DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜT VE YUMURTA ÖRNEKLERİNDE BAZI FLOROKİNOLONLARIN KROMATOGRAFİK TAYİNİ ÖNCESİ KATI FAZ ÖZÜTLEMESİ İÇİN SORBENT GELİŞTİRİLMESİ

Deniz ERDOĞAN

Mayıs, 2014
İZMİR

SÜT VE YUMURTA ÖRNEKLERİNDE BAZI FLOROKİNOLONLARIN KROMATOGRAFİK TAYİNİ ÖNCESİ KATI FAZ ÖZÜTLEMESİ İÇİN SORBENT GELİŞTİRİLMESİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Deniz ERDOĞAN

Mayıs, 2014

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

DENİZ ERDOĞAN, tarafından **DOÇ. DR. SERAP SEYHAN BOZKURT** yönetiminde hazırlanan **"SÜT VE YUMURTA ÖRNEKLERİNDE BAZI FLOROKİNOLONLARIN KROMATOGRAFİK TAYİNİ ÖNCESİ KATI FAZ ÖZÜTLEMESİ İÇİN SORBENT GELİŞTİRİLMESİ"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Serap SEYHAN BOZKURT

Yönetici

Prof. Dr. Ayzegül PALA

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Nüvaret Yurdakoç

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Ayşe OKUR

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her aşamasında bana bilgi birikimini sunan yardımlarını esirgemeyen başta tez danışman hocam Doç. Dr. Serap SEYHAN BOZKURT olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Melek MERDİVAN, Prof. Dr. Nalan TÜZMEN ve Araş. Gör. Dr. Mine ANTEP'e,

Ayrıca çalışmalarımın bir bölümünü yürüttüğüm Dokuz Eylül Üniversitesi Deniz Bilimleri Enstitüsü'nde laboratuvar ve cihazlarını bizimle paylaşan Prof. Dr.Nihayet BİZSEL hocama ve laboratuvar arkadaşlarıma,

Yüksek lisans sırasında TÜBİTAK 111T404 nolu proje ile beni destekleyen Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu'na,

Yüksek lisansım boyunca yanımda olan, manevi desteklerini ve inançlarını esirgemeyen başta sevgili anneannem Hatice TEZEL olmak üzere tüm aileme, dostlarıma ve emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deniz ERDOĞAN

SÜT VE YUMURTA ÖRNEKLERİNDE BAZI FLOROKİNOLONLARIN KROMATOGRAFİK TAYİNİ ÖNCESİ KATI FAZ ÖZÜTLEMESİ İÇİN SORBENT GELİŞTİRİLMESİ

ÖZ

Çalışmada 1-oktil-3-metil imidazolyum hegzaflorofosfat iyonik sıvısı sentezlenmiştir. Sentezlenen iyonik sıvı kitosan ile etkileştirilmiştir ve elde edilen sorbent FTIR ile karakterize edilerek termal davranışı TG/DTG eğrisi ile incelenmiştir. Hazırlanan iyonik sıvı bazlı kitosan sorbenti ile bazı florokinolon (marbofloksazin, enoksazin, ofloksazin, siprofloksazin ve enrofloksazin) grubu antibiyotiklerin kromatografik tayin öncesi zenginleştirilmesi için katı faz ekstraksiyon yöntemi optimize edilmiştir. Florokinolonlar pH 3'de ve 0,2 gram sorbent kullanılarak zenginleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem süt ve yumurta örneklerindeki florokinolon kalıntı miktarlarının tayin öncesi zenginleştirilmeleri için başarıyla uygulanmıştır. Çalışılan tüm florokinolonlar için gözlenebilme sınırı, doğrusal çalışma aralığı, korelasyon katsayısı, gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik belirlenmiştir. Yöntemin doğruluğu belli derişimde florokinolon standardının süt ve yumurta örneklerine eklenmesi ve yüksek geri kazanım değerlerinin elde edilmesi ile gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Florokinolon, iyonik sıvı, kitosan, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, katı faz ekstraksiyonu

PROGRESSING SORBENT FOR SOLID PHASE EXTRACTION PRIOR TO LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF SOME FLUOROQUINOLONES IN MILK AND EGG SAMPLES

ABSTRACT

In study, 1-octyl-3-methyl imidazolium hegzafluorophosphate ionic liquid has been synthesized. This ionic liquid has been treated with chitosan and the prepared sorbent has been characterized by FTIR and thermal property investigated by TG/DTG curve. The solid phase extraction method has been optimized for the preconcentration of fluoroquinolone group (marbofloxacin, enoxacin, ofloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin) antibiotics before chromatographic determination by prepared chitosan sorbent based on ionic liquid. Fluoroquinolones have been concentrated using 0.2 g sorbent at pH 3. Proposed method has been successfully applied to preconcentration of fluoroquinolone residues in milk and egg samples prior to determination. Limit of detection, linear working range, correlation coefficient, reproducibilities of within-day and between days for each studied fluoroquinolones have been determined. The accuracy of method has been showed by getting high recovery in milk and egg samples by spiking certain amount of fluoroquinolone standart solution.

Keyword: Fluoroquinolone, ionic liquid, chitosan, high performance liquid chromatography, solid phase extraction

İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZ iv
ABSTRACT v
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
TABLOLAR LİSTESİ xi

BÖLÜM BİR – GİRİŞ 1

1.1 Antibiyotikler 1
1.1.1 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması 2
1.2 Kinolonlar 3
1.2.1 Florokinolonlar 4
1.2.1.1 Enoksazin 4
1.2.1.2 Ofloksazin 5
1.2.1.3 Siprofloksazin 5
1.2.1.4 Enrofloksazin 6
1.2.1.5 Marbofloksazin 6
1.2.2 Florokinolonların Etkileri 7
1.2.3 Florokinolonların Maksimum Kalıntı Limitleri 7
1.3 Gıda Ürünlerinde Florokinolon Analizi 8
1.3.1 Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) 8
1.4 Tayin Öncesi Zenginleştirme Yöntemleri 10
1.4.1 Katı Faz Ekstraksiyonu (KFE) 10
1.4.1.1 Katı Faz Ekstraksiyonunda Kullanılan Sorbent Çeşitleri 12
1.4.1.2 Katı Faz Ekstraksiyonunda Kullanılan Polimerik Sorbentler 13
1.4.1.3 Baskılanmış Polimerler 14
1.4.1.4 Hemimisel-Admisel Sorbentler 15
1.4.1.5 Kitosan 16

1.5 İyonik Sıvılar 17
1.6 Katı Faz Ekstraksiyonu Metoduyla Bazı Florokinolon Grubu Antibiyotiklerin Uygulamaları 17
1.7 Çalışmanın Amacı 19

BÖLÜM İKİ-MATERYAL VE YÖNTEM 21

2.1 Kullanılan Kimyasallar 21
2.2 Kullanılan Cihazlar 21
2.3 Çözeltilerin Hazırlanması 22
2.3.1 Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması 22
2.3.2 Antibiyotik Çözeltilerinin Hazırlanması 22
2.4 İyonik Sıvı Sentezi 22
2.4.1 1-Oktil 3-Metil İmidazolyum İyodür (OMII) Sentezi 22
2.4.2 1-Oktil 3-Metil İmidazolyum Hegzaflorofosfat ($OMIPF_6$) Sentezi 23
2.5 $OMIPF_6$ Bazlı Kitosan Sorbentinin (CH-$OMIPF_6$) Hazırlanması 23
2.6 Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi 24
2.6.1 Optimizasyon Çalışmaları 24
2.6.2 Süt ve Yumurta Örneklerinin Optimizasyonu 24
2.7 HPLC Koşulları 24
2.8 Florokinolonlar İçin Kalibrasyon Eğrileri 25
2.9 Süt ve Yumurta Örneklerinin Analize Hazırlanması 26
2.9.1 Süt Örneklerinin Analize Hazırlanması 27
2.9.2 Yumurta Örneklerinin Analize Hazırlanması 27

BÖLÜM ÜÇ- SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME 28

3.1 İyonik Sıvının Karakterizasyonu 28
3.1.1 OMII ve $OMIPF_6$'ın FTIR Spektrumu 28
3.1.2 OMII ve $OMIPF_6$'ın ^{1}H-NMR Spektrumu 30
3.1.3 OMII ve $OMIPF_6$'ın Termal Analizleri 30
3.2 $OMIPF_6$ Emdirilmiş Kitosan Sorbentlerinin Karakterizasyonu 31
3.2.1 İyonik Sıvı Bazlı Kitosan Sorbentinin FTIR Spektrumu 32

3.2.2 İyonik Sıvı Bazlı Kitosan Sorbentinin SEM Görüntüsü 33
3.2.3 İyonik Sıvı Bazlı Kitosan Sorbentinin Termal Analiz Sonuçları 34
3.3 Katı Faz Ekstraksiyonu Yönteminin Optimizasyonu 34
3.3.1 pH Optimizasyonu 35
3.3.2 Sorbent Miktarı Optimizasyonu 35
3.3.3 Sıyırma Çözeltisinin ve Hacminin Optimizasyonu 36
3.3.4 Tutunma ve Sıyırma Akış Hızları Optimizasyonu 37
3.4 Kitosan Sorbenti ile Tutunma 38
3.5 Analitik Performans 39
3.6 Süt ve Yumurta Örnekleri 40
3.7 Değerlendirme 44

KAYNAKLAR 45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Antibiyotiklerin mekanizma çeşitleri 1
Şekil 1.2 Kinolonun kimyasal yapısı 3
Şekil 1.3 Florokinolonun kimyasal yapısı 4
Şekil 1.4 Enoksazinin kimyasal yapısı 5
Şekil 1.5 Ofloksazinin kimyasal yapısı 5
Şekil 1.6 Siproksazinin kimyasal yapısı 6
Şekil 1.7 Enrofloksazinin kimyasal yapısı 6
Şekil 1.8 Marbofloksazinin kimyasal yapısı 7
Şekil 1.9 Katı faz ekstraksiyonunun aşamaları 11
Şekil 1.10 KFE'de kullanılan sorbent çeşitleri 12
Şekil 1.11 Molekül baskılanmış polimer sentezi 15
Şekil 1.12 Hemimisel-admisel yapısı 16
Şekil 1.13 Kitosanın kimyasal yapısı 16
Şekil 2.1 1-oktil-3-metil imidazolyum iyodür sentezi 23
Şekil 2.2 1-oktil-3-metil imidazolyum hegzaflorofosfat sentezi 23
Şekil 2.3 MARBO, ENO, OFLO, CIPRO ve ENRO'nun DAD ve FLD dedektörlerinde alınmış HPLC kromatogramı 26
Şekil 3.1 OMII iyonik sıvısının FTIR spektrumu 29
Şekil 3.2 $OMIPF_6$ iyonik sıvısının FTIR spektrumu 29
Şekil 3.3 OMII iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi 31
Şekil 3.4 $OMIPF_6$ iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi 31
Şekil 3.5 Kitosanın FTIR spektrumu 32
Şekil 3.6 $OMIPF_6$ emdirilmiş kitosanın FTIR spektrumu 33
Şekil 3.7 Kitosanın ve iyonik sıvı emdirilmiş kitosanın SEM görüntüsü 33
Şekil 3.8 CH-$OMIPF_6$ sorbentinin TG/DTG eğrisi 34
Şekil 3.9 Florokinolonların CH-$OMIPF_6$ sorbenti üzerinde farklı pH'larda tutunma sonuçları 35
Şekil 3.10 Florokinolonların farklı miktarlardaki CH-$OMIPF_6$ sorbenti üzerinde tutunma sonuçları 36

Şekil 3.11 Florokinolonların farklı sıyırma çözeltilerinde % geri kazanım sonuçları 37
Şekil 3.12 Florokinolonların farklı akış hızlarında CH-OMIPF_6 sorbenti üzerinde tutunma sonuçları 38
Şekil 3.13 Florokinolonların farklı akış hızlarında CH-OMIPF_6 sorbenti üzerinden sıyırma sonuçları 38

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 Antibiyotiklerin sınıflandırması..... 3
Tablo 1.2 Kinolon grubu antibiyotiklerin sınıflandırmaları..... 4
Tablo 1.3 Bazı florokinolon grubu antibiyotikler için (MKL) değerleri 8
Tablo 1.4 HPLC'de ayırma ile ilgili bazı parametreler..... 9
Tablo 1.5 Bazı Amberlit reçinelerin özellikleri. 14
Tablo 2.1 Florokinolonların HPLC ile analiz koşulları.. 25
Tablo 2.2 Florokinolonların standart kalibrasyon verileri ve alıkonma zamanları.... 26
Tablo 3.1 İyonik sıvıların FTIR spektrum verileri..... 28
Tablo 3.2 OMIPF_6 bazlı kitosan sorbentinin FTIR spektrum verileri.. 32
Tablo 3.3 Kitosan sorbenti üzerinde florokinolonların tutunma miktarı. 39
Tablo 3.4 Florokinolonlar için elde edilen analitik parametreler..... 41
Tablo 3.5 Süt örneklerinde florokinolonların analiz sonuçları. 42
Tablo 3.6 Yumurta örneklerinde florokinolonların analiz sonuçları.. 43

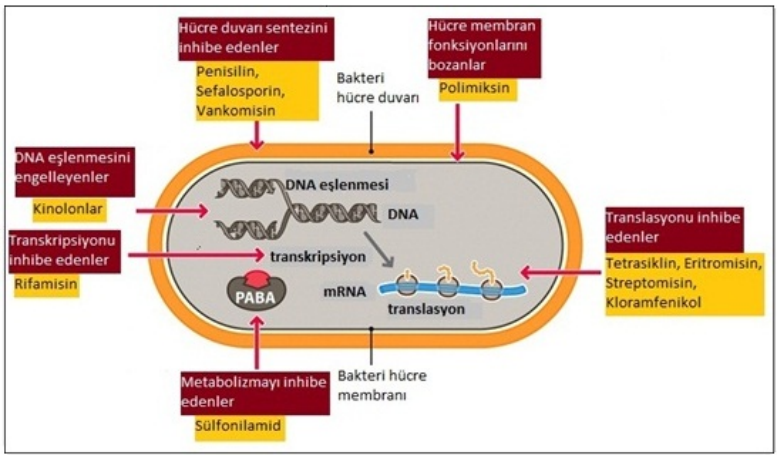
BÖLÜM BİR
GİRİŞ

1.1 Antibiyotikler

Antibiyotikler, zararlı mikroorganizmaları öldüren ya da büyümelerini durduran, doğal ya da sentetik olarak elde edilen bileşiklere verilen genel addır (Joshi, 2002).

Antibiyotikler 1929 yılında Alexander Fleming tarafından bakteri yetiştirdiği kaba yanlışlıkla mantar koyması sonucu mantar olan bölgede bakteri büyümesinin olmadığını gözlemlemesiyle keşfedilmiştir (Aminov, 2010). Antibiyotik çalışmaları bu keşiften sonra günümüze dek uzanan geniş bir alanda başlamış ve devam etmiştir.

Pek çok antibiyotik; mantarlar (örneğin; penisilin, sefalosporin), *Bacillus* türü bakteriler (örneğin; polimiksin, basitrasin) ve *Streptomyces* türü bakteriler (örneğin; streptomisin, tetrasiklin, eritromisin, kanamisin, neomisin, nistatin) tarafından üretilmektedir (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), 2013). Antibiyotiğin bu canlılar tarafından üretilmesi kendi besin zincirlerini diğer türlerden korumak, bir başka deyişle doğal seleksiyona karşı korunmak amaçlıdır. Antibiyotikler, bakteri enfeksiyonları üzerinde etkili olmalarına rağmen, virüs ve mantarlar üzerinde etkileri yoktur. Bakterilere yaşamsal faaliyetlerini engellemek yoluyla etki ederler, böylece bakteri hücreleri ölebilir ya da büyümeleri durur (Fox, 2010; Mayer, 2010). Bakteri hücrelerine olan etkileri Şekil 1.1'de verilmektedir Bbosa, Mwebaza, Odda, Kyegombe ve Ntale, 2014).



Şekil 1.1 Antibiyotiklerin mekanizma çeşitleri

Antibiyotiklerin veteriner uygulamalarında yaygın kullanımları, hayvansal besin gıdalarında kalıntıya neden olabilmektedir. Bu kalıntılar hayvanlarda başlıca karaciğer ve böbrek olmak üzere çeşitli organlar ile kas dokularında birikebilmekte ve hayvansal ürünlere de geçebilmektedir (Takatsuki, Ozhizawa ve Shoji, 1987; Cordle, 1988). Bu gıdaların insanlar tarafından kullanılması, insan sağlığı üzerinde özellikle hassas kişilerde alerjik reaksiyona neden olabilir ve bağışıklık sistemini tehlikeye atabilirler. Kalıntıların az miktarda olması bile uzun vadede bakterilerin dirençli hale gelmesini sağlayabilir. Bu nedenle hayvan besiciliğinde antibiyotik kullanımının sıkı denetimden geçmesi gerekmektedir.

Pek çok ülkede gıdalardaki kalıntı düzeylerinin belirlenmesi için devlet yetkilileri tarafınca, gıda güvenliğini artırmak için dünya çapında düzenleme yapılmıştır (Ramirez ve diğer., 2003). Yem katkı maddesi olarak kullanılan ürünlerin satılmaması için maksimum kalıntı düzeyleri belirlenmiştir (Wegener, 2003; Avrupa Konseyi 2003). Ayrıca hayvanlara yem katkı maddesi olarak ilaç verilirken karışımın uzmanlar tarafından hazırlanması şartı konulmuştur. Bu yüzden antibiyotiklerin gıdalarda olması gereken maksimum kalıntı düzeylerinin belirlenebilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

1.1.1 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

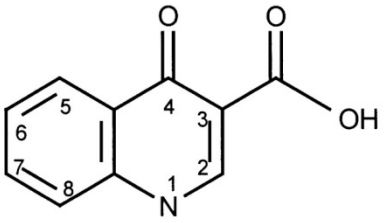
Antibiyotik sınıfları, benzer molekül yapısı ve benzer etkilere sahip bileşiklerin gruplandırılmasıyla oluşturulmuştur. Sınıflar arasındaki farklılıklar moleküllerin farklı yan zincirlerinin olmasıyla ve böylelikle farklı özellikler kazanmasıyla oluşur (Wang, MacNeil ve Kay, 2012). Başlıca antibiyotik sınıfları Tablo 1.1'de gösterilmektedir.

Tablo 1.1 Antibiyotiklerin sınıflandırması

Aminoglikozidler	β-Laktamlar	Glikopeptidler
	Penisilinler	
	Karbapenemler	
	Sefalasporinler	
Kinolonlar	**Makrolidler**	**Oksazolidinonlar**
Nalidiksik Asit	Eritromisinler	
Siprofloksasin	Kloritromisinler	
Levofloksasin	Azitromisinler	
	Linkozamidler	**Diğer antibiyotikler**
	Klindamisinler	Tetrasiklinler
		Metronidazol

1.2 Kinolonlar

Kinolonlar insan ve hayvanlar üzerindeki enfeksiyonlarda sıklıkla kullanılan antibakteriyal maddelerdir (Herna´ndez-Arteseros, Barbosa, Compan˜o´ ve Prat, 2002). Temel yapıları Şekil 1.2' de gösterilen kinolonların başlıca hedefleri, DNA molekülüne etki eden ve biyolojik aktivite kazandıran, bakteriyal enzim olan DNA Giraz ya da Topoizomeraz 2 enziminin inhibisyonudur.



Şekil 1.2 Kinolonun kimyasal yapısı

Kinolonlar; 4.pozisyonda keton grubu içeren 8 üyeli heterosiklik bileşik ve azot içeren yapılardır. Nalidiksik asitin 1962 yılında keşfinden sonra bazı yapısal ekleme ve değişiklikler ile biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri artmıştır. Bu eklemeler 1. pozisyona alkil ve aril gruplarının ya da 6. pozisyona piperazinil ve floro gruplarının eklenmesi şeklindedir. 6. pozisyona floro grubu eklenmesi gram negatif ve gram pozitif bakterilerine karşı geniş spektrum kazanmasına neden olmuştur (Herna´ndez-

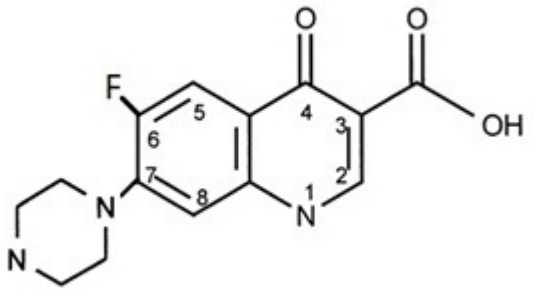
Arteseros, Barbosa, Compan˜o´ ve Prat, 2002). Tablo 1.2'de Kinolonların geçmişten günümüze kadar olan sürede nasıl sınıflandırıldıkları verilmektedir.

Tablo 1.2 Kinolon grubu antibiyotiklerin sınıflandırmaları

1.Jenerasyon kinolonlar	2.Jenerasyon kinolonlar	3.Jenerasyon kinolonlar	4.Jenerasyon kinolonlar	Geliştirilmekte Olanlar	Veteriner ilaç olarak kullanılanlar
Sinoksazin	Siprofloksazin	Balofloksazin	Gatifloksazin	Delafloksazin	Danofloksazin
Nalidiksik asit	Enoksazin	Levofloksazin	Gemifloksazin	JNJ-Q2	Enrofloksazin
Oksolinik asit	Fleroksazin	Pazufloksazin	Moksifloksazin	Demonoksazin	Marbofloksazin
Pipedimik asit	Lomefloksazin	Sparfloksazin	Sitafloksazin		Orbifloksazin
Rozoksazin	Ofloksazin	Temafloksazin	Sarafloksazin		Sarafloksazin

1.2.1 Florokinolonlar

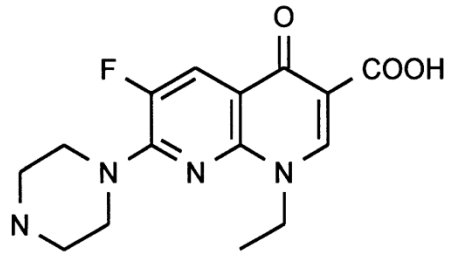
Florokinolonlar kinolon grubunun 2. jenerasyonu olup onlardan temel farkı C-6 pozisyonunda flor atomu ve 7. pozisyonunda piperazinil grubu içermesidir. Bu farklılık ona antibakteriyel aktivitenin artmasını sağlamaktadır. Flor atomu gram-pozitif bakterilere, piperazinil grubu ise gram-negatif bakterilere karşı direncin arttırılmasını sağlar. Florokinolonların temel yapısı Şekil 1.3'de gösterilmektedir.



Şekil 1.3 Florokinolonun kimyasal yapısı

1.2.1.1 Enoksazin (ENO)

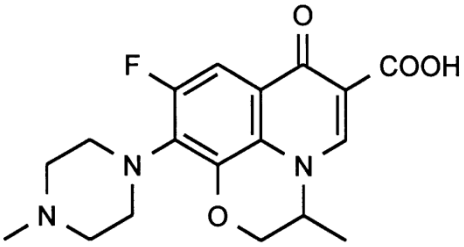
Enoksazin; (1-etil-6-floro-1,4-dihidro-4-okso-7-(1-piperazinil)-1,8-nafthidrin-3-karboksilik asit) cinsel yoldan geçen bakteri ve üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (Samanidou, Christodoulou ve Papadoyannis, 2005). Şekil 1.4'de Enoksazin'in kimyasal yapısı verilmektedir.



Şekil 1.4 Enoksazinin kimyasal yapısı

1.2.1.2 Ofloksazin (OFLO)

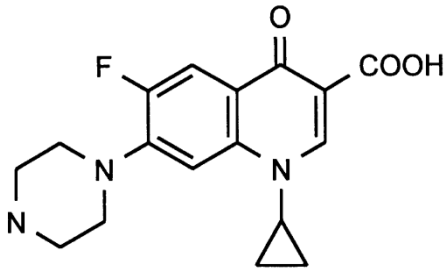
Ofloksazin; ((+)-9-floro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-okso-7H-pirido-(1,2,3-de)-1,4-benzoksazin-6-karboksilik asit) insanlarda akut ve kronik enfeksiyon hastalıklarında (üriner sistem hastalıkları) ve osteomiyelitis gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Samanidou, Christodoulou ve Papadoyannis, 2005). Şekil 1.5'de Ofloksazin'in açık yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.5 Ofloksazinin kimyasal yapısı

1.2.1.3 Siprofloksazin (CIPRO)

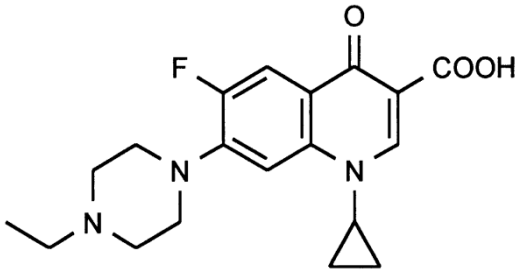
Siprofloksazin*;* (1-siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-4-okso-7-(1-piperazinil)-3-kinolin karboksilik asit) enrofloksazinin temel metabolitidir. Daha geniş etki alanına ve daha düşük toksisiteye sahiptir. Siprofloksazinin diğer antibiyotiklerden temel farkı oral ve parenteral yolla alınmasıdır. Dokulara ve vücut sıvılarına çok iyi absorbe olur. Üriner sistem, akciğer enfeksiyonları, mide enfeksiyonları ve cilt enfeksiyonları tedavisinde kullanılır (Samanidou, Christodoulou ve Papadoyannis, 2005). Şekil 1.6'da Siprofloksazin'in açık yapısı verilmektedir.



Şekil 1.6 Siproksazinin kimyasal yapısı

1.2.1.4 Enrofloksazin (ENRO)

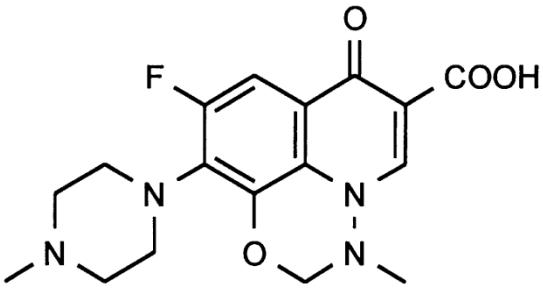
Enrofloksazin; (1-siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-4-okso-7-(4-etil-1-piperazinil)-3-kinolin karboksilik asit) sadece hayvan enfeksiyonlarında kullanılmaktadır. Parenteral ve oral yolla alınabilir. Tavuk ve yumurta üretiminde kullanılması, tüketimi sonucu insan sağlığına zarar verebileceğinden dolayı yasaklanmıştır (Samanidou, Christodoulou ve Papadoyannis, 2005). Şekil 1.7'de Enrofloksazin'in açık yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.7 Enrofloksazinin kimyasal yapısı

1.2.1.5 Marbofloksazin (MARBO)

Marbofloksazin; (9-floro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-okso-7H-piridol(3,2,1-ij)(4,2,1)benzoksadiazin-6 karboksilik asit) oral veya deri yoluyla alınabilinir. İnsanlarda cilt, solunum sistemi, kedi ve köpekler için ise üriner sistem hastalıklarında kullanılır (Wikipedia, 2014). Şekil 1.8'de Marbofloksazin'in açık yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.8 Marbofloksazinin kimyasal yapısı

1.2.2 Florokinolonların Etkileri

Kinolonların hayvanlarda yaygın olarak kullanımları, hayvansal gıdalarda kinolon kalıntısına neden olur. Bu gıdaların insanlar tarafından kullanıldıktan sonra kısmen metabolize edilmeleri ve vücuttan tam olarak atılamamaları nedeni ile kinolonların vücutta birikimi söz konusudur. Bu kalıntılar insanlarda hafif bir alerjiden başlayarak doku ve organlarda hasara hatta ölüme neden olabilir (Gustafson ve Bowen, 1997). Bu nedenlerle Avrupa insan sağlığı yetkilileri tarafınca, gıdalarda kaliteyi artırmak amacıyla, ilaç kalıntıları için yaptıkları düzenlemelerle gıdalardaki antibiyotiklerin maksimum kalıntı limitleri belirlenmiştir. Gıdalarda bulunan antibiyotiklerin belirlenen değerlerin üzerinde olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir (Stoilova, Surleva ve Stoev, 2013).

1.2.3 Florokinolonların Maksimum Kalıntı Limitleri

Florokinolon grubu sentetik antibiyotikler doğal antibiyotiklere benzer fonksiyonlara sahiptir (Kishida, 2007). Bu antibiyotikler, çiftlik hayvanlarında bağırsak ve solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır (Hormazabal, Steffenak ve Yndestad, 1993). Bu hayvansal ürünlerin tüketilmesi ise insan sağlığını tehdit ettiği için, antibiyotiklerin maksimum kalıntı limitlerinin bilinmesi gerekmektedir. Tablo 1.3'de bazı florokinolon grubu antibiyotiklerin bazı gıda ürünlerindeki maksimum kalıntı düzeyleri verilmektedir (Avrupa Konseyi. 2003; Chafer-Pericas, Maquieira ve Puchades, 2010).

Tablo 1.3 Bazı florokinolon grubu antibiyotikler için (MKL) değerleri

Örnek tipi		MKL*
Yumurta	Yumurta	50-200 µg kg^{-1}
Et	kümes hayvanı	(Tavuk kası)100-400 µg kg^{-1}
		200 µg kg^{-1} enrofloksazin +siprofloksazin
Balık	Balık	600 µg kg^{-1}

*Avrupa birliğince onaylanmış MKL

1.3 Gıda Ürünlerinde Florokinolon Analizi

Gıdalardaki florokinolon kalıntı tayinleri çeşitli analitik yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Tayin için genellikle;

* yüksek performans sıvı kromatografisi (Khan, Reddy, Ravindra, Reddy ve Dubey, 2012; Marazuela ve Moreno-Bondi, 2004; Chung, Lee, Chung ve Lee, 2009)

* sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (Nakata, Kannan, Jones ve Giesy, 2005; Arnold, Granvil, Ward ve Proksch, 2008)

* yüksek performans ince tabaka kromatografisi (Dhillon ve Chaudhary, 2010; Sharma, Sharma ve Sahu; 2012)

gibi yöntemler kullanılmaktadır.

1.3.1 Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografik yöntemlerin içinde geniş uygulama alanına sahip olan HPLC pek çok molekülün tayini için kullanılmaktadır. HPLC yöntemi, sabit faz olarak adlandırılan kolon içerisindeki sorbentten, ters polaritede uygun hareketli faz olarak adlandırılan çözücülerin yüksek basınçta geçirilmesi esasına dayanmaktadır. HPLC'de ayırma için önemli olan parametreler Tablo 1.4'de verilmektedir.

Tablo 1.4 HPLC'de ayırma ile ilgili bazı parametreler

Eşitlik Adı	Eşitlik
Teorik Tabaka Sayısı	$N = 16\ (t_R/W)^2$
Alıkoyma Faktörü	$k' = (t_R - t_M) / t_M$
Seçicilik Faktörü	$\alpha = [(t_R)B - t_M] / [(t_R)_A - t_M]$
Çözünürlük	$R_s = 2\ [(t_R)_B - (t_R)_A] / [W_A + W_B]$

Burada;

t_R: Enjeksiyonun yapılması ile analit pikinin maksimum noktasının görülmesi arasında geçen zamanı,

t_M: Enjeksiyon ile mobil faz pikinin gelmesi arası geçen zamanı,

$(t_R)_A$: A türünün alıkonma süresini,

$(t_R)_B$: B türünün alıkonma süresini,

W_A : A türü için pik genişliğini,

W_B : B türü için pik genişliğini ifade etmektedir.

HPLC'nin başlıca bölümleri; degazer, pompa, örnekleyici, kolon-kolon fırını ve dedektördür. Degazer; mobil faz şişesinden taşınan hareketli fazdaki hava kabarcıklarının ve çözünmüş havanın giderilmesini sağlar. Pompa; mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlar, degazerden mobil fazı çekip, örnekleme ünitesine ve kolona gönderir, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir. Bunu izokratik veya gradient yöntem ile sağlar. İzokratik çalışmada mobil faz karışımı tek kanaldan geçecek şekilde karıştırılıp hazırlanır, gradient çalışmada cihaz farklı kanallardaki mobil faz çözeltilerini girilen komut doğrultusunda farklı oranlarda ve zamanlarda yapılabilir. Bu sayede analiz kalitesi arttırılıp, analiz süreleri azaltılabilir. Örnekleyici; örnekleyici analizi yapılan numunelerin kolon ve dedektöre gönderilmesini sağlar. Bu manuel (el tipi) ve oto örnekleyici (otomatik) olabilir. Kolon-kolon fırını; kolon (sabit faz) maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. Kolon fırını, kolonu sabit sıcaklıkta tutmak için gereklidir. Dedektör; analitin numunedeki miktarını tayin eden bölümdür. HPLC'de kullanılan başlıca dedektörler; ultraviole (UV), fotodiyot (DAD), floresans (FLD) dedektörlerdir (Yashin ve Yashin 2012).

1.4 Tayin Öncesi Zenginleştirme Yöntemleri

Gerçek örnek içerisinde bulunan analitin tayin öncesi çeşitli analitik yöntemlerle miktarının artırılması işlemine zenginleştirme yöntemi denir. Florokinolonlar için kullanılan başlıca zenginleştirme yöntemleri;

* katı faz ekstraksiyonu (Chen, Wang ve Huang, 2012; Herrera-Herrera, Hernández-Borges ve Rodríguez-Delgado, 2009),

*dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu (Moema, Nindi ve Dube, 2012; Herrera-Herrera, Hernández-Borges, Borges-Miquel ve Rodríguez-Delgado, 2013),

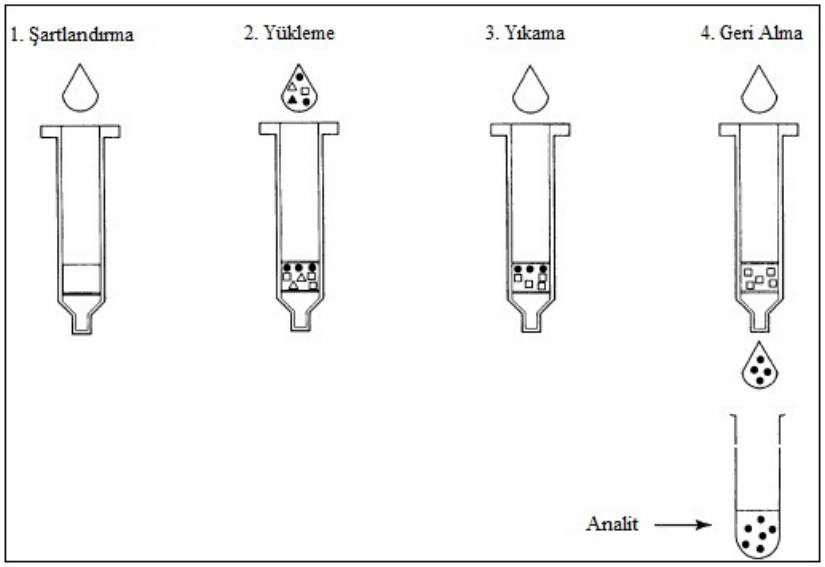
* süperkritik akışkan ekstraksiyonu (Choi, Mamun, Lee ve Shim, 2009; Shen, Kim, Lee, Kim, Lee ve Shim 2004),

* katı faz mikroekstraksiyonu (Mitani ve Kataoka, 2006) gibi yöntemlerdir.

1.4.1 Katı Faz Ekstraksiyonu (KFE)

Katı faz ekstraksiyonu, çözeltideki analitin tutunma yoluyla katı sorbent üzerinde toplanmasını ve sonrasında sorbentten uygun bir çözücü yardımıyla geri alımını içeren deriştirme ve saflaştırma işlemidir. Katı faz ekstraksiyonu, daha kolay ve güvenilir kullanımı ile sıvı-sıvı ekstraksiyonunun yerini almaktadır. Ayrıca analitin yüksek verimle geri alımı, saflaştırma derecesinin iyi olması, organik çözücü tüketiminin daha az olması, otomasyona ve kromatografik analize uygunluk gibi avantajları da bulunmaktadır.

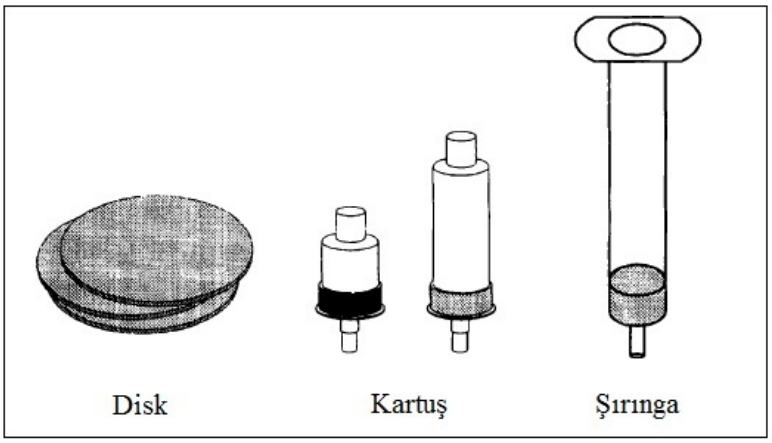
Uygulama kolaylıkları nedeniyle çevre, klinik ve ilaç örneklerinin örnek hazırlamalarında yaygın olarak kullanılan katı faz ekstraksiyonu başlıca; şartlandırma, yükleme, yıkama ve geri alma aşamalarını içerir (Thurman ve Mills 1998) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9 Katı faz ekstraksiyonunun aşamaları (Thurman ve Mills, 1998)

Katı faz ekstraksiyonunun ilk basamağı şartlandırma basamağıdır. Bu basamak fonksiyonel grupların aktif hale gelmesi ve tutunmanın sağlanması için sorbentten çözücü geçirilmesini içerir. İkinci aşama ise yükleme aşamasıdır. Bu aşamada analiti içeren çözelti kolona uygulanır. Analitin türüne göre uygulama hacmi 1 mL ile 1 L arasında olabilir. Analit çözeltisi kolona, pompa, otomatik bir sistem veya dökme suretiyle uygulanabilir. Üçüncü aşama yıkama aşamasıdır, yıkama aşamasında analit çözeltisindeki diğer girişim yapan materyallerin ortamdan uygun çözücüyle yıkanarak uzaklaştırıldığı aşamadır. Böylece sorbent üzerinde analit kalması hedeflenir. Dördüncü ve son aşama olan geri alma aşamasında ise sorbent-analit uyumu dikkate alınarak seçilen uygun çözücü ile sorbent üzerindeki analit geri alınır. Burada önemli olan sorbent üzerinde tutunan analitin az miktarda çözücüyle geri alınabilmesidir (Thurman ve Mills, 1998).

Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan sorbent genellikle disk, kartuş ve şırınga türü kolonlara doldurulur (Şekil 1.10). Diskler 4 ile 90 mm arasında değişen çapa sahiptir. Standart disk boyutu ise 4,7 mm'dir. Kartuşlar 100 mg – 1 g arası ağırlıktadır. Şırınga tipinde ise 1 ile 25 mL arası hacimde çalışılmaktadır, polipropilen veya polietilen fritlerin arasına değişen fonksiyonel gruplara sahip farklı sorbent konularak hazırlanmaktadır (Thurman ve Mills, 1998).



Şekil 1.10 KFE'de kullanılan sorbent çeşitleri (Thurman ve Mills, 1998)

1.4.1.1 Katı Faz Ekstraksiyonunda Kullanılan Sorbent Çeşitleri

Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan normal faz, ters faz, boyut dışlama ve iyon değiştirici sorbentler, sıvı kromatografisinde kullanılan sorbentlerle benzer özelliktedir. Sabit faz olarak kullanılan normal faz sorbentler, çözücü veya örnek matriksinden daha polar olan sorbentlerdir. Bu sorbentlerin kullanılması durumunda analit ile sorbent arasında hidrojen bağı ve dipol-dipol etkileşimi egemendir (Thurman ve Mills, 1998).

Ters faz sorbentler, sorbentin örnek çözeltiden daha hidrofobik olduğu durumlarda kullanılmaktadır. Bu tür sorbentlerin kullanılması durumunda analit ile sorbent arasında Van der Waals kuvvetleri birincil olarak, hidrojen bağı ve dipol-dipol etkileşimleri ise ikincil olarak etkindir.

Bazı sorbentler seçiciliğin daha iyi olması için bir arada kullanılmaktadır. Seçicilik, ekstraksiyon tekniğinin analiti örnekteki girişimlerden ayırabilme derecesidir. Analit ile katı faz arası etkileşimin sayısı seçiciliği kolaylaştırır. Bu amaçla silikajel, alumina, kitosan, aktif karbon gibi destek maddelerine siyano (CN), amino (NH_2) ve diyol gibi fonksiyonel gruplarını içeren çeşitli ligandlar kimyasal ya da fiziksel olarak bağlanarak sorbentin tutunma kapasitesi, kullanılabilirliği, dayanıklılığı artırılmaktadır.

İyon değiştirme sorbentleri ise genellikle zayıf ve güçlü katyon/anyon fonksiyonel grupların silika jel ile bağlanmasıyla Güçlü katyon değiştirme sorbentleri sülfonik

asit grupları içerirken, zayıf katyon değiştirme sorbentleri karboksilik asit gruplarını içermektedir. Güçlü anyon değiştirme grupları quaterner amin grupları içerirler, zayıf anyon değiştirme grupları ise primer, sekonder ve tersiyer amin grupları içerirler. Buradaki güçlü ve zayıf kavramında, güçlü anyon/katyon değiştirme sorbentleri herhangi bir pH'ta iyi iyon değiştirme özellikleri gösterirken, zayıf anyon/katyon değiştirme sorbentleri belirli pH değerlerinde etkindir. İyon değiştirme sorbenti olarak çapraz bağlı stirendivinilbenzen polimeri de kullanılmaktadır. Bu polimer pH:1 den pH:13 e kadar yapısı değişmediği için daha çok tercih edilir (Thurman ve Mills, 1998).

1.4.1.2 Katı Faz Ekstraksiyonunda Kullanılan Polimerik Sorbentler

Katı faz ekstraksiyonunda stirendivinilbenzen ve aktif karbon gibi organik polimerler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sorbentler silika yerine yüzey alanları 600-1200 m^2/g arasında değişen organik polimerleri içerirler. Bu sorbentler analit ile π-π etkileşimleri sağlayarak yüksek tutunma kapasitesine sahip oldukları için 1970'lerden beri katı faz ekstraksiyonunda sorbent olarak kullanılmaktadırlar. Bu sorbentlere çeşitli fonksiyonel gruplara sahip ligantlar emdirilerek ya da kimyasal olarak bağlanarak tutunma kapasiteleri artırılmaktadır.

Amberlit XAD reçineleride katı faz ekstraksiyonunda sorbent hazırlamada destek maddesi olarak kullanılmaktadır. Amberlit XAD-1; XAD-2; XAD-4 ve yüksek hidrofobik karakterde polistirendivinilbenzen içeren sorbentlerdir (Bouvier, Martin, Iraneta, Capparella, Cheng ve Phillips, 1997). Bu sorbentlerin de tutma kapasitesini, dayanıklılığını ve tekrar kullanılabilirliğini artırmak için çeşitli ligantlar fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanmaktadır. Tablo 1.5'te bazı Amberlit reçinelerinin özellikleri ve kullanım alanları verilmektedir (Bouvier, Martin, Iraneta, Capparella, Cheng ve Phillips, 1997).

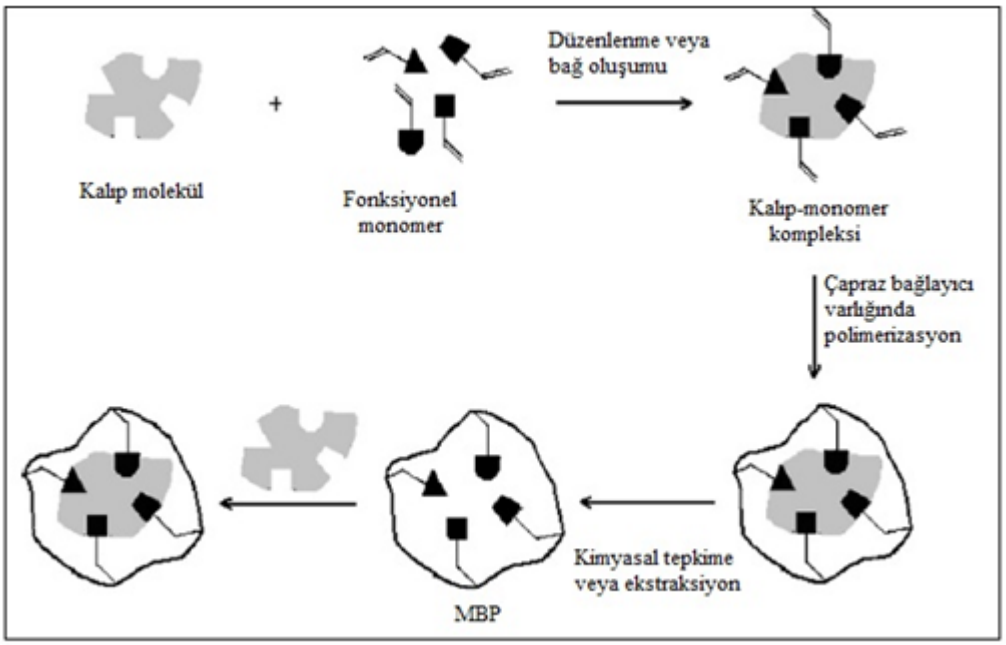
Tablo 1.5 Bazı Amberlit reçinelerin özellikleri

Amberlit	Yapısı	Yüzey alanı (m^2/g)	Ortalama por yarıçapı (A^0)	Uygulamalar
XAD-2	pStDVB	300	90	Metallerin ayrılması, antibiyotik geri kazanımı
XAD-4	pStDVB	750	100	Çözücü ve düşük ağırlıktaki türlerin uzaklaştırılması
XAD-16	pStDVB	800	150	Küçük moleküllerin ve antibiyotiklerin geri kazanımı
XAD-1180	pStDVB	500	400	Büyük moleküllerin geri kazanımı
XAD-7	Alifatik ester	500	450	Bitki ekstraksiyonu, enzim saflaştırılması

pStDVB: polistirendivinilbenzen

1.4.1.3 Baskılanmış Polimerler

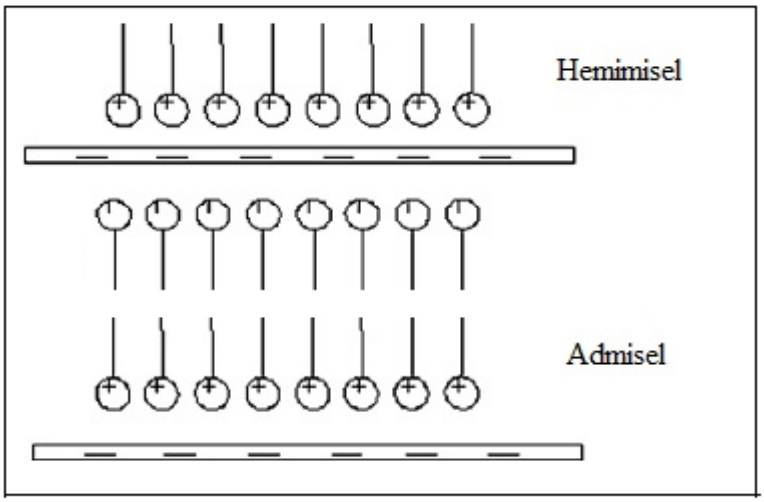
Katı faz ekstraksiyon çalışmalarında kullanılan sorbent türlerinden biri de molekül ve metal için hazırlanan baskılanmış polimerlerdir. Baskılama işlemi analitin fonksiyonel monomerle etkileştirilmesi ve sonrasında uygun işlem süreci ile kimyasal fonksiyona sahip katı malzemenin oluşturulmasını amaçlamaktadır. Analitin uzaklaştırılması ile yapıda o moleküle ya da metale özgü boşluklar elde edilmektedir (He, Long, Pan, Li ve Liu, 2007). Böylece oluşan boşluk analit için oluşturulduğundan dolayı tutma kapasite artmaktadır. Ayrıca baskılanmış polimer, kararlı, pH değişimlerine, kullanılan çözücü ve sıcaklığa dayanıklıdır. Şekil 1.11'de moleküler baskılanmış polimerin (MBP) oluşumu verilmektedir.



Şekil 1.11 Molekül baskılanmış polimer sentezi (He, Long, Pan, Li ve Liu, 2007)

1.4.1.4 Hemimisel-Admisel Sorbentler

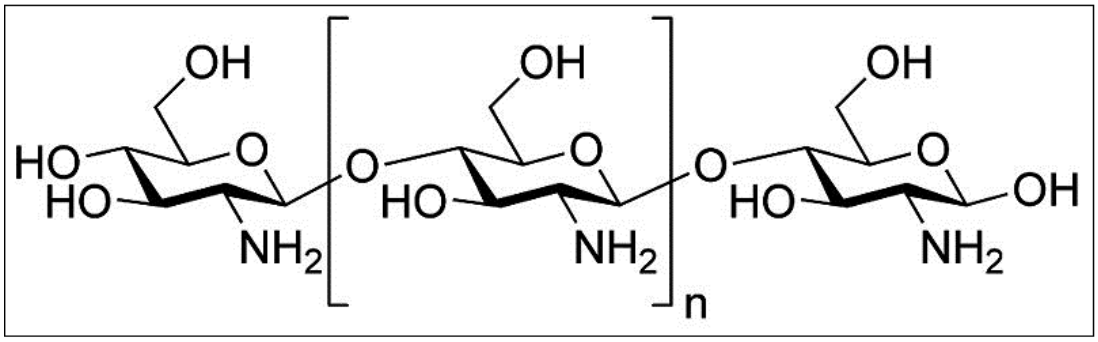
Hemimisel ve admisel sorbentler katyonik veya anyonik misellerin silikajel veya alumina gibi destek maddesi üzerine emdirilmesiyle elde edilen sorbentlerdir. Hemimiseller, misellerin tek tabaka veya uç uca oriyantasyonu şeklinde yüzeyde surfaktant oluşumudur. Admiseller ise, surfaktantın yüklü grubu ile zıt yüklü yüzey ve surfaktantın zincir-zincir grupları arasında çekim oluşmasıyla meydana gelir (Gangula, Suen ve Conte, 2010). Son yıllarda sodyum dodesil sülfat, setiltrimetil amonyum bromür, didesildimetil amonyum bromür gibi katyonik ve anyonik surfaktantlar silikajel, alumina gibi destek maddelerine uygun pH değerlerinde emdirilerek admisel sorbentler hazırlanmaktadır. Bu sorbentler geniş pH aralığında kararlı, yüksek tutunma özelliğine sahip, yüksek tekrarlanabilir özelliğe sahip oldukları için katı faz ekstraksiyon çalışmalarında hem metallerin hem de moleküllerin analiz öncesi zenginleştirilmelerinde sorben olarak kullanılmaktadırlar. Şekil 1.12'de admisel ve hemimisel yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.12 Hemimisel-admisel yapısı (Gangula, Suen ve Conte, 2010).

1.4.1.5 Kitosan

Kitosan kitinin deasetillenmiş formu olup, selülozdan sonra doğada en fazla bulunan polisakkarittir. Doğrusal β-(1→4) bağlı glukozamin ve N-asetilglukozamin karışımından oluşmaktadır (Şekil 1.13) (Fu, Liu, Liu ve Liu, 2013).



Şekil 1.13 Kitosanın kimyasal yapısı (Wikipedi, 2014)

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kitosan gıda, zirai, biyoloji ve ilaç sektörü gibi pek çok alanda biyouygunluğu, zehirsiz olması, biyoyıkımının kolay olması ve adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olması nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle membran, nanoparçacık ve mikrokapsül gibi pek çok farklı şekilde tasarlanmış ve incelenmiştir (Lian ve diğer., 2012). Üzerindeki amin grupları ve hidroksil gruplarından dolayı çeşitli fonksiyonel gruplarla kimyasal olarak bağlanma özelliğine sahiptir. Bu amaçla çeşitli kitosan bazlı sorbentler gerek metal

tayinleri gerekse molekül tayinleri için katı faz ekstraksiyon çalışmalarında sorbent olarak kullanılmaktadır.

1.5 İyonik Sıvılar

İyonik sıvılar erime noktaları 100 °C'nin altında olan oda sıcaklığında sıvı halde bulunan organik katyon (imidazolyum, piridinyum, pirolidinyum, amonyum fosfonyum vb.) ve anyon (Cl^-, Br^-, I^-, PF_6^-, BF_4^- vb.) gruplarından oluşan tuzlardır (Fontanals, Borrull ve Marce, 2012). Bu sıvılar düşük buhar basıncı, yüksek viskozite, yüksek iletkenlik ve yüksek çözünürlük gibi önemli özelliklere sahiptirler. Farklı anyon ve katyon gruplarına sahip olmalarından dolayı fiziksel ve kimyasal özellikleri de farklıdır. Anyon grubu halojen veya tetrafloroborat olan iyonik sıvıların saf sudaki çözünürlüğü yüksek olmasına rağmen anyon grubu triflorosülfonilimid ve hekzaflorofosfat olan iyonik sıvılar ise daha hidrofobik yapıdadır. İyonik sıvılar sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı ayırma, ekstraksiyon çalışmaları ve elektrokimya gibi çeşitli alanlarda geniş bir uygulama alanına sahiptir (Anderson., Armstrong, ve Wei, 2006.).

1.6 Katı Faz Ekstraksiyon Metoduyla Bazı Florokinolon Grubu Antibiyotiklerin Uygulamaları

Katı faz ekstraksiyonu yöntemi ile florokinolon tayininde farklı matriks, sorbent ve cihazlar ile pek çok çalışma yapılmıştır.

Maraschiello ve diğer., 2001 yılında yaptıkları çalışmada, çeşitli tavuk dokularında (böbrek, karaciğer, kas ve cilt dokusu) ofloksazin tayini için katı faz ekstraksiyonu ile zenginleştirme aşamasında polimerik sorbent kullanmışlardır. Sorbent yüzeyine tutunan analiti metanol çözeltisi % 80-100 geri almışlardır. Analizi HPLC-UV dedektör kullanarak gerçekleştirmişlerdir (Maraschiello, Cusido´, Abella´n ve Vilageliu, 2001).

Cinquina ve diğer., 2003 yılında, sütte enrofloksazin ve siprofloksazin tayini yapmışlardır. Bu antibiyotikleri tayin öncesi C_{18} kolonundan geçirmişler ve daha sonra HPLC-DAD ile 277 nm'de analiz etmişlerdir. Yöntemin doğruluğunu göstermek için süt içerine farklı derişimlerde enrofloksazin ve siprofloksazin standart

çözeltisinden ekleme yapmışlar ve geri kazanımın enrofloksazin için %84,23, siprofloksazin için %88,06 olduğunu bulmuşlardır (Cinquina ve diğer., 2003).

Marazuela ve diğer., 2004 yılında sütte yaptıkları çalışmada sütte siprofloksazin, enrofloksazin, marbofloksazin, sarafloksazin, danofloksazin tayini yapmışlar. Bunun için önce analitleri stirendivinilbenzen içeren kolondan geçirerek zenginleştirmişler ve daha sonra HPLC-FLD/UV ile analiz etmişlerdir. Geri sıyırma çözeltisi olarak % 4 (v/v) fosforik asit içeren metanol çözeltisi kullanmışlar ve geri kazanımın enrofloksazin, siprofloksazin ve danofloksazin için % 80-103 arasında, sarafloksazin için % 70 ve marbofloksazin için % 95 olduğunu görmüşlerdir (Marazuela ve Moreno-Bondi, 2004).

Christodoulou ve diğer., 2007 yılında katı faz ekstraksiyonunu LiChrolut RP-18 kolonunda gerçekleştirerek tavuk kası ve yumurta sarısında enoksazin, ofloksazin, norfloksazin, siprofloksazin, danofloksazin, enrofloksazin, sarafloksazin, oksolinik asit, nalidiksik asit ve flumekuin olmak üzere 10 farklı kinolon tayin etmişlerdir. % 0,1 trifloroasetik asit içeren metanol çözeltisi ile geri aldıkları çözeltileri HPLC-DAD ile analiz etmişlerdir. Tavuk kasında % 96,6 – 102,8 arasında değişen, yumurta sarısında ise %96,4 – 102,8 arasında değişen geri alım değerleri elde etmişlerdir. (Christodoulou, Samanidou ve Papadoyannis, 2007).

Benito-Pe˜na ve diğer., 2008 yılına ait çalışmalarında, florokinolon grubu antibiyotikleri su örneklerinde tayin etmişler, katı faz ekstraksiyon sorbenti olarak enrofloksazin ile birlikte (kalıp olarak kullanarak) hazırladıkları moleküler baskılanmış polimer kullanmışlar, geri alımı için %5 (v/v) asetik asit ve %2 (v/v) trifloroasetik asit içeren metanol karışımı kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Zenginleştirdikleri antibiyotikleri HPLC-FLD dedektörü kullanarak analiz etmişlerdir (Benito-Pe˜na, Urraca, Sellergren ve Moreno-Bondi, 2008).

Yiruhan ve diğer., 2010 yılında, musluk sularında yaptıkları çalışmada norfloksazin, siprofloksazin, lomefloksazin ve enrofloksazin antibiyotiklerini tayin etmişler, geri kazanım çözeltisi olarak asetonitril ile pH:2,5 olan 0,067 M fosforik asit-trietilamin (5:1, v/v) karışımı kullanmışlardır. Geri kazanım yüzdeleri %75-84

aralığındadır. Zenginleştirme işleminin ardından analitleri HPLC-FLD'de tayin etmişlerdir (Yiruhan ve diğer,. 2010).

Chen ve diğer., 2012 yılında yaptıkları çalışmada fleroksazin, norfloksazin, siprofloksazin, gatifloksazin, moksifloksazin ve levofloksazin antibiyotiklerini katı faz ekstraksiyonu sorbenti olarak sigara filtreleri kullanarak zenginleştirmişlerdir. Geri sıyırma çözeltisi olarak % 20 (v/v) amonyak içeren metanol kullanmışlar ve geri alım yüzdelerini %76-112 aralığında elde etmişlerdir. Çevresel su örneklerinde zenginleştirdikleri antibiyotikleri HPLC-UV dedektörü ile analiz etmişlerdir (Chen, Wang ve Huang, 2012).

Alcaráz ve diğer., 2014 yılına ait çalışmalarında, florokinolon grubu antibiyotikleri su örneklerinde tayin etmişler, katı faz ekstraksiyon sorbenti olarak Oasis HLB kartuş (USA) kullanılmış ve geri alımı 250 µL MeOH kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Zenginleştirdikleri antibiyotikleri HPLC kullanarak analiz etmişlerdir (Alcaráz, Siano Pena, Culzoni ve Goicoechea 2014).

1.7 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, süt ve yumurta örneklerinde bulunan bazı florokinolonların yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini öncesi ekstraksiyonları için iyonik sıvı bazlı sorbent geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın aşamaları aşağıda verilmektedir.

1. 1-oktil-3-metil imidazolyum hegzaflorofosfat ($OMIPF_6$) iyonik sıvısının sentezi ve bu iyonik sıvının FTIR ve ^1H NMR ile karakterizasyonu ve termal özelliğinin incelenmesi
2. Sentezlenen iyonik sıvının kitosan ile etkileştirilerek katı faz ekstraksiyonu için sorbent hazırlanması
3. Hazırlanan sorbentin FTIR ve termal özelliklerinin incelenmesi
4. Marbofloksazin (MARBO), enoksazin (ENO), ofloksazin (OFLO), siprofloksazin(CIPRO) ve enrofloksazin (ENRO) antibiyotiklerinin HPLC'de kromatografik davranışlarının incelenmesi

5. Florokinolonların tayin öncesi için zenginleştirilmesi için önerilen katı faz ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu (pH, sorbent miktarı, sıyırma çözeltisi ve hacmi, yükleme ve geri alma akış hızları)
6. Hazırlanan iyonik sıvı bazlı sorbent kullanılarak katı faz ekstraksiyonu ile florokinolonların zenginleştirilmesi
7. Geliştirilen yöntem için analitik parametrelerin belirlenmesi
8. Geliştirilen yöntemin süt ve yumurta örneklerine uygulanması

BÖLÜM İKİ
MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Kimyasallar

İyonik sıvı sentezinde kullanılan 1-iyodooktan, N-metil imidazol, amonyum hegzaflorofosfat ve sorbent sentezinde kullanılan kitosan (yüksek viskositeli) analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich marka temin edilmiştir. Çalışmada analit olarak kullanılan antibiyotikler; marbofloksazin (MARBO), enoksazin (ENO), ofloksazin (OFLO), siprofloksazin (CIPRO) ve enrofloksazin (ENRO) %97-99,7 saflıkta olup Sigma-Aldrich veya Fluka marka satın alınmıştır. HPLC saflıkta asetonitril ve metanol Merck marka temin edilmiştir. Kullanılan diğer reaktif ve çözücüler analitik saflıktadır. Ultra saflıkta saf su, Milli-Q su saflaştırma sistemi (Millipore) ile sağlanmıştır.

2.2 Kullanılan Cihazlar

İyonik sıvı sentezi için Buchi marka Rotary evaporatör, süt ve yumurta örneklerinin hazırlanması için Hettich marka Universal 32 R model soğutmalı santrifüj, sorbentin kurutulması için Labconco marka liyofilizatör kullanılmıştır. Katı faz ekstraksiyon çalışmaları için Watson Marlow 323i model peristaltik pompa ve Varian marka kartuşlar (plastik, 1,0 cm × 10,0 cm, 20 μm polipropilen frit içeren) kullanılmıştır. Tüm pH ölçümleri Selecta marka pH 2001 model pH metre ile yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları Perkin Elmer marka Spectrum 100 model Fourier Transfer İnfrared Spektrometresi (FTIR), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR, Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama Merkezi) Spektrometresi ve Phillips marka XL-30S FEG model taramalı elektron mikroskobu (SEM, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen iyonik sıvı ve sorbentin termal kararlılığı Perkin Elmer marka Diamond model Termal Gravimetrik Analiz/Diferansiyel Termal Analiz (TG/DTG) cihazı ile incelenmiştir. Antibiyotikler Shimadzu LC 20AT model Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı ile analiz edilmiştir. Cihaz seri bağlı diyod dizisi ve floresans dedektör, 20 μl'lik enjeksiyon lopu, kuaterner pompa, vakum degaser ve termostatlı

kolon bölümü içermektedir. Çalışmada kullanılan ultra saf su Millipore Elix 5 model UV saf su cihazından temin edilmiştir.

2.3 Çözeltilerin Hazırlanması

2.3.1 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

pH 3 tampon çözeltisi: 3,40 gram potasyum dihidrojen fosfat 900 mL saf suda çözülerek, üzerine derişik fosforik asit damla damla eklenmiş ve pH 3' e ayarlanmıştır. Daha sonra saf su ile çözeltinin hacmi 1000 mL'ye ile tamamlanmıştır.

pH 7 tampon çözeltisi: 0,1 M 955 mL disodyum fosfat (14,2 g/L) çözeltisine 45 mL 0,1 M HCl eklenerek hazırlanmıştır.

pH 9 tampon çözeltisi çözeltisi: 1,74 gram potasyum dihidrojen fosfat 80 mL saf suda çözülerek, üzerine 1 M KOH damla damla eklenmiş ve pH 9'a ayarlanmıştır. Daha sonra saf su ile çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

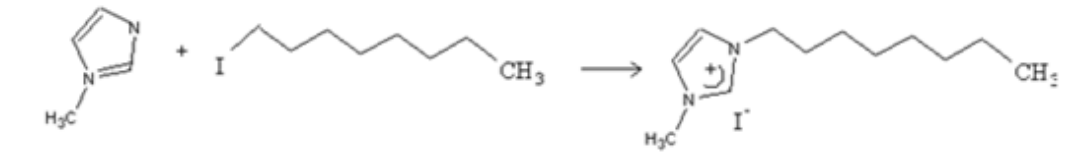
2.3.2 Antibiyotik Çözeltilerin Hazırlanması

Florokinolonların stok standart çözeltileri her bir antibiyotik için 50 µg/mL (metanolde) ve 10 µg/mL (suda) derişimlerinde iki ayda bir hazırlanmıştır. Tüm standart çözeltiler 4 ^{0}C'de saklanmıştır. Çalışma çözeltileri stok çözeltilerin seyreltilmesi ile günlük olarak hazırlanmıştır.

2.4 İyonik Sıvının Sentezi

2.4.1 1-Oktil- 3-Metil İmidazolyum İyodür (OMII) Sentezi

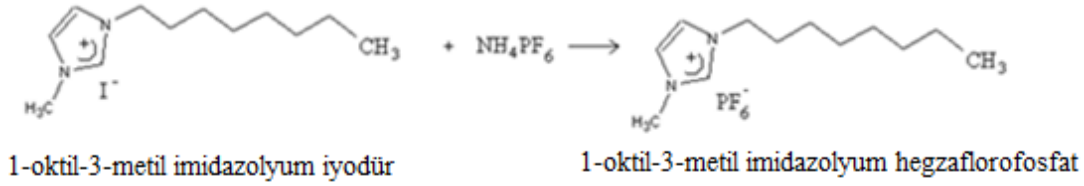
0,04 mol N-metil-imidazol, 0,04 mol oktil iyodür ve 25 mL toluen 50 mL'lik yuvarlak dipli bir balona ilave edilmiş ve karışım iki saat geri soğutucu altında 60-70 ^{0}C'de ısıtılmıştır. Bu sürenin sonunda iki faz oluşmuştur. 1-oktil-3-metil imidazolyum iyodür (OMII) olan alt faz % 95 verimle elde edilmiştir. (Şekil 2.1) (Zafer, Ocakoğlu, Özsoy ve İçli, 2009; Özdemir, Varlıklı, Öner, Ocakoğlu ve İçli, 2010).



Şekil 2.1 1-oktil 3-me1-oktil imidazolyum iyodür sentezi

2.4.2 1-Oktil- 3-Metil İmidazolyum Hegzaflorofosfat ($OMIPF_6$)Sentezi

0,02 mol 1-oktil-3-metil imidazolyum iyodürün 50 mL diklorometan içerisindeki çözeltisine 0,02 mol amonyum hegzaflorofosfat tuzu (NH_4PF_6) ilave edilmiştir. Karışım 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra amonyum iyodür süzülerek alınmış ve sıvı kısımda bulunan diklorometanın evaporatörde uzaklaştırılmasıyla 1-oktil-3-metil imidazolyum hegzaflorofosfat ($OMIPF_6$) % 80 verimle elde edilmiştir (Şekil 2.2) (Zafer, Ocakoğlu, Özsoy ve İçli, 2009; Özdemir, Varlıklı, Öner, Ocakoğlu ve İçli, 2010).



Şekil 2.2 1-oktil- 3-metil imidazolyum hegzaflorofosfat sentezi

2.5 $OMIPF_6$ Bazlı Kitosan Sorbentinin (CH-$OMIPF_6$) Hazırlanması

1 gram kitosan (CH) üzerine, 45 mL saf su pH'ı 1 M HCl ile 3'e ayarlanarak ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 1 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışıma $OMIPF_6$'ın 5 mL diklorometan içerisindeki çözeltisi ilave edilmiş ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda karışım süzülerek saf su ve diklorometan ile yıkanmıştır. ~65 verimle elde edilen iyonik sıvı bazlı kitosan sorbenti liyofilizatörde kurutularak katı faz ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmıştır.

İyonik sıvının kitosana emdirilme aşamasında kitosanın yüzeyi asitlendirildiği için yüzeydeki $–NH_2$ grupları $–NH_3^+$'e dönüştürülmüş ve bu pozitif yükler iyonik sıvının anyon grubuyla etkileşmiştir. Ayrıca iyonik sıvıdaki imidazolyum halkasında

bulunan serbest hidrojenlerin kitosan yüzeyindeki –OH gruplarındaki oksijen atomuyla hidrojen bağı yaptığı söylenebilir (Bharmoria, Singh ve Kumar, 2013).

2.6 Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi

2.6.1 Optimizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmaları için, iyonik sıvı emdirilmiş sorbentten 0,2 gram tartılarak polipropilen frit içeren plastik kartuş içerisine aktarılmıştır. Daha sonra sorbent üzerinden sırasıyla 10 mL metanol/su (2:8), 5 mL saf su ve 10 mL çalışılan pH çözeltisi geçirilmiştir. Bu şartlandırma işleminden sonra kolondan her birinin derişimi 0,1 µg/mL olan 10 mL florokinolon karışımı geçirilmiştir. Kolon 1 mL saf su ile yıkandıktan sonra sorbent üzerine tutunan antibiyotikler 5 mL eluasyon çözeltisi ile geri alınarak HPLC'de analiz edilmiştir.

2.6.2 Süt ve Yumurta Örneklerinin Optimizasyonu

İyonik sıvı emdirilmiş sorbentten 0,2 gram tartılarak polipropilen frit içeren plastik kartuş içerisine aktarılmıştır. 10 mL metanol/su (2:8), 5 mL saf su ve daha sonra 10 mL pH 3 tamponu ile şartlandırılmış kolondan 10 mL pH'ı 3'e ayarlanmış gerçek örnek ekstraktı 1 mL/dak akış hızında geçirilmiştir. Kolon 1 mL saf su ile yıkandıktan sonra kolondan 5 mL eluasyon çözeltisi (%20 NH_3 (v/v, MeOH)) 0,25 mL/dak hızında geçirilmiş ve zenginleştirilen florokinolonlar HPLC'ye doğrudan uygulanmıştır.

2.7 HPLC Koşulları

HPLC analizlerinde MARBO ve ENO için fotodiyot çoklu dedektör (DAD) ve OFLO, CIPRO ve ENRO analizleri için floresans dedektör (FLD) kullanılmıştır. Florokinolonların ayrılması Thermo Acclaim 120 C_{18} (5 µm, partikül boyutlu, 150 mm x 4,6 mm) kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Florokinolonların kromatografik analiz koşulları Tablo 2.1 de verilmiştir. Marazuela ve Moreno-Bondi'nin literatürde önerdiği yöntemlerde yapılan küçük modifikasyonlar sonucu oluşturulan analiz yöntemleri ile florokinolonların kromatografik ayrılmasıyla nitel ve nicel tayinleri yapılmıştır (Ito, Oka, Ikai, Matsumoto ve Miyazaki, 2000; Benito-Pena, Partal-

Rodera, Leon-Gonzalez ve Moreno-Bondi, 2006; Marazuela ve Moreno-Bondi, 2004). Florokinolonlar için izokratik elüsyon uygulanmış olup analiz süresi 13 dakika olarak belirlenmiştir.

Tablo 2.1 Florokinolonların HPLC ile analiz koşulları

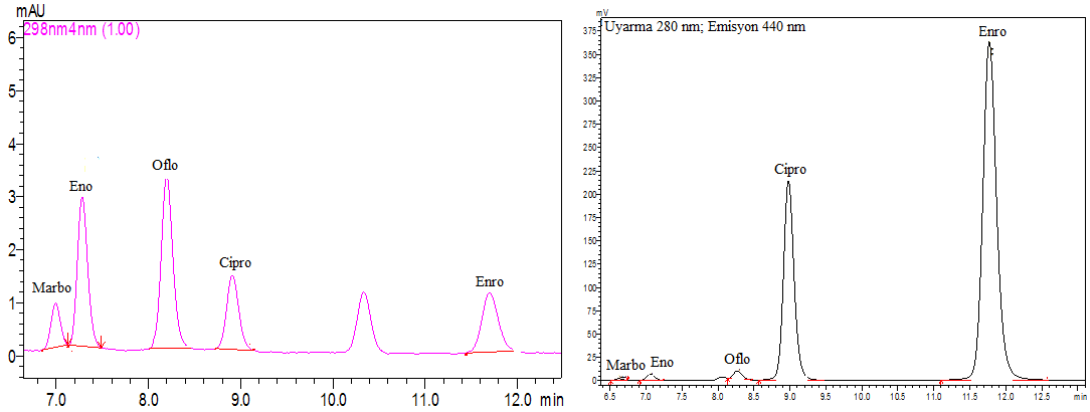
Florokinolon	Kolon	Sıcaklık (^{0}C)	Mobil faz	Akış hızı (dak/mL)	Dalgaboyu (nm)	Dedektör
MARBO	Thermo Acclaim 120 C_{18}	35	H_3PO_4 (25 mM, pH 3) ve asetonitril, izokratik (85:15)	1	298	DAD
ENO					298	DAD
OFLO					280 (uyarma) 440 (emisyon)	FLD
CIPRO						FLD
ENRO						FLD

2.8 Florokinolonlar için Kalibrasyon Eğrileri

Florokinolonların HPLC ile nicel analizleri için farklı derişimlerde standart çözeltiler, eluasyon çözeltileri ile hazırlanarak HPLC'de analiz edilmiş ve her bir florokinolon için kalibrasyon denklemi oluşturulmuştur. Tablo 2.2'de her bir antibiyotik için elde edilen doğrusal derişim aralığı ve alıkonma zamanları, Şekil 2.3'te ise derişimi 100 µg/L olan florokinolonların DAD ve FLD dedektörlerinde alınmış HPLC kromatogramları verilmiştir.

Tablo 2.2 Florokinolonların standart kalibrasyon verileri ve alıkonma zamanları

Florokinolon	Alıkonma zamanı (t_R)	Doğrusal Aralık (µg/L)	Kalibrasyon eşitliği	R^2
MARBO	6,9	5-500	y=0,00345x-0,0461	0,995
ENO	7,1	10-1000	y=0,00156x-0,0215	0,998
OFLO	8,1	5-1000	y=185,9x-950	0,998
CIPRO	8,9	5-1000	y=1440x-2990	0,999
ENRO	11,7	5-500	y=2110x+5680	0,999



Şekil 2.3 MARBO, ENO, OFLO, CIPRO ve ENRO'nun DAD ve FLD dedektörlerinde alınmış HPLC kromatogramı

2.9 Süt ve Yumurta Örneklerinin Analize Hazırlanması

Geliştirilen yöntemin uygulanabilirliğini göstermek için 5 farklı süt ve yumurta örneği ile çalışılmıştır. Örnekler İzmir'deki farklı marketlerden elde edilmiştir. Süt örneklerinde florokinolon tayini için örnek hazırlamada Junsa ve arkadaşlarının önerdiği yöntem modifiye edilmiştir. Yumurta örnekleri ise Peters ve arkadaşlarının literatürde önerdiği yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak analize hazırlanmıştır.

2.9.1 Süt Örneklerinin Analize Hazırlanması

5 mL süt örneğinin içerisine son derişimi 0,2 µg/mL olacak şekilde MARBO ve ENO ve son derişimi 0,1 µg/mL olacak şekilde OFLO, CIPRO ve ENRO standartlarından eklenmiştir. Bir saat vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Yağdan arındırmak için üzerine 5 mL asetonitril eklenerek 1 dakika daha vortekslenmiştir. Daha sonra 10 mL daha asetonitril ilave ederek 10 dakika 4^0C'de 1500 *g*'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant fazı deney tüpüne aktarıldıktan sonra asetonitril ekstraktı azot atmosferi altında uçurulmuştur. Son hacim pH 3 tamponu ile 10 mL'ye tamamlanarak 5 dakika oda sıcaklığında karıştırılmış ve çözelti homojen hale getirilmiştir (Junza, Amatya, Barron ve Barbosa, 2011).

2.9.2 Yumurta Örneklerinin Analize Hazırlanması

Yumurta örneği kırıldıktan sonra sarısı ve beyazı iyice karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışımdan 2 gram alınarak üzerine son derişimi son derişimi 0,2 µg/mL olacak şekilde MARBO ve ENO ve son derişimi 0,1 µg/mL olacak şekilde OFLO, CIPRO ve ENRO standartlarından ekleme yapılmıştır. Karışım 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra 10 mL 6:4 oranında asetonitril/su (v/v) eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Sonrasında 10 dakika 10^0C'de 3600 *g*'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant fazı alınarak (3 mL, pH 7), son hacim pH 3 tamponu ile 10 mL'ye tamamlanarak 5 dakika oda sıcaklığında karıştırılmış ve çözelti homojen hale getirilmiştir (Peters, Bolck, Rutgers, Stolker ve Nielen, 2009).

BÖLÜM ÜÇ
SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

3.1 İyonik Sıvının Karakterizasyonu

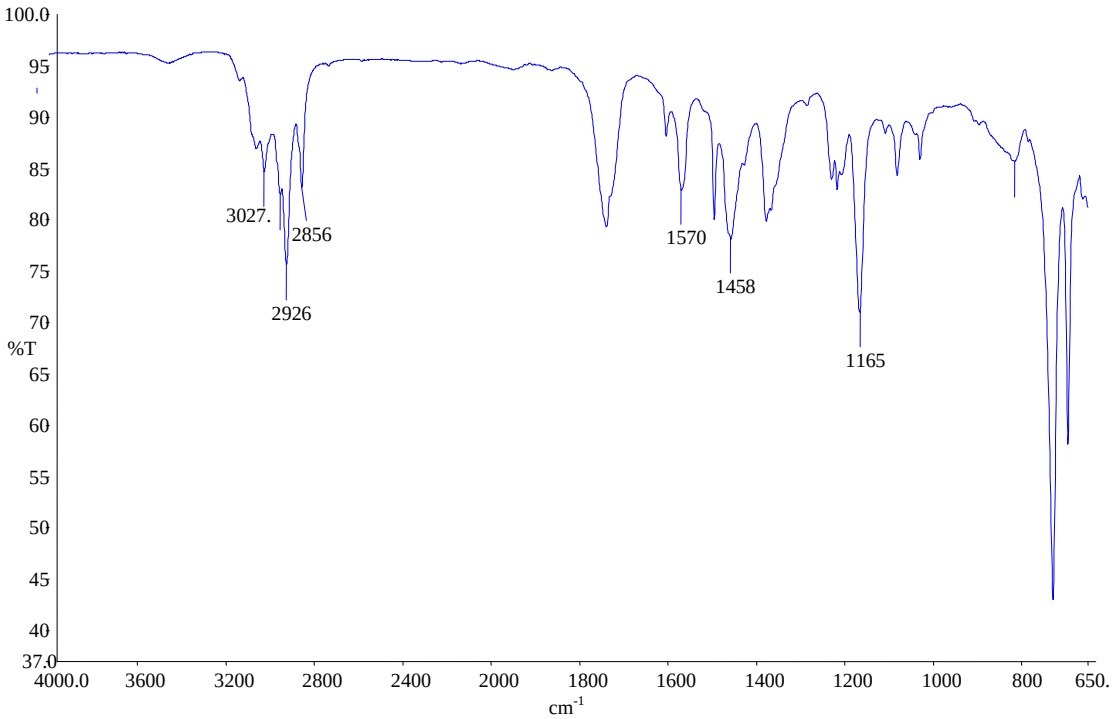
Sentezlenen ara ürün OMII ve sonuç ürün olan $OMIPF_6$ iyonik sıvısının yapıları FTIR ve ^{1}H-NMR spektrumları ile aydınlatılmıştır. Termal kararlılıkları TG/DTG eğrisi ile incelenmiştir.

3.1.1 OMII ve $OMIPF_6$'ın FTIR Spektrumu

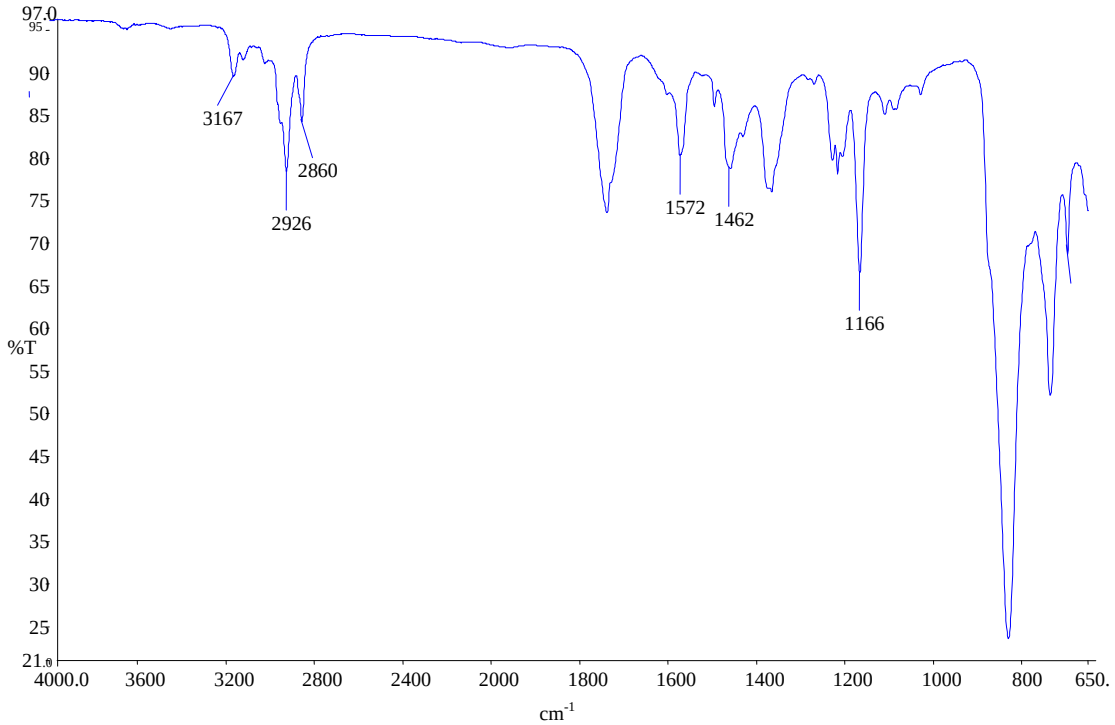
İyonik sıvıların FTIR spektrumu ATR probu ile yaklaşık 0,1 mL örnek kullanılarak alınmıştır. Şekil 3.1 OMII'ün ve Şekil 3.2'de $OMIPF_6$'ın FTIR spektrumları verilmiştir. Her iki iyonik sıvıdaki karakteristik pikler Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Her iki iyonik sıvıdaki titreşim değerlerinin farklı olması OMII'den $OMIPF_6$ iyonik sıvısının sentezlendiğini göstermektedir.

Tablo 3.1 İyonik sıvıların FTIR spektrum verileri

İyonik sıvı	Dalga sayısı cm^{-1}				
	=C-H	-C-H	C=N	C=C	-C-N
OMII	3027	2926-2856	1570	1458	1165
$OMIPF_6$	3167	2926-2860	1572	1462	1166



Şekil 3.1 OMII iyonik sıvısının FTIR spektrumu



Şekil 3.2 $OMIPF_6$ iyonik sıvısının FTIR spektrumu

3.1.2 OMII ve $OMIPF_6$'ın ^{1}H-NMR Spektrumu

Sentezlenen OMII ve $OMIPF_6$ iyonik sıvısının Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama Merkezinde alınan ^{1}H-NMR spektrum verileri aşağıda özetlenmiştir.

OMII için: ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) ppm: 9,81 (s, 1H, NC*H*N), 7,50 (d, 1H, NC*H*CHN), 7,18 (d, 1H, NCHC*H*N), 4,21 (t, 2H, NCH_2CH_2-), 4,01 (s, 3H, -NCH_3), 2,32 (m, 10H,$NCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$),1,28(h,2H,$NCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 0,82 (t, 3H, -$CH_2CH_3$).

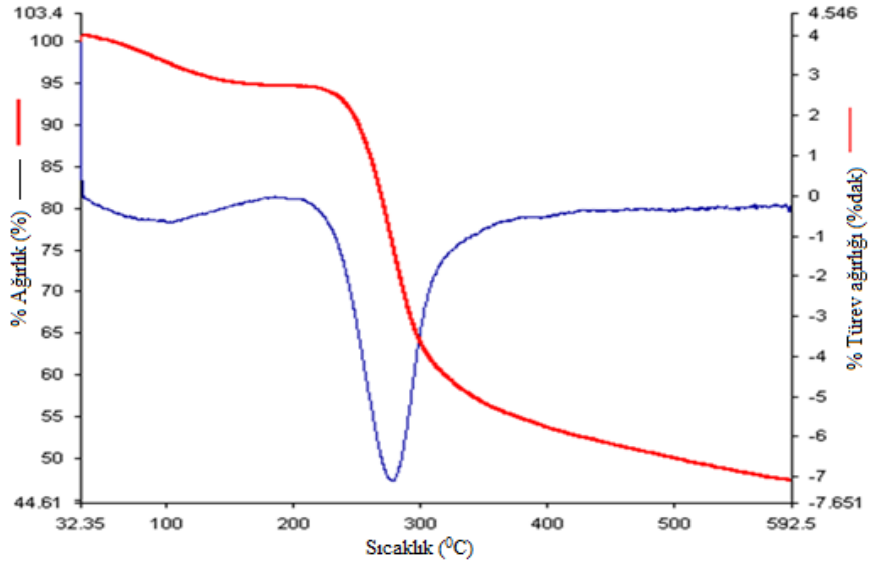
$OMIPF_6$ için: ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) ppm: 8,58 (s, 1H, NC*H*N), 7,38 (d, 1H, NC*H*CHN), 7,20 (d, 1H, NCHC*H*N), 4,18 (t, 2H, NCH_2CH_2-), 3,90 (s, 3H, -NCH_3), 2,38 (m, 10H, $NCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1,30 (h, 2H, $NCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 0,83 (t, 3H, -$CH_2CH_3$).

OMII iyonik sıvısında 4,21 ppm'de gözlenen -NCH_2CH_2- grubundaki koyu renk ile belirtilmiş 2 adet protona ait olan triplet yarılma piki, çıkış maddesi olan oktil iyodürdeki oktil grubunun metil imidazol halkasına bağlandığını göstermektedir.

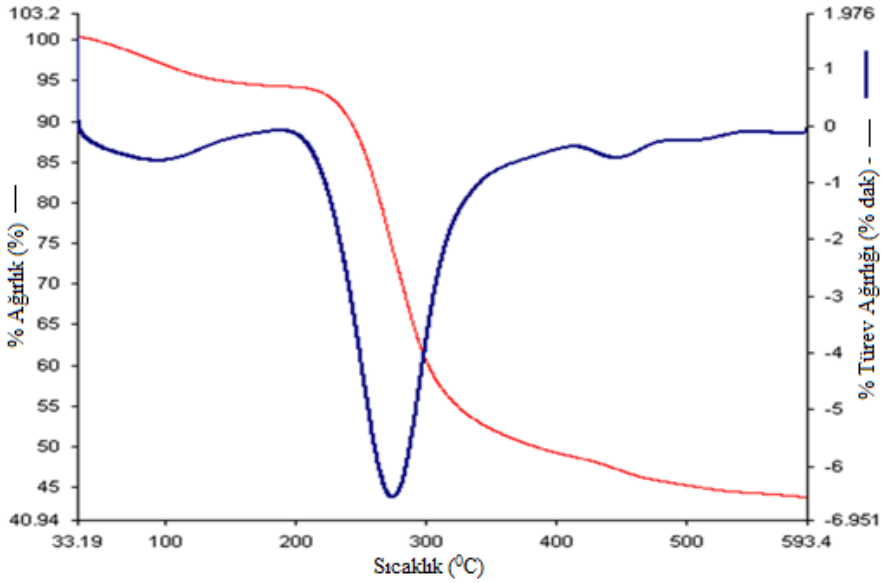
$OMIPF_6$ iyonik sıvısınında ise yapıdaki protonlara ait kimyasal kayma değerlerinin, çıkış maddesi olan OMII iyonik sıvısının protonlarının kimyasal kayma değerlerinden farklı olduğu gözlenmiştir. Bu da maddenin $OMIPF_6$ olarak sentezlendiğini göstermektedir.

3.1.3 OMII ve $OMIPF_6$'ın Termal Analizleri

Sentezlenen iyonik sıvıların termal kararlılıklarının incelenmesi için, örnekler alüminyum kap içerisine alınarak azot atmosferinde 25-600 °C aralığında (sıcaklık artışı 15 °C/dak) analiz edilmiştir. Ara ürün olan OMII iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi Şekil 3.3'te ve sonuç ürün olan $OMIPF_6$ iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi Şekil 3.4'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi ara ürün ve sonuç ürünü iyonik sıvılarının termal bozunmalarının iki kademede gerçekleştiği gözlenmiştir. Kitosana emdirilecek olan sonuç ürün $OMIPF_6$ iyonik sıvısının oda sıcaklığında kararlı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.3 OMII iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi



Şekil 3.4 $OMIPF_6$ iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi

3.2 $OMIPF_6$ Emdirilmiş Kitosan Sorbentinin Karakterizasyonu

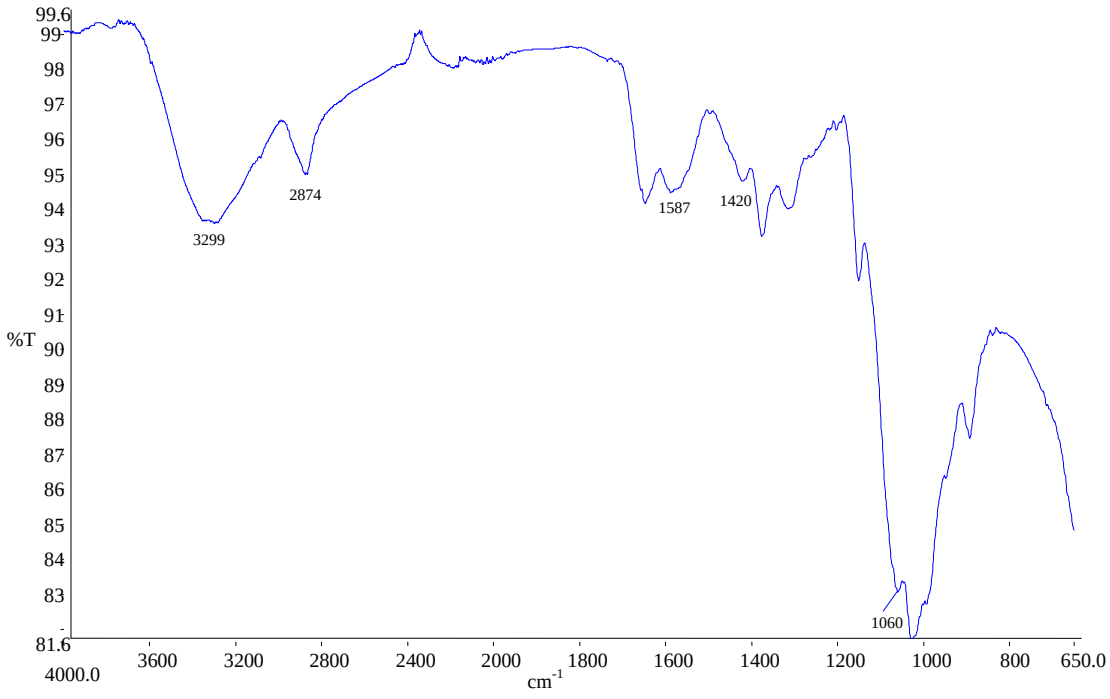
$OMIPF_6$ iyonik sıvısı emdirilerek hazırlanan kitosan sorbentinin (CH-$OMIPF_6$) karakterizasyonu FTIR ve SEM ile gerçekleştirilmiştir. Termal kararlılığı TG/DTG eğrisi ile incelenmiştir.

3.2.1 İyonik Sıvı Bazlı Kitosan Sorbentinin FTIR Spektrumu

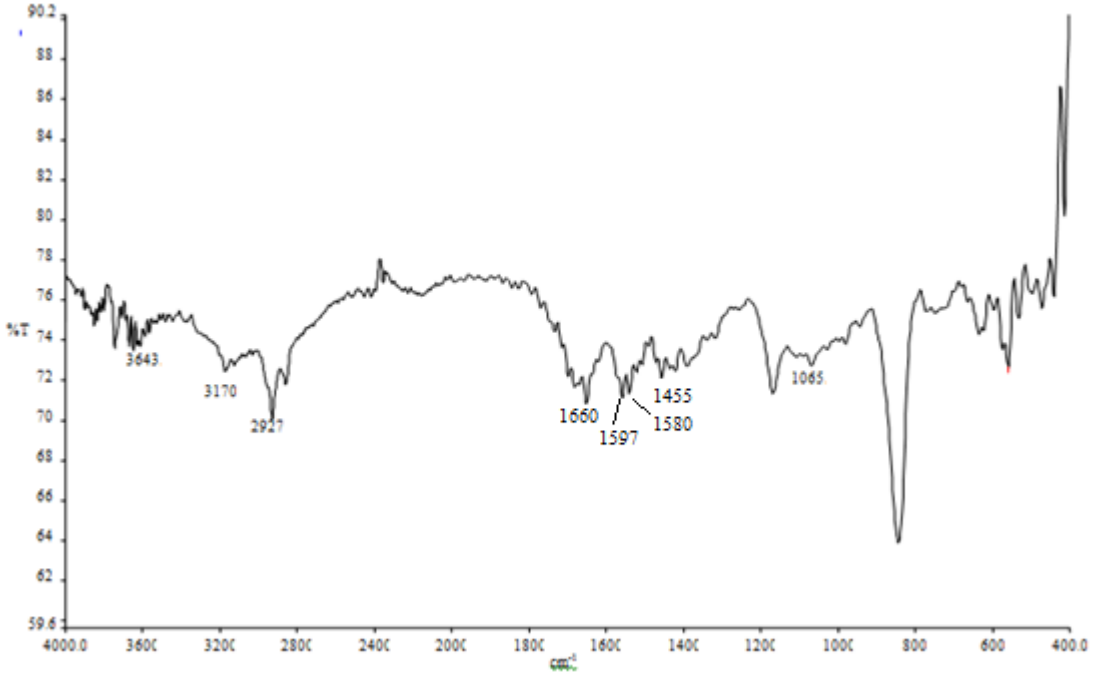
$OMIPF_6$ emdirilmiş kitosan sorbentinin FTIR spektrumu KBr ile pellet hazırlanarak elde edilmiştir ve spektrum kitosanın FTIR spektrumu ile karşılaştırılmıştır. Şekil 3.5'te kitosanın ve Şekil 3.6'da $OMIPF_6$ emdirilmiş kitosanın FTIR spektrumu verilmiştir ve spektrum verileri Tablo 3.2'de özetlenmiştir. İyonik sıvı bazlı kitosanda –OH gerilme pikleri belirgindir. Bu pik kitosanda 3229 cm^{-1} iken iyonik sıvılı bazlı kitosanda 3643 cm^{-1}'e kaymıştır. Ayrıca iyonik sıvıdaki –C=H, C=N ve C=C gerilme piklerinin, iyonik sıvılı bazlı kitosanın spektrumunda var olması kitosanın yüzeyinde iyonik sıvının varlığını göstermektedir.

Tablo 3.2. $OMIPF_6$ bazlı kitosan sorbentinin FTIR spektrum verileri

Sorbent	Dalga sayısı cm^{-1}							
	-OH ve $-NH_2$	=C-H	-C-H	C=N	C=C	C-O	C-N	C-C
CH	3299	-	2874	-	-	1587	1420	1060
CH-$OMIPF_6$	3643	3170	2927	1660	1597	1580	1455	1065



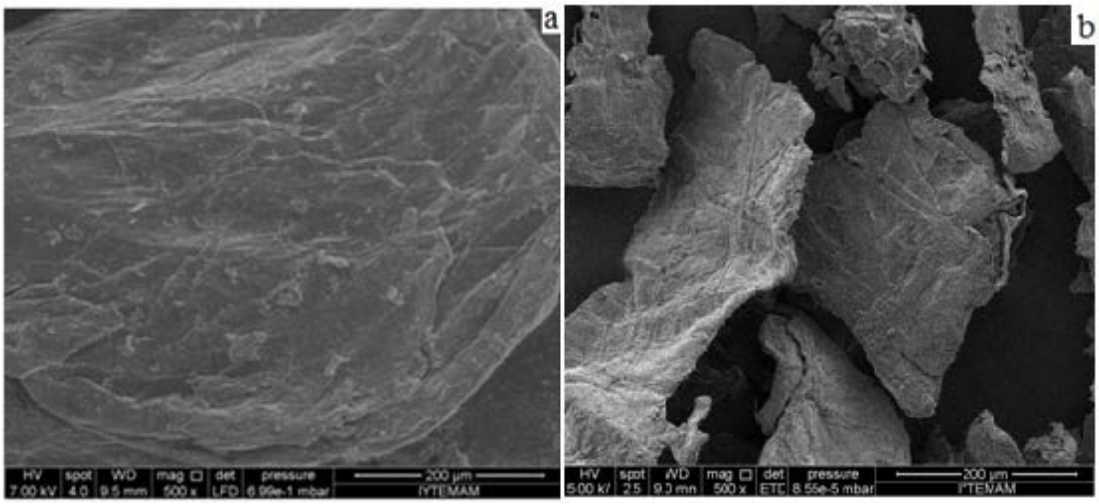
Şekil 3.5 Kitosanın FTIR spektrumu



Şekil 3.6 $OMIPF_6$ emdirilmiş kitosanın FTIR spektrumu

3.2.2 İyonik Sıvı Bazlı Kitosan Sorbentinin SEM Görüntüsü

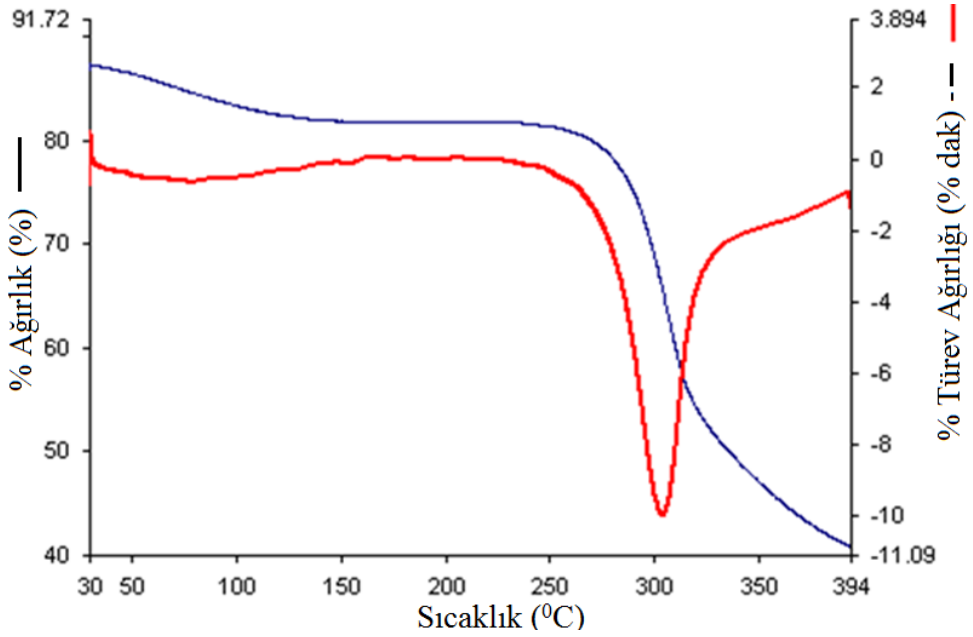
Hazırlanan CH-$OMIPF_6$ sorbentin SEM görüntüsü kitosanın SEM görüntüsü ile karşılaştırılarak yüzey morfolojileri incelenmiştir. Yüzeydeki değişiklikler 100, 500, 1000 ve 2500 büyütmelerde kaydedilmiştir Şekil 3.7'de sadece 500'lük büyütme örnek olarak verilmiştir. Yüzeydeki değişiklik kitosanın yüzeyine iyonik sıvının emdirildiğini göstermektedir.



Şekil 3.7 Kitosanın ve iyonik sıvı emdirilmiş kitosanın SEM görüntüsü (a: Kitosan, b: İyonik $OMIPF_6$ emdirilmiş kitosan)

3.2.3 İyonik Sıvı Bazlı Kitosan Sorbentinin Termal Analiz Sonuçları

$OMIPF_6$ bazlı kitosan sorbentinin termal analizi alüminyum kap kullanılarak azot atmosferinde 25-500 °C aralığında (sıcaklık artışı 15 °C/dak) analiz edilmiştir. İyonik sıvı bazlı kitosan sorbentinin termal bozunmasının iki kademede gerçekleştiği gözlenmiştir. Sorbentin birinci bozunma sıcaklığı 50-78 ^{0}C aralığında, buradaki kayıp ortalama % 5-8 civarında, ikinci bozunma sıcaklığı ise 260-305 ^{0}C aralığında buradaki ortalama kayıp ise % 35-45 civarındadır. Şekil 3.8'de CH-$OMIPF_6$ sorbentinin TG/DTG eğrisi verilmiştir.



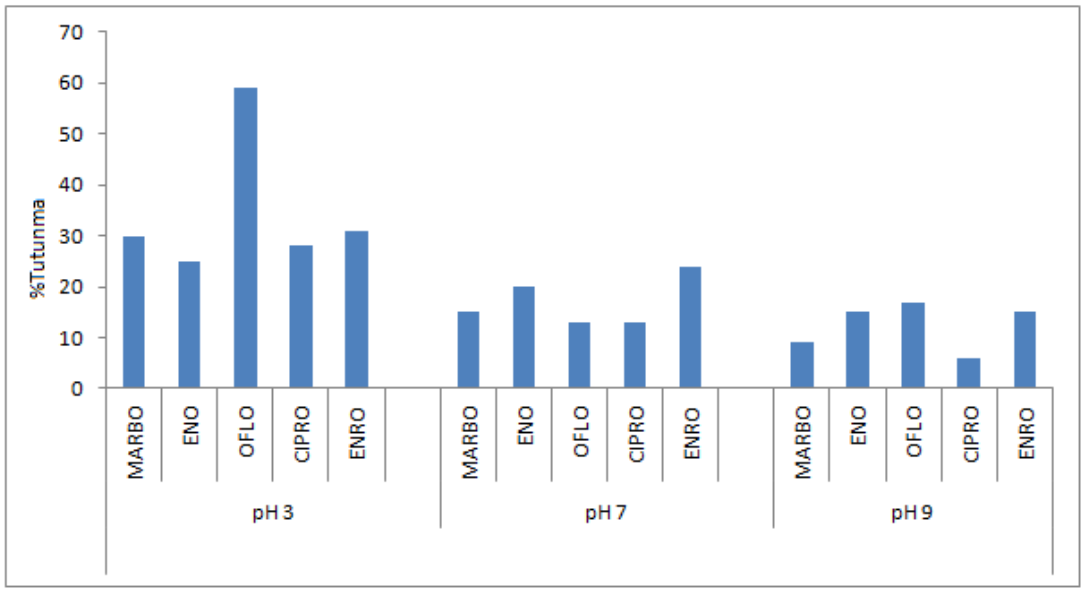
Şekil 3.8 CH-$OMIPF_6$ sorbentinin TG/DTG eğrisi

3.3 Katı Faz Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu

Florokinolonların HPLC ile analizi öncesi matriksten ayrılması ve zenginleştirilmesi için önerilen katı faz ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu gerektiği için pH, sorbent miktarı, sıyırma çözeltisi ve akış hızlarını içeren optimizasyon parametreleri incelenmiştir.

3.3.1 pH Optimizasyonu

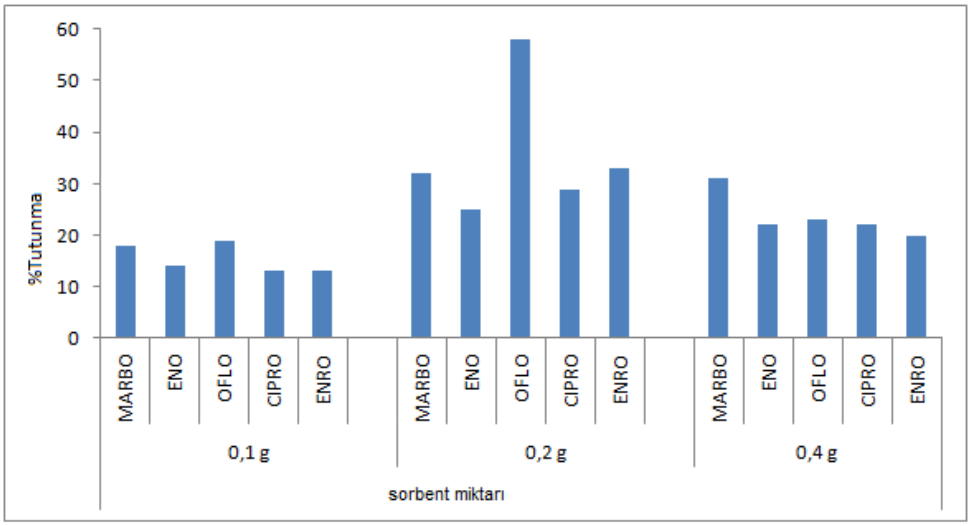
Optimum pH değerini bulmak için florokinolonların pKa değerleri dikkate alınarak pH çalışmaları 3,7 ve 9'da yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.9'da üç paralel çalışmanın ortalaması olarak verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi en iyi tutunma pH 3'de elde edilmiştir. Bu pH değerinde çalışılan florokinolonlar asidik formda bulundukları için sorbent ile olan etkileşimlerinin hidrofobik olduğu söylenebilir. Bu nedenle, daha sonraki çalışmalar pH 3'de gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9 Florokinolonların CH-OMIPF_6 sorbenti üzerinde farklı pH'larda tutunma sonuçları (sorbent miktarı: 0,2 gram, florokinolon derişimi: 0,1µg/mL, akış hızı: 0,5 mL/dak)

3.3.2 Sorbent Miktarı Optimizasyonu

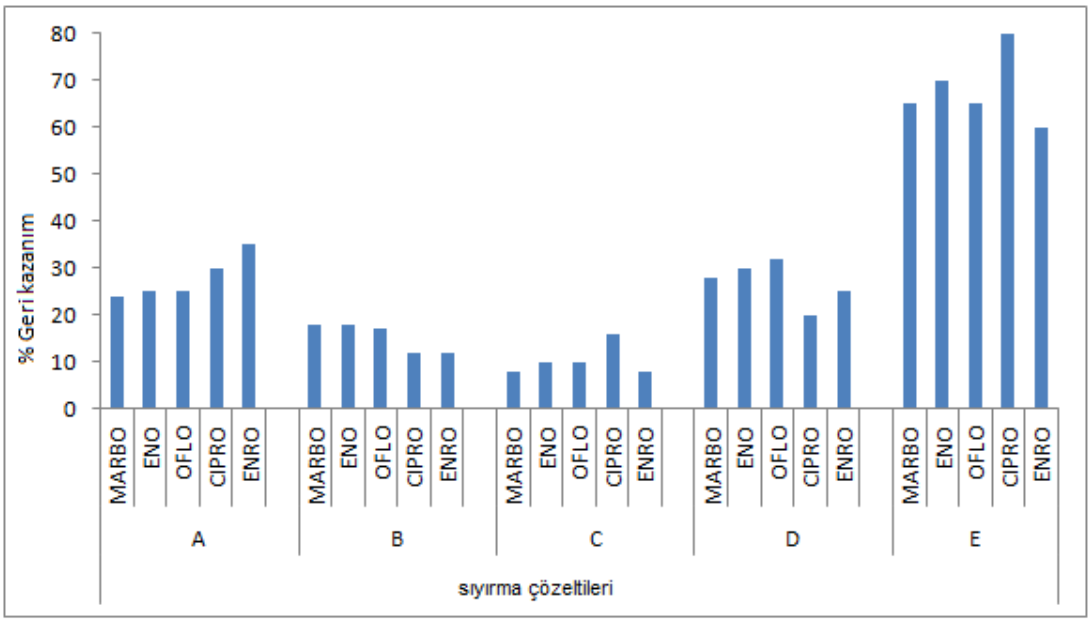
Optimum sorbent miktarını bulmak için 0,1-0,2-0,4 gram CH-OMIPF_6 sorbenti ile tutunma çalışmaları yapılmıştır. Tüm çalışmalar 3 paralel gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.10'da gösterilmiştir. En iyi tutunma miktarı 0,2 gram CH-OMIPF_6 sorbenti ile elde edilmiştir.



Şekil 3.10 Florokinolonların farklı miktarlardaki CH-OMIPF_6 sorbenti üzerinde tutunma sonuçları (pH:3, florokinolon derişimi: 0,1µg/mL, akış hızı: 0,5 mL/dak)

3.3.3 Sıyırma Çözeltisinin ve Hacminin Optimizasyonu

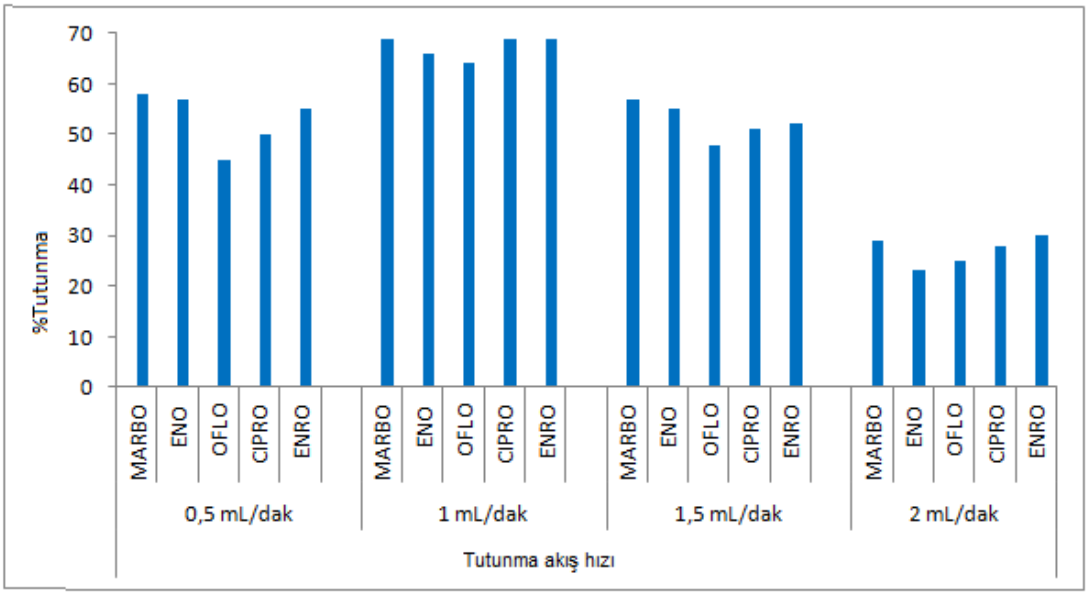
CH-OMIPF_6 sorbenti üzerine tutunan florokinolonları sıyırmak için farklı sıyırma çözeltileri denenmiştir. Sıyırma çalışmalarında 0,2 gram sorbent ile pH 3'de tutunma deneyleri yapıldıktan sonra farklı sıyırma çözeltileri (Şekil 3.11) ile 5 mL'lik sıyırmalar 0,5 mL/dak hızında peristaltik pompa kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıyırma işleminden sonra eluentler 1 mL mobil fazda çözülerek elde edilmiştir. En iyi sıyırma % 20'lik NH_3 (v/v, MeOH) çözeltisi ile % 60-80 aralığında elde edildiği için bu çözelti optimum sıyırma çözeltisi olarak seçilmiştir. Sıyırma hacmini bulmak için 0,2 gram sorbentten 0,1 µg/mL florokinolon karışımı geçirilmiş ve florokinolonlar % 20'lik NH_3 (v/v, MeOH) çözeltisi ile geri alınmıştır. Eluantlar birer mL toplanarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda florokinolonların 5 mL % 20'lik NH_3 (v/v, MeOH) çözeltisi ile geri alındığı gözlenmiştir.



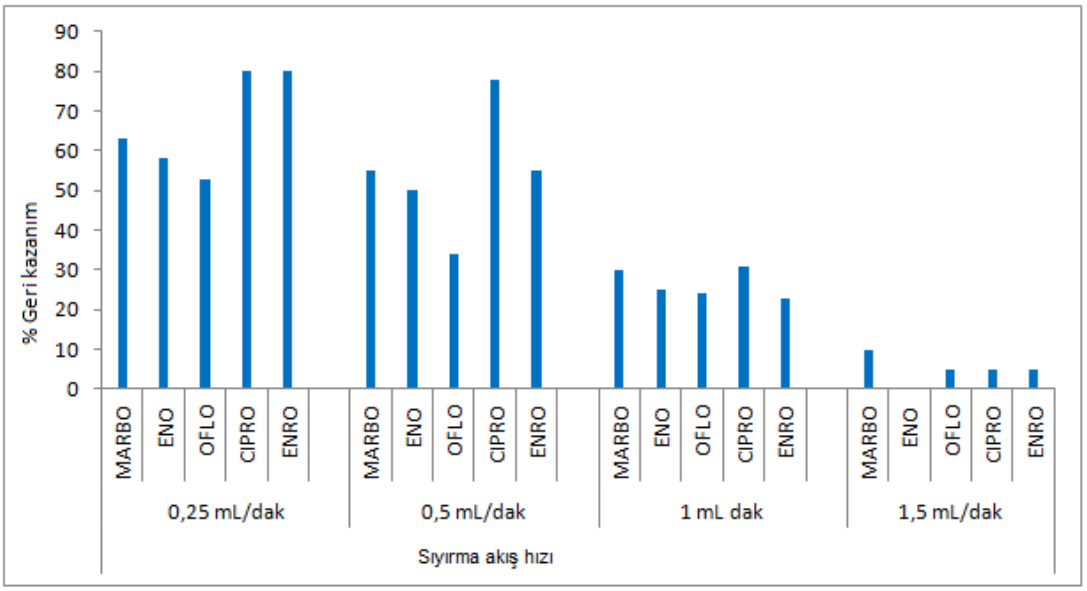
Şekil 3.11 Florokinolonların farklı sıyırma çözeltilerinde % geri kazanım sonuçları. A: MeOH, B: Asetonitril (ACN):MeOH (5:4), C: ACN:MeOH (4:5), D: ACN:MeOH (5:5), E: % 20 NH_3 (v/v, MeOH)

3.3.4 Tutunma ve Sıyırma Akış Hızları Optimizasyonu

Florokinolonların kolonda tutunma ve sıyırma hızlarının kontrolü için, tutunma akış hızları olarak 0,5-1-1,5-2 mL/dak ve sıyırma akış hızı olarak 0,25-0,5-1-1,5 mL/dak çalışılmıştır. Optimum tutunma akış hızı 1 mL/dak (Şekil 3.12) ve optimum sıyırma akış hızı ise 0,25 mL/dak (Şekil 3.13) olarak bulunmuştur.



Şekil 3.12 Florokinolonların farklı akış hızlarında CH-OMIPF_6 sorbenti üzerinde tutunma sonuçları (pH:3, sorbent miktarı: 0,2 gram, florokinolon derişimi: 0,1µg/mL)



Şekil 3.13 Florokinolonları farklı akış hızlarında CH-OMIPF_6 sorbenti üzerinden sıyırma sonuçları (pH:3, sorbent miktarı: 0,2 gram, florokinolon derişimi: 0,1µg/mL, tutunma akış hızı: 0,5 mL/dak)

3.4 Kitosan Sorbenti ile Tutunma

Florokinolonların CH-OMIPF_6 sorbenti ve kitosan sorbenti ile % tutunma miktarını karşılaştırmak için elde edilen optimum şartlarda sadece kitosan sorbenti ile florokinolonların tutunma deneyleri gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.3'te görüldüğü

gibi kitosan sorbenti ile elde edilen sonuçların %10-16 arasında olduğu görülmüştür. Kitosanın yüzeyine $OMIPF_6$ iyonik sıvısının emdirilmesi florokinolonların tutunma miktarını artırmıştır.

Tablo 3.3 Kitosan sorbenti üzerinde florokinolonların tutunma miktarları

Florokinolon	% Tutunma
MARBO	15
ENO	14
OFLO	10
CIPRO	14
ENRO	16

Deneysel şartlar; pH 3; sorbent miktarı 0,2 gram; florokinolon derişimi: 0,1 µg/mL; akış hızı: 1 mL/dak

3.5 Analitik Performans

Florokinolonların CH-$OMIPF_6$ sorbenti kullanılarak katı faz ekstraksiyonu ile deriştirme ve sonrasında HPLC/DAD-FLD yöntemi ile tayini için doğrusal aralık, korelasyon katsayısı, kesinlik ve gözlenebilme sınırı incelenmiştir. Çalışılan her bir kinolon için farklı derişim seviyesinde 7 veya daha fazla noktadan oluşan kalibrasyon doğruları elde edilmiştir.

Yöntemin kesinliği için 0,1 µg/mL derişiminde 3 paralel olarak aynı gün ve farklı günlerde çalışılmıştır. Kesinlik, % bağıl standart sapma cinsinden ifade edilmiştir. Florokinolonlar için gün-içi tekrarlanabilirlik değerleri (%BSS) 1,49-6,27 aralığında, günler-arası tekrarlanabilirlik değerleri (%BSS) ise 2,38-8,05 aralığında elde edilmiştir. Günler-arası tekrarlanabilirlik Avrupa Komisyonunca belirlenen sınır değer %23'den daha az olarak elde edilmiştir (Avrupa Konseyi, 2002).

Gözlenebilme sınırı (LOD), yöntemin kalibrasyon eşitliğindeki en küçük derişim olan 0,01 µg/mL derişimindeki florokinolonun 10 paralel okutulması sonucu elde edilen yanıtın standart sapması (SD) ve kalibrasyon doğrusunun eğimine (S) dayanarak elde edilmiştir. Hesaplama için 3(SD/S) formülü kullanılmıştır. Yöntemin analitik performansına yönelik elde edilen tüm sonuçlar Tablo 3.4'te verilmiştir.

3.6 Süt ve Yumurta Örnekleri

İzmir'de yerel marketlerden satın alınan 5 farklı süt ve yumurta örneği optimize edilen yönteme göre tayin edilmiştir. Analiz sonuçları Tablo 3.5'te verilmiştir. Yöntemin geri kazanımı için 0,2 µg/mL (MARBO ve ENO) ve 0,1 µg/mL (OFLO, CIPRO ve ENRO) standart florokinolon çalışılan süt ve yumurta örneklerine eklenmiştir. Geri kazanımlar her iki tür örnek için %70 ile %100 arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.6). Elde edilen geri kazanım yüzdeleri önerilen yöntemin süt ve yumurta örneklerine uygulanabilirliğini göstermektedir.

Tablo 3.4 Florokinolonlar için elde edilen analitik parametreler

Florokinolon	Doğrusal Aralık (µg/L)	Kalibrasyon eşitliği	R^2	LOD (µg/L)	%BSS gün-içi	%BSS günler-arası
MARBO	10-500	y=0,00552x-0,0322	0,999	4,23	2,97	6,78
ENO	10-500	y=0,00126x-0,0097	0,997	1,09	1,49	5,12
OFLO	10-500	y=2840x-55170	0,996	$3,23x10^{-3}$	6,27	5,12
CIPRO	10-500	y=20240x-399000	0,997	$8,39x10^{-3}$	3,76	2,38
ENRO	10-500	y=123000x-615000	0,996	$19,50x10^{-3}$	2,41	8,05

Tablo 3.5 Süt örneklerinde florokinolonların analiz sonuçları

No		MARBO		ENO			OFLO		CIPRO		ENRO	
	Ekl. (µg/mL)	Bulunan (µg/mL) ($\bar{x}$ ±s)	Geri kazanım (%) ($\bar{x}$ ±s)	Bulunan (µg/mL) ($\bar{x}$ ±s)	Geri kazanım (%) ($\bar{x}$ ±s)	Ekl. (µg/mL)	Bulunan (µg/mL) ($\bar{x}$ ±s)	Geri kazanım (%) ($\bar{x}$ ±s)	Bulunan (µg/mL) ($\bar{x}$ ±s)	Geri kazanım (%) ($\bar{x}$ ±s)	Bulunan (µg/mL) ($\bar{x}$ ±s)	Geri kazanım (%) ($\bar{x}$ ±s)
1	-	-		-		-	-		-		-	
	0,20	$0,18_2$±0,02	91±1	0,16±0,02	80±2	0,10	0,08±0,01	80±2	0,09±0,01	90±4	0,08±0,01	80±2
2	-	-		-		-	-		-		0,03±0,01	
	0,20	0,16±0,02	80±2	0,14±0,02	70±1	0,10	0,09±0,01	90±4	$0,08_4$±0,01	84±1	$0,12_4$±$0,02_3$	95±2
3	-	-		-		-	-		-		-	
	0,20	$0,17_3$±0,02	86±2	0,16±0,02	80±2	0,10	0,09±0,01	90±5	$0,08_4$±0,02	84±1	0,10±0,02	100±5
4	-	-		-		-	$0,02_5$±$0,01_2$		0,02±$0,00_4$		0,02±0,01	
	0,20	$0,18_3$±0,02	92±1	0,16±0,02	80±2	0,10	$0,11_8$±$0,02_2$	92±3	0,11±0,02	92±4	0,11±0,02	92±3
5	-	-		-		-	-		-		-	
	0,20	0,16±0,02	80±2	0,18±0,02	90±4	0,10	$0,09_2$±0,01	92±1	0,08±0,02	80±2	$0,08_8$±0,01	88±1

Tablo 3.6 Yumurta örneklerinde florokinolonların analiz sonuçları

No		MARBO		ENO			OFLO		CIPRO		ENRO	
	Ekl. (µg/mL)	Bulunan (µg/mL) ($\overline{x}$ ±s)	Geri kazanım (%) ($\overline{x}$ ±s)	Bulunan (µg/mL) ($\overline{x}$ ±s)	Geri kazanım (%) ($\overline{x}$ ±s)	Ekl. (µg/mL)	Bulunan (µg/mL) ($\overline{x}$ ±s)	Geri kazanım (%) ($\overline{x}$ ±s)	Bulunan (µg/mL) ($\overline{x}$ ±s)	Geri kazanım (%) ($\overline{x}$ ±s)	Bulunan (µg/mL) ($\overline{x}$ ±s)	Geri kazanım (%) ($\overline{x}$ ±s)
1	-	-		-		-	-		-		-	
	0,20	0,17±0,02	85±3	0,16±0,02	80±2	0,10	$0,08_5$±0,01	85±1	0,08±0,01	80±2	$0,09_3$±0,01	93±1
2	-	-		-		-	-		-		-	
	0,20	0,17±0,02	85±2	0,17±0,02	85±2	0,10	0,08±0,01	80±2	0,08±0,01	80±2	$0,08_8$±0,01	88±1
3	-	-		-		-	-		-		-	
	0,20	0,16±0,02	80±1	0,16±0,02	80±2	0,10	0,08±0,01	80±2	0,09±0,01	90±1	0,09±0,02	90±4
4	-	-		-		-	-		-		-	
	0,20	0,165±0,02	82±2	0,15±0,02	75±1	0,10	0,09±0,01	90±4	$0,09_1$±0,01	91±1	$0,08_5$±0,01	85±1
5	-	-		0,02±0,01		-	-		-		-	
	0,20	0,17±0,02	85±2	0,21±0,03	95±3	0,10	0,09±0,01	90±4	0,09±0,01	90±3	0,08±0,01	80±2

3.7 Değerlendirme

Çalışmada bazı florokinolonların HPLC ile tayinleri öncesi katı faz ekstraksiyon yöntemi ile zenginleştirilmesi için sorbent geliştirilmiş, elde edilen sorbentle yöntem optimize edilmiş ve geliştirilen yöntem süt ve yumurta örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Bu amaçla çalışmada öncelikle 1-oktil-3-metil imidazolyum hegzaflorofosfat iyonik sıvısı sentezlenmiş ve yapısı spektroskopik ve termal olarak incelenmiştir. Elde edilen iyonik sıvı kitosan sorbentine emdirilerek katı faz ekstraksiyonu için sorbent geliştirilmiş ve bu iyonik sıvı bazlı sorbentin yapısı spektroskopik ve termal olarak incelenmiştir.

Çalışmada marbofloksazin (MARBO), enoksazin (ENO), ofloksazin (OFLO), siprofloksazin(CIPRO) ve enrofloksazin (ENRO) olmak üzere 5 tane florokinolon grubu antibiyotiğin HPLC'de ayrılması ve nicel analizleri için kromatografik şartlar belirlenmiştir.

Florokinolonların tayin öncesi zenginleştirilmeleri için hazırlanan iyonik sıvı bazlı sorbent kullanılarak pH, sorbent miktarı, sıyırma çözeltisi ve hacmi ve kolona yükleme ve kolondan geri alma akış hızları optimize edilmiştir. Florokinolonlar için elde edilen optimum şartlar: pH 3, sorbent miktarı 0,2 gram, sıyırma çözeltisi: % 20 NH_3 (v/v, MeOH) çözeltisi, sıyırma hacmi: 5 mL, tutunma akış hızı: 1 mL/dak ve sıyırma akış hızı: 0,25 mL/dak olacak şekilde bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirliği gibi analitik parametreleri belirlenmiştir. Çalışma aralığı gıdalarda antibiyotik kalıntı sınırı değerini ölçebilecek değerler arasında elde edilmiştir. Yöntem süt ve yumurta örneklerinde florokinolon tayinine başarı ile uygulanmıştır. Yöntemin doğruluğu belli derişimde florokinolon standardının örneklere eklenmesi ve geri kazanım değerlerinin %70-100 aralığında elde edilmesiyle gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

Alcaráz, M.R., Siano, G.G., Culzoni, M.J., de la Pena, A.M. ve Goicoechea, H.C., (2014). Modeling four and three-way fast high-performance liquid chromatography with fluorescence detection data for quantitation of fluoroquinolones in water samples, *Analytica Chimica Acta, 809,* 37–46

Alvin, F. (2010). *Antibiotics that affect the cell envelope*, 10 Ocak 2014, http://pathmicro.med.sc.edu/fox/antibiotics1.htm.

Aminov, R.I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future, *Frontiers in Microbiology, 1*, 134.

Anderson, J.L., Armstrong, D.W. ve Wei, G.T. (2006). Ionic liquids in Analytical Chemistry, *Analytical Chemistry, 78*, 2892-902.

Arnold, D.R., Granvil, C.P., Ward, K.W. ve Proksch, J.W. (2008). Quantitative determination of besifloxacin, a novel fluoroquinolone antimicrobial agent, in human tears by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B, 867*, 105-110.

Avrupa Konseyi (2003). Council Regulation No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September on additives for use in animal nutrition, *Official Journal of European Union*, L268, 29.

Avrupa Konseyi Komisyonu, Düzenleme No 2002/657/EC, (2002). Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of European Communities*, L 221/ 8-L221/36.

Bbosa, G.S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D.B. ve Ntale, M. (2014). Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance, *Health, 6*, 410-425.

Benito-Pena, E., Partal-Rodera, A.I., Leon-Gonzalez, M.E. ve Moreno-Bondi, M.C. (2006). Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection, *Analytica Chimica Acta, 556*, 415–422.

Benito-Peña, E., Urraca, J.L., Sellergren, B. ve Moreno-Bondi, M.C. (2008). Solid-phase extraction of fluoroquinolones from aqueous samples using a water-compatible stochiometrically imprinted polymer, *Journal of Chromatography A, 1208*, 62–70.

Bharmoria, P., Singh, T. ve Kumar, A., (2013). Complexation of chitosan with surfactant like ionic liquids: Molecular interactions and preparation of chitosan nanoparticules, *Journal of Colloid and Interface Science, 407*, 361-369.

Bilim ve Teknik Web Sitesi Canlılar Dünyası Antibiyotikler, (b.t.). 07 Aralık 2013, http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/monera/antibiyotik.htm

Bouvier, E. S. P., Martin, D. M., Iraneta, P. C., Capparella, M., Cheng, Y.-F. ve Phillips, D.J. (1997). A novel polymeric reversed-phase sorbent for solid-phase extraction, *LC-GC-Magazine of Separation Science, 152(2)*, 152-158.

Chafer-Pericas, C., Maquieira, A. ve Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic resiudes in food samples, *Trends in Analytical Chemistry, 29*, 1038-49.

Chen, B., Wang, W. ve Huang, Y. (2012). Cigarette filters as adsorbents of solid-phase extraction for determinationof fluoroquinolone antibiotics in environmental water samples coupled with high-performance liquid chromatography, *Talanta, 88*, 237-243.

Chitosan Wikipedia The Free Encyclopedia, (b.t.). 13 Ocak 2014, http://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan.

Choi, J.H., Mamun, M.I.R., Abd El-Aty, A.M., Kim, K.T., Koh, H.B., Shin, H.C. ve diğer., (2009). Inert matrix and Na4EDTA improve the supercritical fluid

extraction efficiency of fluoroquinolones for HPLC determination in pig tissues, *Talanta, 78*, 348-357.

Christodoulou, E.A., Samanidou, V.F. ve Papadoyannis, I.N. (2007). Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk, *Journal of Chromatography B, 859*, 246–255.

Chung, H.H., Lee, J.B., Chung, Y.H. ve Lee, K.G. (2009). Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, *113*, 297–301.

Cinquina, A.L, Roberti, P, Giannetti, L, Longo, F, Draisci, R, Fagiolo, A. ve Brizioli, R. (2003). Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection: Optimization and validation, *Journal of Chromatography A*, *987*, 221–226.

Cordle, M.K. (1988). USDA regulation of residues in meat and poultry products, *Journal of Animal Science, 66*, 413-33.

Dhillon, V. ve Chaudhary, A.K. (2010). A validated HPTLC method for estimation of moxifloxacin hydrochloride in tablets, *Pharmaceutical Methods, 1*, 54-56.

Fontanals, N., Borrull, F. ve Marce, R.M. (2012). Ionic liquids in solid-phase extraction, *Trends in Analytical Chemistry, 41*, 15-26.

Fu, X., Liu, H., Liu, Y. ve Liu, Y. (2013). Application of Chitosan and Its Derivatives in Analytical Chemistry: A Mini-Review, *Journal of Carbohydrate Chemistry, 32*, 463-474.

Gangula, S., Suen, S.Y. ve Conte, E.D. (2010). Analytical applications of admicelle and hemimicelle solid phase extraction of organic analytes, *Microchemical Journal, 95*, 2–4.

Garcia, M.A., Solansa, C., Aramayona, J.J., Rueda, S. ve Bregante, M.A. (1999). Determination of marbofloxacin in plasma samples by high-performance liquid

chromatography using fluorescence detection, *Journal of Chromatography B, 729*, 157–161.

Gene, M. (2010). *Antibiotics*. 10 Ocak 2014 http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/antibiot.htm.

Gustafson, R.H. ve Bowen, R.E. (1997). Antibiotic use in animal agriculture, *Journal of Applied Microbiology, 83*, 531-41.

He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K. ve Liu, F. (2007). Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70*, 133–150.

Herna´ndez-Arteseros, J.A., Barbosa, J., Compan˜o´, R. ve Prat, M.D. (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products, *Journal of Chromatography A, 945*, 1–24.

Herrera-Herrera, A.V., Hernández-Borges, J. ve Rodríguez-Delgado, M.Á. (2009). Fluoroquinolone antibiotic determination in bovine, ovine and caprine milk using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection with ionic liquids as mobile phase additives, *Journal of Chromatography A, 1216*, 7281-7287.

Herrera-Herrera, A.V., Hernández-Borges, J., Borges-Miquel, T.M. ve Rodríguez-Delgado, M.Á. (2013). Dispersive liquid–liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 75*, 130-137.

Hormazabal, V., Steffenak, I. ve Yndestad, M. (1993). Simultaneous determination of residues of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in fish tissues by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography: Biomedical Applied, 616*, 161–165.

Ito, Y., Oka, H., Ikai, Y., Matsumoto, H. ve Miyazaki, Y. (2000). Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. Simultaneous determination of

sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A, 898*, 95-102.

Junza, A., Amatya, R., Barron, D. ve Barbosa, J. (2011). Comparative study of the LC-MS/MS and UPLC-MS/MS for the multi-residue analysis of quinolones, penicillins and cephalosporins in cow milk, and validation according to the regulation 2002/657/EC, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, *879*, 2601-10.

Khan, M., Reddy, C.N.K.R., Ravindra, G., Reddy, K.V.S.R.K. ve Dubey, P.K. (2012). Development and validation of a stability indicating HPLC method for simultaneous determination of four novel fluoroquinolone dimers as potential antibacterial agents, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *59*, 162-166.

Kishida, K. (2007). Restricted-access media liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their N4-acetyl metabolites in eggs, *Food Chemistry, 101*, 281–285.

Kurie, M. ve Hiroyuki, K. (2006). Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, *562*, 16-22.

Lian, W., Huang, J., Yu, J., Zhang, X., Lin, Q., He, X. ve diğer., (2012). A molecularly imprinted sensor based on b-cyclodextrin incorporated multiwalled carbon nanotube and gold nanoparticles-polyamide amine dendrimer nanocomposites combining with water-soluble chitosan derivative for the detection of chlortetracycline, *Food Control*, *26*, 620-627.

Maraschiello, C., Cusido´, E., Abella´n, M. ve Vilageliu, J. (2001). Validation of an analytical procedure for the determination of the fluoroquinolone ofloxacin in chicken tissues, *Journal of Chromatography B, 754*, 311–318.

Marazuela, M.D. ve Moreno-Bondi, M.C. (2004). Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection, *Journal of Chromatography A, 1034*, 25–32.

Mitaki, K., ve Kataoka, H., (2006). Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta,592*, 16–22.

Moema, D., Nindi, M.M. ve Dube, S. (2012). Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for thedetermination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, *730*, 80-86.

Nakata, H., Kurunthachalam, K., Jones, P.D. ve Giesy, J.P. (2005). Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography–mass spectrometry and fluorescence detection, *Chemosphere*, *58*, 759–766.

Özdemir, S., Varlıklı, C., Öner, İ., Ocakoğlu, K. ve İçli, S. (2010). The synthesis of 1,8-naphthalimide groups containing imidazolium salts/ionic liquids using I-, PF6-, TFSI- anions and their photophysical, electrochemical and thermal properties, *Dyes and Pigments*, *86*, 206-216.

Peters, R.J.B., Bolck, Y.J.C., Rutgers, P., Stolker, A.A.M. ve Nielen, M.W.F. (2009). Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, *1216*, 8206-8216.

Ramirez, A., Gutierrez, R., Díaz, G., Gonzalez, C., Perez, N. A., Vega, S. ve diğer., (2003). High-performance thin-layer chromatography–bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, *784*, 315–322.

Samanidou, V.F., Christodoulou, E.A. ve Papadoyannis, I.N. (2005). Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid

chromatography after solid phase extraction, *Journal of Seperation Science, 28,* 555–565.

Sharma, S., Sharma, M.C. ve Sahu, N.K. (2012). Simultaneous determination of Nitazoxanide and Ofloxacin in pharmaceutical preparations using UV-spectrophotometric and high performance thin layer chromatography methods, *Arabian Journal of Chemistry*, In Press, Corrected Proof,

Shen, J.Y., Kim, M.R., Lee, C.J., Kim, I.S., Lee, K.B. ve Shim, J.H. (2004). Supercritical fluid extraction of the fluoroquinolones norfloxacin and ofloxacin from orally treated-chicken breast muscles *Analytica Chimica Acta, 513,* 451-455.

Stoilova, N.A., Surleva, A.R. ve Stoev, G.(2013). Simultaneous Determination of Nine Quinolones in Food by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *Food Analytical Methods, 6*, 803–813.

Takatsuki, K., Ozhizawa, I. ve Shoji, T. (1987). Gas-chromatographic mass-spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single ion monitoring, *Journal of Chromatography A, 391*, 207-17.

Thurman, E.M. ve Mills, M.S. (1998). *Solid phase extraction principles and practice*. Amerika: John Wiley & Sons.

Wang, J., MacNeil, J.D. ve Kay, J.F. (2012). *Chemical analysis of antibiotic residues in Food* (1. Baskı). Amerika: John Wiley & Sons.

Wegener, H.C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development, *Current Opinion in Microbiology, 6*, 439-45.

Yashin, Y.I. ve Yashin, A.Y. (2012). 10. Bölüm. Y. Pico, (Ed.), *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* (1. Baskı) (285-304). Amerika: Elseiver Inc.

Yiruhan, Wang, Q.J., Mo, C.H., Li, Y.W., Gao, P., Tai, Y.P. ve diğer. (2010). Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao, *Environmental Pollution, 158*, 2350–2358.

Zafer, C., Ocakoğlu, K., Özsoy, C. ve İçli, S., (2009). Dicationic bis-imidazolium molten salts for efficient dye sensitized solar cells: Synthesis and photovoltaic properties, *Electrochimica Acta, 54*, 5709-5714.