMAR, M.A., NAGY, D.M., HAMMAD, M.A., ALY, A.A. (2013). Validated spectrophotometric methods for determination of certain aminoglycosides in pharmaceutical formulations. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences.* **3**: 151-161.
- OVALLES, J. F., DEL ROSARIO BRUNETTO, M. & GALLIGNANI, M. (2005) A new method for the analysis of amikacin using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) derivatization and high-performance liquid chromatography with UV-detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**: 294-298.
- OZTURK, T. (2010). The use of gold and silver nanoparticles for surface enhanced fluorescence (sef) of dyes. Thesis of Master of Science. Middle East Technical Uni. School of Natural and Applied Sciences.
- PAPP, E. A., KNUPP, C. A. & BARBHAIYA, R. H. (1992) High-performance liquid chromatographic assays for the quantification of amikacin in human plasma and urine. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **574**: 93-99.
- PENG, G. W., GADALLA, M. A. F., PENG, A., SMITH, V. & CHIOU, W. L. (1977) High-pressure liquid-chromatographic method for determination of gentamicin in plasma. *Clin. Chem. (Winston-Salem, N. C.)* **23**: 1838-1844.
- PERRUCHON, P. & CAULLET, C. (1980) Determination of some aminoglycoside antibiotics by differential pulse polarography. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **112**: 397-402.
- PETRUKHIN, O. M., KOSTITSYNA, M. V., DZHERAYAN, T. G., SHIPULO, E. V., VLADIMIROVA, E. V. & DUNAEVA, A. A. (2009) Complexation of aminoglycoside antibiotics with metal cations as a derivatization reaction: Determination of gentamicin by equilibrium electrochemical and spectrophotometric methods. *J. Anal. Chem.* **64**: 951-957.
- PHANEUF, D., FRANCKE, E. & NEU, H. C. (1980) Rapid, reproducible enzyme immunoassay for gentamicin. *J. Clin. Microbiol.* **11**: 266-269.
- PLOZZA, T., TRENERRY, V.C., ZEGLINSKI, P., NGUYEN, H., JOHNSTONE, P. (2011) The confirmation and quantification of selected aminoglycoside residues in animal tissue and bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *International Food Research Journal* **18**: 1077-1084
- POOLE, R.K., KALNENIEKS, U. (2000) Introduction to light absorption: visible and ultraviolet spectra. In: *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry*, Ed. M.G. Gore. Oxford: Oxford University Press, p:1-32.

- PREU, M., GUYOT, D. & PETZ, M. (1998) Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimization of the derivatisation reactions. *J. Chromatogr. A* **818**: 95-108.
- PRIUSKA, E. M., CLARK, K., PECORARO, V., SCHACHT, J. (1998) NMR spectra of iron-gentamicin complexes and the implications for aminoglycoside toxicity. *Inorg. Chim. Acta* **273**: 85-91.
- REES, L. W., MUNN, A. D., MADDOCK, J. & ROBINSON, P. R. (2000) The rapid determination of tobramycin in microlitre quantities of human tear fluid using LC-MS-MS. *Chromatographia* **52**: S98-S100.
- RIZK, M., EL-SHABRAWY, Y., ZAKHARI, N. A., TOUBAR, S. S. & CARREIRA, L. A. (1995) Fluorimetric determination of aminoglycoside antibiotics using lanthanide probe ion spectroscopy. *Talanta* **42**: 1849-1856.
- RUCKMANI, K., SHAIKH, S. Z., KHALIL, P. & MUNEERA, M. S. (2011) A simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for determining tobramycin in pharmaceutical formulations by direct UV detection. *Pharm Methods* **2**: 117-123.
- RUMBLE, R. H. & ROBERTS, M. S. (1987) High-performance liquid chromatographic assay of the major components of gentamicin in serum. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **419**: 408-413.
- RUSS, H., MCCLEARY, D., KATIMY, R., MONTANA, J. L., MILLER, R. B., KRISHNAMOORTHY, R. & DAVIS, C. W. (1998) Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the determination of tobramycin and its related substances in an ophthalmic suspension. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **21**: 2165-2181.
- SABBATINI, N., GUARDIGLI, M., (1993) Luminescent lanthanide complexes as photochemical supramolecular devices. *Coord Chem Rev* **123**:201-228.
- SAGAR, G.V., SASTRY, B.S. (2003). Visible spectrophotometric methods for the determination of tobramycin in pharmaceutical formulations through Schiff's base formation. *Int. J. Chem. Sci.* **1**: 150-154.
- SANCHEZ-MARTINEZ, M. L., AGUILAR-CABALLOS, M. P. & GOMEZ-HENS, A. (2004) Selective kinetic determination of amikacin in serum using long-wavelength fluorimetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34**: 1021-1027.
- SANCHEZ-MARTINEZ, M. L., AGUILAR-CABALLOS, M. P. & GOMEZ-HENS, A. (2007) Long-wavelength fluorescence polarization immunoassay: Determination of amikacin on solid surface and gliadins in solution. *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **79**: 7424-7430.
- SANCHEZ-MARTINEZ, M. L., AGUILAR-CABALLOS, M. P. & GOMEZ-HENS, A.

- (2009) Long-wavelength homogeneous enzyme immunoassay for the determination of amikacin in water samples. *Talanta* **78**: 305-309.
- SANTOS, B., SAYALERO, M. L., ZARZUELO, A. & LANA O, J. M. (2002) Determination of Amikacin in biological tissues by HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **25**: 463-473.
- SAR, F., LEROY, P., NICOLAS, A. & ARCHIMBAULT, P. (1993) Development and optimization of a liquid chromatographic method for the determination of gentamicin in calf tissues. *Anal. Chim. Acta* **275**: 285-293.
- SAR, F., LEROY, P., NICOLAS, A., ARCHIMBAULT, P. & AMBROGGI, G. (1992) Determination of amikacin in dog plasma by reversed-phase ion-pairing liquid chromatography with post-column derivatization. *Anal. Lett.* **25**: 1235-1250.
- SCHMID G. (2004), *Nanoparticles from theories to application*, Wiley, Weinheim, Germany.
- SCHMIDT, G. J. & SLAVIN, W. (1981) The evaluation of coupled-column liquid chromatography for determining aminoglycoside antibiotics. *Chromatogr. Newsl.* **9**: 21-24.
- SCHOUKROUN-BARNES, L. R., WAGAN, S. & WHITE, R. J. (2014) Enhancing the Analytical Performance of Electrochemical RNA Aptamer-Based Sensors for Sensitive Detection of Aminoglycoside Antibiotics. *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **86**: 1131-1137.
- SEIDL, G. & NERAD, H. P. (1988) Gentamicin C: separation of C1, C1a, C2, C2a, and C2b components by HPLC using isocratic ion-exchange chromatography and post-column derivatization. *Chromatographia* **25**: 169-171.
- SEKAR, R., KAILASA, S. K., ABDELHAMID, H. N., CHEN, Y.-C. & WU, H.-F. (2013) Electrospray ionization tandem mass spectrometric studies of copper and iron complexes with tobramycin. *Int. J. Mass Spectrom.* **338**: 23-29.
- SEKKAT, M., FABRE, H., DE BUOCHBERG, M. S. & MANDROU, B. (1989) Determination of aminoglycosides in pharmaceutical formulations - I. Thin-layer chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**: 883-892.
- SERRANO, J. M. & SILVA, M. (2006a) Determination of amikacin in body fluid by high-performance liquid-chromatography with chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **843**: 20-24.
- SERRANO, J. M. & SILVA, M. (2006b) Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a strong cation-exchange chromatography non-derivatisation method with chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A* **1117**: 176-183.
- SERRANO, J. M. & SILVA, M. (2006c) Trace analysis of aminoglycoside antibiotics in

bovine milk by MEKC with LIF detection. *Electrophoresis* **27**: 4703-4710.

SHOU, D., DONG, Y., SHEN, L., WU, R., ZHANG, Y., ZHANG, C. & ZHU, Y. (2013) Rapid Quantification of Tobramycin and Vancomycin by UPLC-TQD and Application to Osteomyelitis Patient Samples. *J Chromatogr Sci.* Baskıda.

SIERRA-RODERO, M., FERNANDEZ-ROMERO, J. M. & GOMEZ-HENS, A. (2012) Determination of aminoglycoside antibiotics using an on-chip microfluidic device with chemiluminescence detection. *Microchim. Acta* **179**: 185-192.

SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.S. (1998) *Enstrümental Analiz İlkeleri* 5. Baskı. (Türkçe Çeviri Ed: KILIÇ, E., KÖSEOĞLU, F., YILMAZ, H. 1. Baskı, Ankara: Bilim Yayıncılık) p.: 355-377.

SOLOMON, S.D.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAM, A.V.; RUTKOWSKY, S.A.; BORITZ, C.; MULFINGER, L., (2007) Synthesis and study of silver nanoparticles. *J. Chem. Educ.*, **84**: 322-325.

SONG, K.C., LEE, S.M., PARK, T.S., LEE, B.S. (2009) Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **26**: 153-155.

SPERLING, R.A. (2008) Surface modification and functionalization of colloidal nanoparticles, Dissertation of Vom Fachbereich Physik der Philipps-Universität.

STANDEFER, J. C. & SAUNDERS, G. C. (1978) Enzyme immunoassay for gentamicin. *Clin. Chem. (Winston-Salem, N. C.)* **24**: 1903-1907.

STANECK, J. L., LAND, G. A., CORDES, V., GLENN, S. & RESENDES, J. P. (1981) Performance of four assays for the measurement of gentamicin in serum, including heterogeneous FIA, EIA, RIA, and bioassay. *Clin. Biochem. Anal.* **10**: 171-181.

STAROS, J.V., WRIGHT, R.W., SWINGLE, D.M. (1986). Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem* **156**: 220-2.

STATLER, J. A. (1990) Determination of tobramycin using high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **527**: 244-246.

STYPULKOWSKA, K., BLAZEWICZ, A., FIJALEK, Z. & SARNA, K. (2010) Determination of Gentamicin Sulphate Composition and Related Substances in Pharmaceutical Preparations by LC with Charged Aerosol Detection. *Chromatographia* **72**: 1225-1229.

SUN, N., MO, W.-M., SHEN, Z.-L. & HU, B.-X. (2005) Adsorptive stripping voltammetric technique for the rapid determination of tobramycin on the hanging mercury electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**: 256-262.

- SUZUKI, H., KATO, H., NAKANO, N., YANO, S. & KITAGAWA, T. (1981) Solid phase enzyme immunoassay of tobramycin. *J. Antibiot.* **34**: 1195-1199.
- SZUNYOG, J., ADAMS, E., ROETS, E. & HOOGMARTENS, J. (2000) Analysis of tobramycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23**: 891-896.
- TAN, H., CHEN, Y. (2012) Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium (III) for detection of tetracycline in milk. *Sens. Actuators B: Chem.* **173**: 262-267.
- TAO, Y., CHEN, D., YU, H., HUANG, L., LIU, Z., CAO, X., YAN, C., PAN, Y., LIU, Z. & YUAN, Z. (2012) Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **135**: 676-683.
- TAYEB, O. S., EL-TAHAWY, A. T. & ISLAM, S. I. (1986) Comparison of the fluorescence polarization immunoassay and the microbiological assay methods for the determination of gentamicin concentration in human serum. *Ther. Drug Monit.* **8**: 232-235.
- TEKKELI, S. E. K., OENAL, A. & SAGIRLI, A. O. (2014) Spectrofluorimetric determination of tobramycin in human serum and pharmaceutical preparations by derivatization with fluorescamine. *Luminescence* **29**: 87-91.
- THUMAR N.J., PATEL M.P. (2011) Synthesis and antimicrobial activity of some new N-substituted quinoline derivatives of 1H-pyrazole *Archiv der Pharmazie* **344**: 91-101.
- TSAY, Y.-G. & PALMER, R. J. (1981) A solid-phase fluoroimmunoassay of tobramycin. *Clin. Chim. Acta* **109**: 151-157.
- TSAY, Y.-G., WILSON, L. & KEEFE, E. (1980) Quantitation of serum gentamicin concentration by a solid-phase immunofluorescence method. *Clin. Chem. (Winston-Salem, N. C.)* **26**: 1610-1612.
- TURNIPSEED, S. B., CLARK, S. B., KARBIWNYK, C. M., ANDERSEN, W. C., MILLER, K. E. & MADSON, M. R. (2009) Analysis of aminoglycoside residues in bovine milk by liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry after derivatization with phenyl isocyanate. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**: 1487-1493.
- ÜSTÜNEŞ, L. (2012). RX Media Pharma ® 2012, Versiyon 2012 İzmir: Ege Üniversitesi.
- VALENTINI, F., BULDINI, P. L., LANDI, E., TAMPIERI, A. & TONELLI, D. (2008) HPLC determination of tobramycin in a simulated body fluid. *Microchem. J.* **90**: 113-117.
- VALEUR, B. (2002) *Molecular Fluorescence, Principles and Applications*, Wiley VCH, Weinheim, Germany.

- VALEUR, E., BRADLEY, M. (2009) Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents, *Chem. Soc. Rev.*, **38**: 606–631.
- VAN DUIJN, J. W., BAREND, D. M., GROOT, D. W. & DE NEELING, A. J. (1988) High pressure liquid chromatographic determination with ultraviolet detection of gentamicin and correlation with the microbiological potency. *Pharm. Weekbl., Sci. Ed.* **10**: 267-271.
- VAN ES, R. M., SETFORD, S. J., BLANKWATER, Y. J. & MEIJER, D. (2001) Detection of gentamicin in milk by immunoassay and flow injection analysis with electrochemical measurement. *Anal. Chim. Acta* **429**: 37-47.
- VAN HAMONT, J. E., KLEIN, R. F. & SENTERFIT, L. B. (1980) Substrate-labeled fluorometric immunoassay for serum gentamicin determination. *Am. Soc. Microbiol. p.*: 514-515.
- VAN HOLTHOON, F. L., ESSERS, M. L., MULDER, P. J., STEAD, S. L., CALDOW, M., ASHWIN, H. M. & SHARMAN, M. (2009) A generic method for the quantitative analysis of aminoglycosides (and spectinomycin) in animal tissue using methylated internal standards and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **637**: 135-143.
- VASILIADES, J., HALSTED, T., KITELEY, T. & COX, R. S. (1984) Determination of theophylline, phenytoin, phenobarbital, gentamicin, and tobramycin by fluorescence polarization immunoassay and enzyme immunoassay. *J. Clin. Lab. Autom.* **4**: 315-320.
- VEGA, M. A., GARCIA, G., GESCHE, E. & SAELZER, R. (1991) Quantitation of components C1, C2, and C1a of gentamicin C by HPTLC: application to the analysis of residues in poultry meat. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC* **4**: 142-145.
- VOEGEL, P. D. & BALDWIN, R. P. (1997) Evaluation of copper-based electrodes for the analysis of aminoglycoside antibiotics by CE-EC. *Electroanalysis* **9**: 1145-1151.
- VUCICEVIC-PRCETIC, K., CSERVENAK, R. & RADULOVIC, N. (2011) Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of gentamicin, lincomycin, and spectinomycin in the presence of their impurities in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56**: 736-742.
- WALKER, S. E. & COATES, P. E. (1981) High-performance liquid chromatographic method for determination of gentamicin in biological fluids. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **223**: 131-138.
- WAN, Q.-H. & LE, X. C. (1999) Capillary electrophoretic immunoassays for digoxin and gentamicin with laser-induced fluorescence polarization detection. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **734**: 31-38.
- WANG, H. Y., LIU, L. D., SUN, Y., MA, L. & LI, J. (2000) Determination of gentamicin by

synchronous derivative fluorimetry. *Talanta* **52**: 201-209

- WANG, L., PENG, J., LIU, Z. & HE, Y. (2010) Resonance Rayleigh-scattering spectral method for the determination of some aminoglycoside antibiotics using CdTe quantum dots as a probe. *Luminescence* **25**: 424-430.
- WANG, M.-C., WALSH, P. R. & ABARCA, S. D. (1981) Measurement of gentamicin by radioimmunoassay. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **11**: 47-52.
- WANG, M.-T., LIU, M.-H., WANG, C. R. C. & CHANG, S. Y. (2009) Silver-Coated Gold Nanoparticles as Concentrating Probes and Matrices for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of Aminoglycosides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**: 1925-1932.
- WANG, X. L., YU, Z. Y. & JIAO, K. (2007) Voltammetric studies on the interaction of amikacin with methyl blue and its analytical application. *Chin. Chem. Lett.* **18**: 94-96.
- WATSON, R. A. A., LANDON, J., SHAW, E. J. & SMITH, D. S. (1976) Polarization fluoroimmunoassay of gentamicin. *Clin. Chim. Acta* **73**: 51-55.
- WEIGAND, R. & COOMBES, R. J. (1983) Gentamicin determination by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **281**: 381-385.
- WICHERT, B., SCHREIER, H. & DERENDORF, H. (1991) Sensitive liquid chromatography assay for the determination of amikacin in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **9**, 251-254.
- WILLETS, K.A., VAN DUYN R.P. (2007) Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**: 267-297.
- WILLIAMS, J. W., LANGER, J. S. & NORTHROP, D. B. (1975) Spectrophotometric assay for gentamicin. *J. Antibiot.* **28**: 982-987.
- WILLS, P. J. & WISE, R. (1979) Rapid, simple enzyme immunoassay for gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 40-42.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1998), Toxicological evaluation of certain veterinary drugs residues in food. WHO food additive series 41, Geneva.
- WRIEDT, T. (2012) Mie Theory: A Review, Eds:W. Hergert and T. Wriedt , In: *The Mie Theory*, Springer Series in Optical Sciences 169, DOI: 10.1007/978-3-642-28738-1_2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- XU, J.-Z., ZHU, J.-J., WANG, H. & CHEN, H.-Y. (2003) Nano-sized copper oxide modified carbon paste electrodes as an amperometric sensor for Amikacin. *Anal. Lett.* **36**: 2723-2733.

- XU, Q., DU, S., JIN, G., LI, H., HU, X.Y. (2011) Determination of acetamiprid by a colorimetric method based on the aggregation of gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, **173**: 323-329.
- YANG, M. & TOMELLINI, S. A. (2001) Non-derivatization approach to high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for aminoglycoside antibiotics based on a ligand displacement reaction. *J. Chromatogr. A* **939**: 59-67.
- YEH, H.-H., LIN, S.-J., KO, J.-Y., CHOU, C.-A. & CHEN, S.-H. (2005) Rapid and selective micellar electrokinetic chromatography for simultaneous determination of amikacin, kanamycin A, and tobramycin with UV detection and application in drug formulations. *Electrophoresis* **26**: 947-953.
- YOLA, M. L., UZUN, L., OZALTIN, N. & DENIZLI, A. (2014) Development of molecular imprinted nanosensor for determination of tobramycin in pharmaceuticals and foods. *Talanta* **120**: 318-324.
- YU, C.-Z., HE, Y.-Z., FU, G.-N., XIE, H.-Y. & GAN, W.-E. (2009) Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**: 333-338.
- YUAN, L., WEI, H. & LI, S. F. Y. (2005) Direct determination of gentamicin components by capillary electrophoresis with potential gradient detection. *Electrophoresis* **26**: 196-201.
- YUSUF, A., AL-RAWITHI, S., RAINES, D., FRAYHA, H., TOONSI, A., AL-MOHSEN, I. & EL-YAZIGI, A. (1999) Simplified high-performance liquid chromatographic method for the determination of gentamicin sulfate in a microsample of plasma: comparison with fluorescence polarization immunoassay. *Ther. Drug Monit.* **21**: 647-652.
- ZAWILLA, N. H., LI, B., HOOGMARTENS, J. & ADAMS, E. (2007) Improved reversed-phase liquid chromatographic method combined with pulsed electrochemical detection for the analysis of amikacin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**: 168-173.
- ZENG, S., YONG, K.-T., ROY, I., DINH, X.-Q., YU, X., LUAN, F. (2011). A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications. *Plasmonics* **6**: 491-506.
- ZHANG, F.X., HAN, L., ISRAEL, L.B., DARAS, J.G., MAYE, M.M., LY, N.K., ZHONG, C.-J. (2002) Colorimetric detection of thiol-containing amino acids using gold nanoparticles. *The Analyst*. **127**: 462-465.
- ZHANG, L., PENG, J., TANG, J., YUAN, B., HE, R. & XIAO, Y. (2011) Description and validation of coupling high performance liquid chromatography with resonance Rayleigh scattering in aminoglycosides determination. *Anal. Chim. Acta* **706**: 199-204.

- ZHANG, Z. & PENG, J. (2011) A simple HPLC method for determination tobramycin in plasma and its application in the study of pharmacokinetics in rats. *Lat. Am. J. Pharm.* **30**: 563-567.
- ZHU, L. & WANG, J. (2013) Fast determination of tobramycin by reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography with a refractive index detector. *Front. Chem. Sci. Eng.* **7**: 322-328.
- ZHU, W.-X., YANG, J.-Z., WEI, W., LIU, Y.-F. & ZHANG, S.-S. (2008) Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *J. Chromatogr. A* **1207**: 29-37.

ÖZGEÇMİŞ

I- BİREYSEL BİLGİLER

Adı : Mehmet Gökhan
Soyadı : Çağlayan
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul – 08/06/1982
İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı, 06100 Tandoğan/Ankara 0(312)2033172

II- EĞİTİMİ

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı - Tezli yüksek lisans-2007-2009
Lisans : Orta Doğu Teknik Üniversitesi – Kimya Öğretmenliği (lisansla birleştirilmiş tezsiz yüksek lisans programı) - 2000–2005
Yabancı dili : İngilizce

III- ÜNVANLARI

Kimya Teknisyeni - 1999
Kimya Öğretmeni - 2005
Bilim Uzmanı - 2009

IV- MESLEKİ DENEYİMİ

09.1998- 06.1999 İller Bankası 1. Bölge Müdürlüğü – İçme suyu analiz laboratuvarı – içme suyu kimyasal analizleri

09.2005-06.2006	Pendik Anadolu Denizcilik Meslik Lisesi – Kimya Öğretmeni
09.2005-02.2006	80.yıl Nuh Çimento Lisesi – Kimya Öğretmeni
09.2007-12.2007	Orta Doğu Teknik Üniversitesi Çevre Analiz Laboraturarı – Su analizleri
01.2008 –	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı – Araştırma Görevlisi

V- BİLİMSEL İLGİ ALANLARI

Yayınları:

1. Mehmet Gokhan Caglayan, Feyyaz Onur (2014) Silver nanoparticles based analysis of aminoglycosides. *Spectroscopy Letters*, 47, 771–780 DOI: 10.1080/00387010.2013.845577.
2. Ismail Murat Palabiyik, Ece Göker, Mehmet Gökhan Çağlayan and Feyyaz Onur (2013) Multivariate optimization model in a partial least squares-1 method for simultaneous determination of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in eye drops, *Current Pharmaceutical Analysis*, 9(4), 404-412, DOI: 10.2174/1573412911309040008.
3. Cigdem Aybaba, Ismail Murat Palabiyik, Mehmet Gokhan Caglayan, Feyyaz Onur (2013) Multivariate optimization of separation conditions for simultaneous determination of acemetacin and chlorzoxazone by hplc using response surface methodology, *Journal of AOAC International*, 96(4), 723-729, DOI: 10.5740/jaoacint.11-092.
4. Erhan Bas, Serap Özdemir, Mehmet Gökhan Çağlayan, Ismail Murat Palabiyik, Feyyaz Onur (2013) First derivative spectrophotometric determination of cefixime and cefdinir in pharmaceutical preparations, *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences* 10(3), 321-328.
5. Mehmet Gokhan Caglayan, İsmail Murat Palabilyik, Feyyaz Onur (2012) Stability-indicating micellar elektrokinetic chromatography method for determination of finasteride in pharmaceutical preparations. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 36(6), 781-791, DOI: 10.1080/10826076.2012.673214.

6. Ismail Murat Palabiyik, Mehmet Gokhan Caglayan, Feyyaz Onur (2012) Using derivative and ratio spectra derivative: spectrophotometries as new data preprocessing method in partial least squares technique for resolving overlapped spectra of montelukast sodium, desloratadine, and levocetirizine dihydrochloride. *Reviews in Analytical Chemistry*, 31(2), DOI 10.1515/revac-2011-0013.
7. Çiğdem Aybaba, Mehmet Gökhan Çağlayan, İsmail Murat Palabiyik, Feyyaz Onur (2012) Spectrophotometric methods for determination of quetiapine hemifumarate in pharmaceutical preparations using bromcresol purple and bromcresol green, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 9(3), 301-310.
8. Elif Karacan, M. Gokhan Caglayan, I. Murat Palabiyik, Feyyaz Onur (2011) Liquid chromatographic and spectrophotometric determination of diflucortolone valerate and isoconazole nitrate in creams. *Journal of AOAC International*, 94(1), 128-135.
9. Ismail Murat Palabiyik, Mehmet Gokhan Caglayan and Feyyaz Onur (2011) Multivariate Optimization and Validation of a CE method for Simultaneous Analysis of Dorzolamide Hydrochloride and Timolol Maleate in Ophthalmic Solution. *Chromatographia*, 73(5-6), 541-548, DOI: 10.1007/s10337-010-1901-6.
10. M. Gokhan Caglayan, I. Murat Palabiyik, Mustafa Bor, Feyyaz Onur (2011) .Optimisation and validation of liquid chromatographic and partial least-squares-1 methods for simultaneous determination of enalapril maleate and nitrendipine in pharmaceutical preparations. *Chemical Papers*, 65(6), 754-760, DOI: 10.2478/s11696-011-0078-2.
11. M. Gokhan Caglayan, I. Murat Palabiyik, Feyyaz Onur (2010) Development and Validation of Spectrophotometric and High-Performance Column Liquid Chromatographic Methods for the Simultaneous Determination of Dienogest and Estradiol Valerate in Pharmaceutical Preparations. *Journal of AOAC International*, 93(3), 862-868.

12. Hakan Özbakan, İsmail Murat Palabıyık, Mehmet Gökhan Çağlayan, Feyyaz Onur (2009) Spectrophotometric and Liquid Chromatographic Determination of Acemetacin in Pharmaceutical Formulations, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(3), 163 - 176.

Poster Sunumları:

1. Filiz Bakar, Mehmet Gokhan Caglayan, Feyyaz Onur, Serpil Nebioglu, İsmail Murat Palabıyık,” Gold nanoparticle conjugated lignan derivatives inhibited the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells” 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 5-8 July 2014, Munich, Germany.
2. Mehmet Gokhan CAGLAYAN, Feyyaz ONUR, “Silver nanoparticle sensor for detection of aminoglycosides in milk” FIP World Congress 2013, 30 August – 05 September 2013, Dublin, Ireland.
3. Fatih KARADEMİR, Mehmet Gokhan CAGLAYAN, İsmail Murat PALABIYIK, Feyyaz ONUR, “Response surface methodology in optimization of hplc analysis of fluoxetine and olanzapine” HPLC 2013, 16-20 September 2013, Amsterdam, Holland.
4. Mehmet Gokhan CAGLAYAN, İsmail Murat PALABIYIK, Mustafa BOR, Feyyaz ONUR, “Determination of nitrendipine and enalapril maleate in pharmaceuticals by reversed-phase HPLC and PLS-1” National Analytical Chemistry Congress, 03-07 September 2012, Hatay, Turkey.
5. Mehmet Gokhan CAGLAYAN, İsmail Murat PALABIYIK, Feyyaz ONUR, “Stability-indicating micellar elektrokinetic chromatography method for determination of finasteide in pharmaceutical preparations” 36thInternational Symposium on Capillary Chromatograghy, 27 May – 1 June 2012, Riva del Garda, Italy
6. Mehmet Gokhan CAGLAYAN, İsmail Murat PALABIYIK, Feyyaz ONUR, “Capillary Electrophoretic Determination of Timolol Maleate and Dorzolamide Hydrochloride in Eye Drops” ISC 2010, 12 -16 September 2010, Valencia, SPAIN

7. Cigdem AYBABA, Ismail Murat PALABIYIK, Mehmet Gokhan CAGLAYAN, Feyyaz ONUR, “Multivariate Optimization of The Experimental Conditions in High Performance Liquid Chromatographic Method Using Response Surface Methodology” ISC 2010, 12 -16 September 2010, Valencia, SPAIN
8. Cigdem AYBABA, Mehmet Gokhan CAGLAYAN, Ismail Murat PALABIYIK, Feyyaz ONUR, “Spectrophotometric method for determination of quetiapine in pharmaceutical preparations” International Symposium on Pharmaceutical Sciences 9th, 23-26 June 2009, Ankara, TURKEY
9. Mehmet Gokhan CAGLAYAN, Ismail Murat PALABIYIK, Feyyaz ONUR, “Simultaneous spectrophotometric determination of estradiol valerate and dienogest in pharmaceutical preparations by principle component regression method”, International Symposium on Pharmaceutical Sciences 9th, 23-26 June 2009, Ankara, TURKEY
10. Mehmet Gokhan CAGLAYAN, Ismail Murat PALABIYIK, Feyyaz ONUR, “Liquid chromatographic and spectrophotometric determination of dienogest and estradiol valerate in a pharmaceutical preparation” 6th Aegean Analytical Chemistry Days, AACD 2008, 09-12 October 2008, Denizli, TURKEY