DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TETRASİKLİNLERİN KROMATOGRAFİK TAYİN ÖNCESİ ZENGİNLEŞTİRİLMESİ İÇİN EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Melis KAYNAKER

Ağustos, 2015
İZMİR

TETRASİKLİNLERİN KROMATOGRAFİK TAYİN ÖNCESİ ZENGİNLEŞTİRİLMESİ İÇİN EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Melis KAYNAKER

Ağustos, 2015

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

MELİS KAYNAKER, tarafından **PROF. DR. MELEK MERDİVAN** yönetiminde hazırlanan "**TETRASİKLİNLERİN KROMATOGRAFİK TAYİN ÖNCESİ ZENGİNLEŞTİRİLMESİ İÇİN EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Melek Merdivan

Yönetici

Doç.Dr. Müşerref ARDA

Jüri üyesi

Doç. Dr. Serap Saydan Bozkurt

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ayşe OKUR

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve tez çalışmam boyunca bilgi birikimini, değerli görüş ve tavsiyelerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Melek MERDİVAN' a ilgi ve desteği için sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yardımlarını esirgemeyen ve tez çalışmam boyunca her zaman olumlu katkıları ile destek olan; Sayın Doç. Dr. Serap SEYHAN' a

Tez çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Dr. Hayriye Mine ANTEP' e

Yüksek lisans sırasında 2014.KB.FEN.028 Nolu proje ile tez çalışmalarını destekleyen Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne

Bugüne kadar maddi manevi hep yanımda olan aileme ve her zaman yanımda hissettiğim sevgili arkadaşlarıma

Sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Melis KAYNAKER

TETRASİKLİNLERİN KROMATOGRAFİK TAYİN ÖNCESİ ZENGİNLEŞTİRİLMESİ İÇİN EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

ÖZ

Hayvansal gıdalardaki tetrasiklin kalıntılarını analiz etmek için birçok yöntem kullanılmıştır. Bu çalışmada, süt, bal ve yumurtadaki kalıntı tetrasiklin antibiyotiklerini yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini öncesi önderiştirme için iki farklı dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. İlk yöntemde, geleneksel iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu yöntemi geliştirilmiştir. İyonik sıvı olarak, 1-*hegzil*-3-metilimidazolyum bis[(triflorometil)sülfonil]imid kullanılmıştır. Ekstraksiyon verimliliğini arttırmak için pH, tuz etkisi, ekstraksiyon çözücüsü hacmi, dispersif çözücü türü, dispersif çözücü miktarı, ekstraksiyon süresi ve santrifüj süresi optimize edilmiştir. Belirlenen optimizasyon koşullarında, çalışılan altı tetrasiklin antibiyotiklerinin (minosiklin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, metasiklin, doksisiklin) zenginleşme faktörü 15-105 arasında bulunmuştur. Gerçek örneklerde tetrasiklin kalıntılarına rastlanmamıştır. Yöntemin doğruluğu için, 100-250 μg L^{-1} derişimlerde standart tetrasiklin çözeltilerinden süt, bal ve yumurta örneklerine eklenmiş ve % 50-95 arasında geri kazanım elde edilmiştir.

İkinci yöntemde ise, dört tetrasiklin antibiyotiklerin kromatografik tayin öncesi zenginleştirilmeleri için yerinde (in-sitü) iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu yöntemi geliştirilmiştir. İyonik sıvı olarak, *benzil*-metilimizadazolyum klorür kullanılmıştır. Ekstraksiyon verimliliğini arttırmak için optimizasyon parametreleri (amonyum hegzaflorofosfat tuz çözeltisinin hacimi, denge süresi, santrifüj süresi, iyonik sıvı/tuz hacim oranları) incelenmiştir. Belirlenen optimizasyon şartlarında, dört tetrasiklin antibiyotiklerinin (tetrasiklin, klortetrasiklin, metasiklin, doksisiklin) zenginleşme faktörü 25-98 arasında elde edilmiştir. Gerçek örneklerde tetrasiklin kalıntılarına rastlanmamıştır. Yöntemin

doğruluğu için, litresinde 50-250 mikrogram derişimlerde standart tetrasiklin çözeltilerinden süt, bal ve yumurta örneklerine eklenmiş ve 65-120 arasında yüzde geri kazanım elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Tetrasiklinler, iyonik sıvı, dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu, yüksek performanslı sıvı kromatografisi

PROGRESSING AN EXTRACTION METHOD FOR ENRICHMENT OF TETRACYCLINES BEFORE THEIR CHROMATOGRAFIC DETERMINATION

ABSTRACT

Many methods have been used for an antibiotic residue analysis in animal foods. In this study, two different dispersive liquid-liquid microextraction methods for enrichment of tetracyclines before high performance liquid chromatography determination in milk, egg and honey samples have been progressed. In the first method, traditional ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method has been developed. 1-Hexyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethane)sulfonyl]imide as an ionic liquid was used. To increase extraction efficiency, pH, salt effect, volume of extractant solvent, type of dispersive solvent, volume of dispersive solvent, extraction time and centrifugation time were optimized. At optimized conditions, the enrichment factors of the studied six tetracycline antibiotics (minocycline, oxytetracycline, tetracycline, chlorotetracycline, methacycline, doxycycline) were found in the range of 15 to 105. The residue of tetracyclines were not found in the studied real samples. For the accuracy of the method, the 100 and 250 microgram per liter of standard tetracycline mixture solutions were spiked to the blank real milk, honey and egg samples and the percentage recovery was obtained betwwen 50 and 95.

In the second method, in-situ ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method has been introduced for enrichment of four tetracycline antibiotics before chromatographic determination. 1-benzyl-3-methylimidazolium chloride was used as ionic liquid. To increase extraction efficiency, optimization parameters (volume of ammonium hexafluorophoshate salt solution, equilibrium time, centrifugation time, volume ratio of ionic liquid/salt) were investigated. At optimized conditions, enrichment factors of four tetracycline antibiotics (tetracycline, chlorotetracycline, methacycline, doxycycline) were found between 25 and 98. The residue of tetracyclines were not found in the studied real samples. For the accuracy

of the method, the 50 and 250 microgram per liter of standard tetracycline mixture solutions were spiked to the blank real milk, honey and egg samples and the percentage recovery was obtained betwwen 65 and 120.

Keywords: Tetracyclines, ionic liquid, dispersive liquid-liquid microextraction, high performance liquid chromatography

İÇİNDEKİLER

Sayfa

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

BÖLÜM BİR-GİRİŞ 1

1.1 Antibiyotik 1
1.1.1 Antibiyotiklerin Etki Güçlerine göre Sınıflandırılmaları 2
I. Bakteriyostatikler 3
II. Bakterisidler 3
1.2 Tetrasiklinler (TS' ler) 3
1.2.1 Klortetrasiklin (KTS) 6
1.2.2 Minosiklin (MNS) 7
1.2.3 Oksitetrasiklin (OTS) 7
1.2.4 Doksisiklin (DOS) 8
1.2.5 Metasiklin (META) 8
1.3 Tetrasiklin Antibiyotiklerin Etkileri 8
1.4 Tetrasiklin Antibiyotiklerin Gıda Ürünlerindeki Maksimum Kalıntı Limitleri 9
1.5 Tetrasiklinlerin Tayini 10
1.6 Tetrasiklinlerin Tayin Öncesi Zenginleştirilmesi 10
1.7 Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyonu Yöntemi 11
1.7.1 İyonik Sıvı Bazlı Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyonu (İS-DSSME) 14
1.7.1.1 Geleneksel İS-DSSME 14
1.7.1.2 Sıcaklık Kontrollü İS-DSSME 15
1.7.1.3 Ultrason-destekli, Mikrodalga-destekli yada Vorteks-destekli İS-DSSME 16

1.7.1.4 İn-sitü İS-DSSME 17
1.8 İyonik Sıvılar 17
1.9 Literatür Taraması 22
1.10 Çalışmanın Amacı 24

BÖLÜM İKİ-MATERYAL VE YÖNTEM 25

2.1 Reaktifler 25
2.2 Standart Çözeltilerin ve Tamponların Hazırlanışı 25
2.3 Cihazlar 26
2.4 Tetrasiklinlerin HPLC ile Analizi 26
2.5 Gerçek Örnekler 27
2.5.1 Gerçek Örneklerin Analize Hazırlanması 28
2.5.1.1 Süt 28
2.5.1.2 Bal 28
2.5.1.3 Yumurta 28
2.6 Geleneksel İS-DSSME Yöntemi 29
2.7 İn-sitü-İS-DSSME Yöntemi 29

BÖLÜM ÜÇ-DEĞERLENDİRME 30

3.1 TS Antibiyotiklerinin HPLC ile Analizi 30
3.2 İS-DSSME Yöntemlerinin Optimizasyonu 33
3.2.1 Geleneksel İS-DSSME Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları 33
3.2.1.1 Tuz Etkisi 33
3.2.1.2 pH Etkisi 34
3.2.1.3 İyonik Sıvı Hacmi 35
3.2.1.4 Dispersif Çözücü Türü 36
3.2.1.5 Dispersif Çözücü Hacmi 37
3.2.1.6 Ekstraksiyon Süresi 38
3.2.1.7 Santrifüj Süresi 39
3.2.2 İn-sitü-İS-DSSME Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları 40

3.2.2.1 NH_4PF_6 Tuz Çözeltisinin Hacim Etkisi 41
3.2.2.2 Denge Süresi 41
3.2.2.3 Santrifüj Süresi 42
3.2.2.3 İyonik sıvı/Tuz Hacim Oranları 43
3.3 İS-DSSME Yöntemlerinin Analitik Performansı 44
3.3.1 Geleneksel-İS-DSSME Yönteminin Analitik Performansı 44
3.3.2 İn-situ-İS-DSSME Yönteminin Analitik Performansı 46
3.4 Gerçek Örnekler 48
3.4.1 Geleneksel-İS-DSSME Yöntemiyle 48
3.4.2 İn-situ-İS-DSSME Yöntemiyle 52

BÖLÜM DÖRT-SONUÇLAR 56

KAYNAKLAR 59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Düzlemsel görünümde tetrasiklin molekülü 4
Şekil 1.2 Dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterilimi..... 12
Şekil 1.3 Geleneksel İS-DSSME yönteminin şematik gösterimi 15
Şekil 1.4 Sıcaklık kontrollü İS-DSSME yönteminin şematik gösterimi 15
Şekil 1.5 Ultrason-destekli, Mikrodalga-destekli ya da Vorteks-destekli İS-DSSME yönteminin şematik gösterimi 16
Şekil 1.6 Yönteminin şematik gösterimi İn-sitü-İS-DSSME 17
Şekil 1.7 İS' lerde yaygın olarak kullanılan anyon ve katyonlar 18
Şekil 1.8 İS' lerin başlıca uygulamalarının şematik diyagramı 19
Şekil 2.1 Dionex Ultimate 3000 model HPLC cihazı 27
Şekil 3.1 TS karışımının 5 μg mL^{-1} standart derişimdeki kromatogramı (150 mm lik HPLC kolonu) 30
Şekil 3.2 TS karışımının 5 μg mL^{-1} standart derişimdeki kromatogramı (50 mm' lik HPLC kolonu) 30
Şekil 3.3 TS bileşiklerinin aletsel kalibrasyon doğruları 31
Şekil 3.4 Geleneksel İS-DSSME yönteminde tuz etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; tuz miktarı [250μL 10^{-3} M SDS; % 0,1 NaCI/Su 500mL; 50μL 0,4x10^{-3} M $La(NO_3)_3$]; pH=4; 50μL hegzil-MIM-NTF_2; 500μL MeOH ; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama; 10 dk 4000 rpm santrifüj). 34
Şekil 3.5 Geleneksel İS-DSSME yönteminde pH etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; 50μL hegzil-MIM-NTF_2; 500μL MeOH ; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama; 10 dk 4000 rpm santrifüj). 35
Şekil 3.6 Geleneksel İS-DSSME yönteminde iyonik sıvı hacminin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 500μL MeOH ; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama; 10 dk 4000 rpm santrifüj). 36
Şekil 3.7 Geleneksel İS-DSSME yönteminde dispersif çözücü türünün etkisi (Çalışma koşulları:5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 50μL hegzil-MIM-

NTF_2 ; 500 µL dispersif çözücü; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama; 10 dk 4000 rpm santrifüj). 37
Şekil 3.8 Geleneksel İS-DSSME yönteminde dispersif çözücü hacminin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 50µL hegzil-MIM-NTF_2 ; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama; 10 dk 4000 rpm santrifüj). 38
Şekil 3.9 Geleneksel İS-DSSME yönteminde ekstraksiyon süresinin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 50µL hegzil-MIM-NTF_2; 750µL ACN; 10 dk 4000 rpm santrifüj). 39
Şekil 3.10 Geleneksel İS-DSSME yönteminde santrifüj süresinin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 50µL hegzil-MIM-NTF_2; 750µL ACN; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama). 40
Şekil 3.11 İn-situ-İS-DSSME yönteminde NH_4PF_6 çözelti hacminin etkisi. (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi, pH=3; 100µL 0,4g/mL benzil-MIM-Cl çözeltisi; 4 dk çalkalama; 10 dk 40000 rpm santrifüj) 41
Şekil 3.12 İn-situ-İS-DSSME yönteminde denge sürelerin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 100µL 0,4g/mL benzil-MIM-Cl; 700µL 0,104g/mL NH_4PF_6 ;10 dk 4000 rpm santrifüj). 42
Şekil 3.13 İn-situ-İS-DSSME yönteminde santrifüj süresinin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 100µL 0,4g/mL benzil-MIM-Cl; 700µL 0,104g/mL NH_4PF_6; 60 sn çalkalama). 43
Şekil 3.14 İn-situ-İS-DSSME yönteminde benzil-MIM-Cl (µL)/NH_4PF_6 (µL) hacim oranlarının etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 60 sn çalkalama; 5 dk santrifüj). 44
Şekil 3.15 TS' in kromatogramları (50 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler ve (B) Geleneksel-İS-DSSME yöntemi sonrası (250 µg L^{-1}), (C) süt örneği ve (D) süt örneğine 250 µg L^{-1} standart TS eklendikten sonra (1 = MSN, 2=OTS, 3=TS, 4= KTS, 5 = MTS, 5 = DOS). 48
Şekil 3.16 TS' in kromatogramları (50 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler ve (B) Geleneksel-İS-DSSME yöntem sonrası (250 µg L^{-1}), (C) yumurta örneği ve (D) yumurta örneğine 250 µg L^{-1} standart TS

eklendikten sonra (1 = MSN, 2=OTS, 3=TS, 4= KTS, 5 = MTS, 5 = DOS)..... 49
Şekil 3.17 TS' in kromatogramları (50 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler ve (B) Geleneksel-İS-DSSME yöntem sonrası (250 µg L^{-1}), (C) bal örneği ve (D) bal örneğine 250 µg L^{-1} standart TS eklendikten sonra (1 = MSN, 2=OTS, 3=TS, 4= KTS, 5 = MTS, 5 = DOS). 49
Şekil 3.18 TS' in kromatogramları (150 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler ve (B) in-sitü-İS-DSSME yöntem sonrası (250 µg L^{-1}), (C) süt örneği ve (D) süt örneğine 250 µg L¯1 TS eklendikten sonra (1 = TS, 2= KTS, 3 = MTS ve 4 = DOS)..... 52
Şekil 3.19 TS' in kromatogramları (150 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler (B) in-sitü-İS-DSSME yöntem sonrası (250 µg L^{-1}), (C) yumurta örneği ve (D) yumurta örneğine 250 µg L^{-1} TS eklendikten sonra (1 = TS, 2= KTS, 3 = MTS ve 4 = DOS). 53
Şekil 3.20 TS' in kromatogramları(150 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler (B) in-sitü-İS-DSSME yöntem sonrası (250 µg L^{-1}), (C) bal örneği ve (D) bal örneğine 250 µg L^{-1} TS eklendikten sonra (1 = TS, 2= KTS, 3 = MTS ve 4 = DOS). 53

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo1.1 Bakteriyostatikler 3
Tablo 1.2 Bakterisidler 3
Tablo 1.3 Bazı tetrasiklin antibiyotiklerinin molekül yapıları 5
Tablo 1.4 Tetrasiklinin genel molekül yapısı ve tetrasiklin antibiyotiklerinin molekül yapısı ve adları (Önal, 2011) 6
Tablo 1.5 Tetrasiklin antibiyotiklerinden bazılarının Avrupa Birliği'nde maksimum kalıntı limitleri (MKL) 10
Tablo 1.6 Çalışmada Kullanılan iyonik sıvıların yapıları ve özellikleri 21
Tablo 2.1 HPLC cihaz parametreleri ve analiz koşulları 27
Tablo 3.1 TS bileşiklerinin aletsel analitik parametreleri 32
Tablo 3.2 Geleneksel-İS-DSSME yöntemin analitik performansı 45
Tablo 3.3 İn-sitü-İS-DSSME yöntemin analitik performansı 47
Tablo 3.4 Geleneksel-İS-DSSME yöntemi ile süt, bal ve yumurta örneğinde TS antibiyoiklerinin analiz sonuçları 50
Tablo 3.5 İn-sitü-İS-DSSME yöntemi ile süt, bal ve yumurta örneğinde TS antibiyoiklerinin gün-içi analiz sonuçları 54
Tablo 3.6 İn-sitü-İS-DSSME yöntemi ile süt, bal ve yumurta örneğinde TS antibiyoiklerinin günler-arası analiz sonuçları 55
Tablo 3.7 Geliştirilen İS-DSSME yönteminin literatürdeki diğer yöntemler ile karşılaştırılması 58

BÖLÜM BİR
GİRİŞ

1.1 Antibiyotik

Antibiyotikler küçük rahatsızlıklardan hayatı tehdit eden enfeksiyonlara kadar hastalıkların tedavisi için önerilen ilaçlar arasında yer almaktadır. Bunlar DNA, proteinler veya hücre duvarı bileşenlerin biyosentezini engelleyen bakterilere zarar verir ya da öldürürler. Ne yazık ki bakteriler klinikteki birçok antibiyotik bozukluklarına daha belirgin antibiyotik direnci gösterirler. Avrupa'da her yıl seçili multidrag dirençli bakteri ile bulaşıcı hastalıktan 25 000 insan ölmektedir (Yu, Chen ve Cao, 2012).

Antibiyotikler hem insan hem de veteriner tıbbında kullanımı artan aktif biyolojik moleküllerdir. 2006 yılından bu yana antibiyotikler AB'de hayvan yemlerinde büyüme hızlandırıcı olarak yasak olmasına rağmen bu ilaçlar; hayvancılık üretiminde tedavi ve büyüme hızlandırıcı olarak, balık çiftliklerinde yem katkı maddesi olarak ve bakteriler tarafından ürünlerin zarar görmesini önlemek için hayvancılık, sanayi ve modern tarımda önemli rol oynayabilir. Hayvanlara verilen antibiyotiklerin büyük bir kısmı metabolizmadan atılır ve toprak ıslah için kullanılan gübre ile dağıtılır ve sonunda yüzey alan sularına ulaşır (González-Pleiter ve diğer 2013).

Hayvansal gıdalarda yüksek seviyelerdeki antibiyotik kalıntıları sadece alerjik reaksiyonları arttırmaz, aynı zamanda patojen direnç gelişimini de arttırır. Bu nedenle, tüm dünyada hükümetlerin veteriner antibiyotik kullanımı kontrolü için çabalarını yoğunlaştırmakta ve maksimum kalıntı limitleri (MKL) üzerinde giderek daha sıkı düzenlemeler yapılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) gibi diğer piyasa bölgelerle karşılaştırıldığında, Avrupa Birliği (AB) ülkelerinin çoğu antibiyotik kalıntılarına daha çok dikkat etmektedir. Örneğin Avrupa Birliği'nde en sorunlu antibiyotik olarak bilinen tetrasiklin (böbrekte), ABD'nin MKL'si AB'nin %5'idir (Chen ve Schwack, 2014).

Gıda üretiminde veteriner ilaçlarına ilişkin kalıntı oluşumu; ilacın uygulama şekli, dozu, galenik yapısı, farmakokinetik özellikleri ve bekleme süresi gibi birçok faktöre bağlıdır. Antibiyotik kalıntısı bulunabilecek hayvansal gıdalar; büyükbaş ve küçükbaş hayvanların etleri ve iç organları, balık, süt, yumurta ve baldır. Antibiyotiklerin bazılarının atılımı böbrek, süt veya yumurta yolu ile olur. Veteriner hekimlikte antibiyotik kullanımı sonucu hayvanların et ve iç organları ile yumurta ve sütteki antibiyotik kalıntıları, insanda toksik, alerjik veya mikroorganizmalarda direnç gelişimi gibi önemli etkilerin meydana gelmesine neden olurlar (Erol, İplikçioğlu, 2007).

Antibiyotik şemaları birçok sınıflandırma olmasıyla birlikte, bakteri spekturumuna (geniş, dar) ya da faaliyet türüne (bakteri vs. bakteriyostatik) dayanarak, en yararlı kimyasal yapıya dayanmaktadırlar. Yapısal sınıf içindeki antibiyotiklerin etkinliği, toksisitesi ve alerjik potansiyeli genellikle benzer özellikler gösterecektir (Antibiotics: Types and Side Effects, 2015).

- Beta-Laktam
- Penisilinler
- Sefalosporinler
- Makrolitler
- Florokinonlar
- Tetrasiklinler
- Aminoglikozidler

1.1.1 Antibiyotiklerin Etki Güçlerine göre Sınıflandırılmaları

Antibiyotik ve kemoterapötikleri çeşitli kriterlere göre sınıflandırmak mümkündür. Ancak bugün en fazla kullanılan sınıflandırma, bu ilaçların etki mekanizmalarına ve etki güçlerine göre yapılanlarıdır.

Antibiyotikler, vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki gruba ayrılır.

I. Bakteriyostatikler: Bunlar bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önlerler. Gelişmesi ve üremesi duran bakteriler, vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilirler (Tablo 1.1)(Akkan, 1997).

Tablo1.1 Bakteriyostatikler

Tetrasiklinler	Linkozamidler
Makrolitler	Metronidazol
Sülfonamidler	Mikonazol
Amfenikoller	

II. Bakterisidler: Bunlar bakteri hücresini dolaysız olarak yok ederler (Tablo 1.2).

Tablo 1.2 Bakterisidler

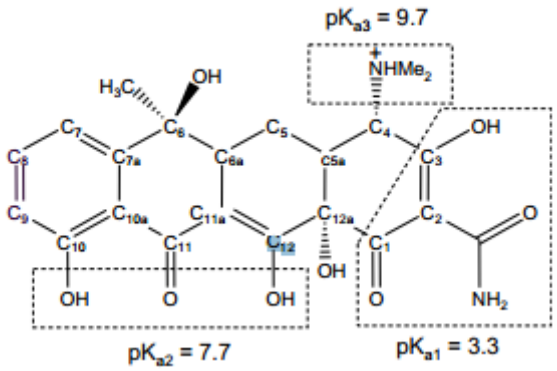
Beta-Laktamlar		**Beta-laktamaz İnhibitörleri**
Penisilinler	Vankomisin	Sulbaktam
Sefalosporinler	Rifamisin	Tazobaktam
Monobaktamlar	Teikoplanin	Klavulanik Asid
Karbapenemler	Florokinolonlar	
Polipeptidler		

1.2 Tetrasiklinler (TS' ler)

Tetrasiklin antibiyotikleri, insanlar, hayvanlar ve tarımsal faaliyetlerde bakteriyel enfeksiyonların kontrol edilmesi için dünya çapında kullanılan birincil antibiyotiklerdir (Lv, Ma, Chang ve Fan, 2015) ve 1950'den beri kullanılmaktadır (Hopkins ve Blaney, 2014). Tetrasiklin antibiyotikleri dünya çapında binlerce ton üretilmektedir. Dünyada üretim ve tüketim sıralamasında ikinci sırana Çin yer almaktadır. Bununla birlikte tetrasiklin antibiyotikleri çok az alındığında, metabolize edilir ya da canlı organizmada absorplanır, çoğu (yaklaşık %70-90) insanlar ve hayvanlarda metabolizmadan idrar ya da dışkı şeklinde dışarı atılır. Tetrasiklin su ürünleri yetiştiriciliğinde ve veterinerlikte kullanılan en önemli tetrasiklin antibiyotiğidir. Ancak ilaç endüstrisinde tetrasiklin üretimi atık sularda yüksek

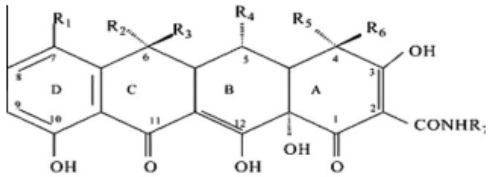
miktarda tetrasiklin kalıntılarına rastlanmış ve tetrasiklin konsantrasyonu 0,15 µg L^{-1} 2,37 µg L^{-1} arasındadır. Tetrasiklin kalıntısı, dirençli mikroorganizmalara neden olmakta ve enfeksiyonu arttırarak insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır (Lv, Ma, Chang ve Fan, 2015).

Tetrasiklinler amfoterik bileşiklerdir Tetrasiklinden başka minosiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin, metasiklin, doksisiklin tetrasiklin antibiyotiklerine örnek verilebilir ve bu tetrasiklin antibiyotikleri üç pK_a değerlerine sahiptirler. Tetrasiklinlerde ilk ayrışma değeri (K_{a1}), C3 karbonundaki OH deprotonasyonu ile ilişkilidir (Şekil 1.1). K_{a2} ve K_{a3}, O12 oksijeni ve dimetil amonyumdan proton ayrılması ile oluşurlar. Tetrasiklin bileşiklerinde tüm pH aralığında yükler lokalize olur ve sadece pH 3-9 arası melez iyonlar olarak nötr hale geçerler. Alkali koşullar altında, tetrasiklinler N4 ve OH12a arasında hidrojen bağı sağlayan bir yapı oluştururlar. Nötr veya asidik koşullar altında, N4 konumundaki nitrojen protonlanmış olur, önceki yapıyı bozulur ve hidrojen-bağı etkileşimi O3 oksijeni ile oluşur (Babić, Horvat, Pavlović ve Kaštelan-Macan, 2007).



Şekil 1.1 Düzlemsel görünümde tetrasiklin molekülü (Li, Schulz, Ackley ve Fenske, 2010)

Tablo 1.3 Bazı tetrasiklin antibiyotiklerinin molekül yapıları



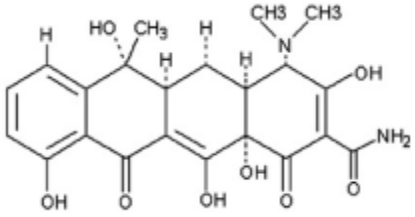
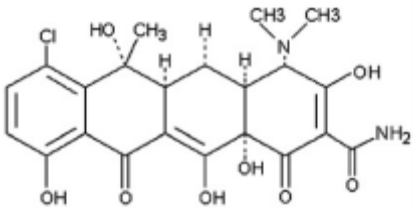
Tetrasiklin adı	Kimyasal Adı	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Tetrasiklin	4- (Dimetil amino) -1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-3,6,10,12,12a-Pentahidroksi-6-metil-1,11-diokso-2-naftasen karboksamid monohidro klorür	H	CH_3	OH	H	$N(CH_3)_2$	H	H
Klortetrasiklin	7-kloro-tetrasiklin	CI	CH_3	OH	H	$N(CH_3)_2$	H	H
Oksitetrasiklin	5-hidroksi-tetrasiklin	H	CH_3	OH	H	$N(CH_3)_2$	H	H
Metasiklin	6-metilen-5-hidroksi tetrasiklin	H	$-CH_2$	$-CH_2$	OH	$N(CH_3)_2$	H	H
Minosiklin	7-dimetilamino-6-demetil-6-deoksitetrasiklin	$N(CH_3)_2$	H	H	H	$N(CH_3)_2$	H	H
Doksisiklin	6-deoksi-5-hidroksi-tetrasiklin	H	$-CH_2$	H	OH	$N(CH_3)_2$	H	H

1.2.1 Klortetrasiklin (KTS)

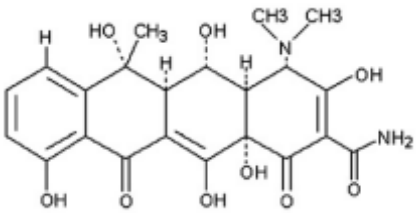
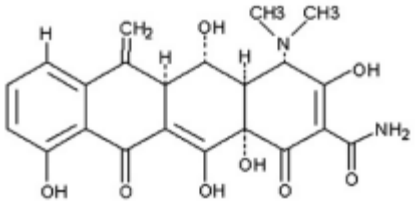
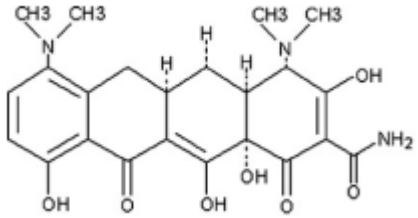
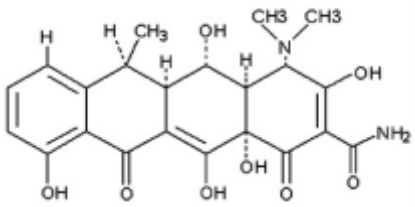
Klortetrasiklin önemli bir antibiyotiktir ve Streptomiçes aureofaciensin ikinci metabolitidir. Bakteriyel inhibisyonu, hayvanların büyümelerini hızlandırması, hayvan yemlerinde yüksek kullanılabilirlik, hayvan dokularındaki düşük kalıntı ve düşük üretim maliyetliliği ile karakterize edilir. Son yıllarda klor tetrasiklin hayvan yemi sektöründe en çok tüketilen antibiyotiktir (Yang, Chen ve Jin, 2015).

KTS geniş spektrumlu antibiyotik ilaçları bir türü olup, keşfedilen ilk tetrasiklin ve tetrasiklin grubudur. Bu antibiyotik, yaygın olarak insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisi ve profilaktik kontrolü için kullanılmıştır. Aynı zamanda hayvancılıkta büyüme hızlandırıcı olarak kullanılmaktadır. KTS' nin yaygın kullanımı ciddi bir sorun haline gelmiştir. İnsanlar klortetrasiklin kalıntılarının olduğu yemekleri devamlı yedikleri zaman, alerjik reaksiyonlar, karaciğer hasarı, mide-bağırsak bozukluğu ve dişlerin sararması gibi birçok zararlı etkiye neden olabilir. Ayrıca mikrobiyal türler ilaç direncinin artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır (Lian, Huang, Yu, Zhang, Lin, He ve Liu, 2012).

Tablo 1.4 Tetrasiklinin genel molekül yapısı ve tetrasiklin antibiyotiklerinin molekül yapısı ve adları (Önal, 2011)

	Molekül yapısı	pKa_1	pKa_2	pKa_3
Tetrasiklin		3,32	7,8	9,6
Klortetrasiklin		3,3	7,6	9,3

Tablo 1.4 Tetrasiklinin genel molekül yapısı ve tetrasiklin antibiyotiklerinin molekül yapısı ve adları (Önal, 2011) (devamı)

	Molekül yapısı	pKa_1	pKa_2	pKa_3
Oksitetrasiklin		3,2	7,5	8,9
Metasiklin		3,5	7,7	9,5
Minosiklin		2,8	7,8	9,3
Doksisiklin		3,0	8,0	9,2

1.2.2 Minosiklin (MNS)

Minosiklin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı, 30 yıldır kullanılmakta olan bir ikinci kuşak, yarı-sentetik bir tetrasiklin türevidir (Garrido-Mesa, Zarzuelo ve Gálvez, 2013).

1.2.3 Oksitetrasiklin (OTS)

Tetrasiklinlerden biri olan oksitetrasiklin, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Bu antibiyotik Streptomyces rimosus türünden üretilmiş ve 1950 yılında tanıtılmıştır (Kaale, Chambuso ve Kitwala, 2008).

Geniş bir antibakteriyel spektrumu ve etki gücü yüksek olan OTS, sığır, domuz, koyun ve kümes hayvanları gibi gıda üretiminde kullanılan hayvanlarda çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılan yaygın bir antibiyotiktir (Fernandez-González, Garc´ıa-Falcón ve Simal-Gándara, 2002).

1.2.4 Doksisiklin (DOS)

Doksisiklin yaygın hem gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar için kullanılan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Pomorska-Mól, Kwit, Markowska-Daniel ve Pejsak, 2014). Bu antibiyotik, tatlı su ürünleri yetiştiriciliğinde, kümes hayvanları ve otçul hayvancılıkta kullanımı nedeniyle dikkat çekmiştir. (Zhu, Liu, Liu, Li, Tian ve Hu, 2014) ve ayrıca insanlarda bakteriyel enfeksiyonları kontrol altında tutmak için kullanılmaktadır (Gürler, Özkorucuklu ve Kır, 2013).Bununla birlikte, DOS yüksek dozajda alındığı zaman, alerjik reaksiyonlar, karaciğer hasarı, diş sararma ve mide-bağırsak bozukluğu gibi insan sağlığına zararlı etkileri vardır (Zhu ve diğer, 2014).

Yüksek lipit çözünürlük ve geniş bir antibakteriyel spektrumu ve kolay kullanılabilirliği ve bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımına sonucunda, et, yumurta, kök dokuları ve süt DOS kalıntılarının yüksek seviyede bulunabilir (Gürler ve diğer, 2013).

1.2.5 Metasiklin (META)

Metasikline çok geniş spektrum ve yarı sentetik tetrasiklinlerden biridir (Chen, Ren, Meng, Zhang ve Zhong, 2005).

1.3 Tetrasiklin Antibiyotiklerin Etkileri

Streptomiçes tarafından üretilen tetrasiklin antibiyotikleri gram pozitiften gram negatif bakteriler arasında değişen antibiyotiklerdir ve Stafilokok, Strepkokokal, Pnömokok, Gonokok, Kolera, Dizanteri Basilinin, Boğmaca, Riketsiya'lara,

Klamidya ve microplazmalara karşı özellikle etkilidir. Tetrasiklinler duyarlı bakteri hücrelerine aktif olarak taşınır ve 30S ribozomal alt ünitesine bağlandıktan sonra protein biyosentezini inhibe ederek bakteriostatik etki gösterirler (Oka, Ito ve Matsumoto, 2000). Tetrasiklinler protein sentezini inhibe ederek aminoasit tRNA (aa-tRNA)'nın ribozoma bağlanmasını engeller 30S alt ünitesine öncelikle bağlanır. Antimikrobiyal aktivitesine ek olarak, tetrasiklinler, birçok antibakteriyal olmayan etkileri, enflamasyon engellenmesi dahil, proliz ve anjiyonez hem kansorojen hem de antimetasyatik aktiviteye sahiptir (Rok, Buszman, Delijewski, Otręba, Beberok ve Wrześniok, 2015).

Tetrasiklinler iyi dayanıklılığı, ağızda alınabilirliği ve düşük maliyetli ilaç sınıfında olmasından dolayı, insan tıbbında ve hayvancılıkta geniş bir kullanım sağlamıştır. Bununla birlikte genelde belirgin yan etkilerin olmamasına rağmen, tetrasiklinler mide-barsak sistemine, cilt ve merkezi sinir sisteminde olumsuz etkiler gösterebilirler. Antibiyotik spekturumuna benzer olsa da, türü ve yaygın olarak reçete edilen tetrasiklinlerin sürekli rastlanan olumsuz etkileri ile hastalar arasında farklılık olmaktadır. Örneğin, ilacın neden olduğu karaciğer hasarı ve yağlanması, doksisiklin tedavisi ile bağlantısı nadir olarak bildirilmiştir, daha çok minosiklin ve tetrasiklin ile ilişkilidir (Brüning, Brem, Vogel ve Mylonas, 2014).

1.4 Tetrasiklin Antibiyotiklerin Gıda Ürünlerindeki Maksimum Kalıntı Limitleri

Hayvansal kaynaklı gıdalardaki antibiyotik kalıntıları MKL ile belirlenmiş veteriner uygulamalarında pek önerilmez ve insanlarda bakterilere karşı direnç oluşmasını sağlayabilir; bununla birlikte mevcut sonuçlar riskinin düşük olduğunu göstermektedir (Mamani, Reyes ve Rath, 2009). Tablo 1.5' te bazı tetrasiklin antibiyotiklerin gıda ürünlerindeki MKL' si verilmiştir.

Tablo 1.5 Tetrasiklin antibiyotiklerinden bazılarının Avrupa Birliği'nde maksimum kalıntı limitleri (MKL)

Antibiyotikler	Gıda ürünleri	MKL (μg/kg)
TS, KTS, OTS	süt	100
	yumurta	200
	bal	10–50

1.5 Tetrasiklinlerin Tayini

Hayvansal gıdalardaki tetrasiklin kalıntılarını analiz etmek için; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Sun, He, Zhang ve Chen, 2009), sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi (Pamreddy, Hidalgo, Havel ve Salvadó, 2013) ve immunoassay (Jeon ve Paeng, 2008) gibi birçok yöntemler kullanılmıştır (Song, Zhang, Zhang, Feng, Wanga ve Wang, 2014). Genelde bu analizler HPLC ile gerçekleşmekte ve yüksek ayrım gücüne sahip olması, hızlı analiz sağlaması, yüksek duyarlıkta olması nedeni ile tercih edilmektedir. Tetrasiklinlerin analizleri diyot array, ultraviole ya da florometrik dedektörlü HPLC ile gerçekleştirilmektedir (Shariati, Yamini ve Esrafili, 2009).

1.6 Tetrasiklinlerin Tayin Öncesi Zenginleştirilmesi

Genellikle hayvansal ürünlerdeki tetrasiklin antibiyotiklerini analiz etmek için kullanılan örnek hazırlama teknikleri, sıvı sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyonu olmuştur. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (SSE) iyi analitik performans göstermesine rağmen, pahalı, uzun zaman alan ve çevre dostu olmayan teknik olması yanında emülsiyon oluşumu, yüksek hacimde örneğe ve toksik organik çözücüye ihtiyaç duyulması da dahil olmak üzere gibi birçok dezavantajları olan tekniktir (Junza, Dorival-García, Zafra-Gómez, Barrón, Ballesteros, Barbosa ve diğer, 2014).

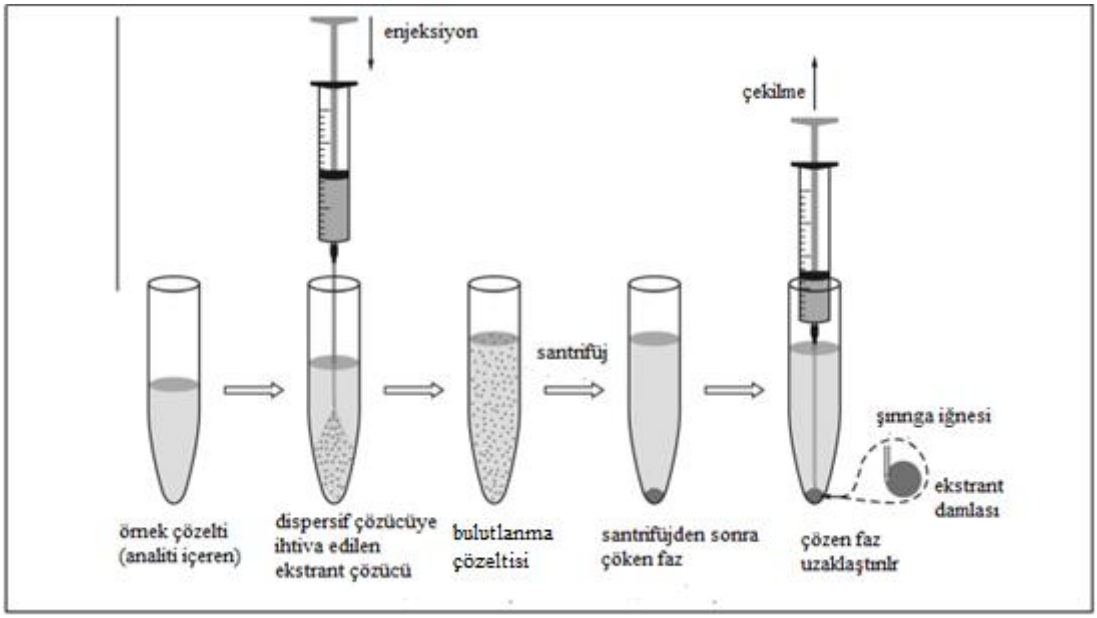
Gıda örneklerinde, analitlerin analizinde örnek hazırlama süreçleri kaçınılmazdır. Örnek hazırlama clean-up ve analitlerin zenginleştirilmesini kapsayan önemli analitik basamaktır. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (BSE) (Liu, Yang, Yang, Hu, Cheng, Liu ve diğer, 2013), katı faz ekstraksiyon (KFE) (Yang, Yang ve Yan, (2013) ve

katı-faz mikroekstraksiyonu (Hu, X., Pan, Hu, Huo ve Li, 2008), dispersif sıvı sıvı ekstraksiyon (DSSME) son yıllarda en yaygın kullanılan ekstraksiyon teknikleridir.

Ekstraksiyon basamakları, clean-up ve matriks analitlerin zenginleştirmesi aletsel analiz öncesi gerçek örneklerdeki antibiyotik kalıntılarının analizinde çok önemlidir. Sıvı sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon gibi geleneksel teknikler, sıvı gıda örneklerin ön işleminde ya da clean-up yada bazı ekstrantlarında uygulanmıştır. Katı-sıvı ekstraksiyon, ultrasonik ekstraksiyon ve matriks katı-faz ekstraksiyonu katı biyolojik matrislerden çıkan kirleticilerin ekstraksiyonu için geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bu yöntemlerin çoğu zaman alıcı ve genellikle toksik, pahalı ve seçici olmayan organik çözücüler gereklidir (Wang, Yang, Zhang, Mo ve Lu,2008).

1.7 Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyonu Yöntemi

Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (DSSME) 2006 yılında Rezaee ve arkadaşları 2006 (Rezaee, Assadi, Hosseini, Aghaee, Ahmadi ve Berijani, 2006) tarafından geliştirilen başarılı bir ekstraksiyon yöntemidir. O zamandan bu yana, teknik uygulamaları etkileyici bir şekilde literatürde yer almaktadır. DSSME tekniğinin temeli basittir; analitleri içeren sulu örnek ile suda çözünmeyen düşük miktarda (çoğunlukla mikrolitre seviyede) ekstrant çözücü ile karışabilen dispersif çözücü (çoğunlukla 0,5-1 mL) karıştırılır. Bu üç bileşen karıştırıldığı zaman, çözelti içinde birden fazla mikro damlacıklar oluşur. Analitler, düşük miktardaki ekstrant çözücü içerisinde zenginleşir, ekstrant çözücü sulu çözelti içerisinde dağılır ve santrifüj ile ayrılır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterilimi (Zgoła-Grześkowiak ve Grześkowiak, 2011).

DSSME analitlerin ve ekstrant çözücünün ince damlacıkların yüksek temas yüzeyine bağlı olarak, analitlerin kütle transfer işlemlerini hızlandıran başarılı bir ekstraksiyon tekniğidir. DSSME 'de bulutlanma noktası özelliği olsa da, bazı DSSME yöntemleri homojen sıvı-sıvı ekstraksiyona benzemektedir.

Bu yöntem;

- Yüksek zenginleştirme faktörü
- Yüksek ekstraksiyon verimi
- Örnek ve organik çözücülere gereksinime ihtiyacın düşük olması

gibi nedenlerden dolayı daha tercih edilmektedir. Dağıtıcı çözücü gereksinimi mL aralığındadır (numune seyreltme ile birlikte) ve fazların ayrılmasını kolaylaştırmak için bir santrifüj adımının gerekliliği eksiklikleri arasında sayılabilir.

Bugüne kadar, bu yöntem çeşitli modifikasyonlara uğramıştır. Örneğin, sudan daha az yoğun ekstaktant çözücü kullanımında vorteks veya ultrasound kullanımı, analitin eşzamanlı olarak türevlendirilmesi ve DSSME nin diğer örnek hazırlama

teknikleri ile bağlantılı kullanımı gibi yenilikler bulunmaktadır (Trujillo-Rodríguez, Rocío-Bautista, Pino ve Afonso, 2013).

DSSME yönteminde ekstraksiyon verimini artırmak için:

- Uygun ekstraksiyon çözücüsü ve dispersif çözücüsü ve bunlarım hacimleri
- Ekstraksiyon süresi
- Tuz etkisi

gibi parametreler optimize edilir.

Uygun ekstraksiyon çözücüsü seçimi DSSME işlemi için büyük önem taşımaktadır. Ekstraksiyon çözücüsü, su ile karışmaz nitelikte olmalı, analit ve iyi bir kromatografik davranış için iyi bir çözünürlüğe sahip olmalıdırlar. Bugüne kadar gıda pestisit kalıntıları analizi için en yaygın olarak kullanılan çıkarma çözücüler, sudan daha yüksek bir yoğunluğa sahip klorlanmış çözücüler, örneğin, karbon tetraklorür, kloroform ve klorobenzen ya da sudan daha düşük yoğunluğa sahip, örneğin, 1-undekanol ve n-hekzan gibi çözücüler genellikle daha az toksik etkileri vardır. Bir başka ekstraksiyon çözücü de iyonik sıvılardır (İS). İS' lar, düşük erime noktasına sahip tuzlardır, genel olarak daha az toksik, daha az uçucu, çevre dostu çözeltiler olduğu bulunmuştur.

Dispersif çözücü hem sulu örnek ve ekstraksiyon çözücüsüne karışabilmeli ve ekstraksiyon çözücünün ara yüzey gerilimini azaltacak kapasiteye sahip olmalıdır. Dispersif çözücü olarak genelde metanol, aseton ve asetonitril kullanılmaktadır (Andraščíková, Matisová ve Hrouzková, 2015).

Zenginleştirme katsayısı (ZK) ve ekstraksiyon geri kazanımı (% geri kazanım) aşağıdaki gibi hesaplanır.

$ZK = C_{sed}/Co$

$\%\ \text{geri kazanım} = (C_{sed} \times V_{sed})/(Co \times V_{aq})$

burada, zenginleştirme faktörü (ZK), çökelen analit konsantrasyonunun, sulu çözelti içindeki analitin başlangıç konsantrasyonuna oranı; % geri kazanım ise, çökelen fazın sulu örneğin hacmine oranı olarak ifade edilir (Xiao-Huan, Qiu-Hua, Zhang, Guo-Hong ve Zhi, 2009).

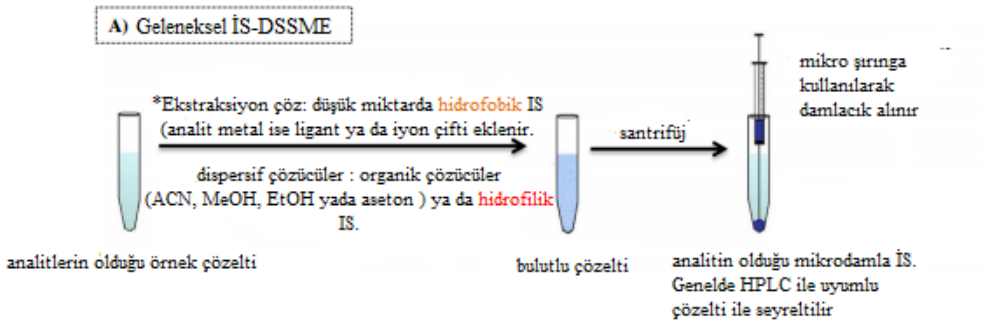
1.7.1 İyonik Sıvı Bazlı Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyonu (İS-DSSME)

2008 yılında orijinal fikirler yayımlanmasından sonra, çok sayıdaki klasik DSSME yöntemine başarılı alternatif olarak İS-DLLME yöntemi önerilmiştir. İS-DSSME yöntemini dört ana kategoriye ayırmak mümkündür:

- Geleneksel İS-DSSME (sulu örnek ihtiva eden analitler, iyonik sıvı ekstraksiyon çözücü ve dispersif çözücü)
- Sıcaklık kontrollü İS-DSSME
- Ultrason destekli, mikrodalga destekli ya da vorteks destekli İS-DSSME ve
- İn-sitü İS-DSSME

1.7.1.1 Geleneksel İS-DSSME

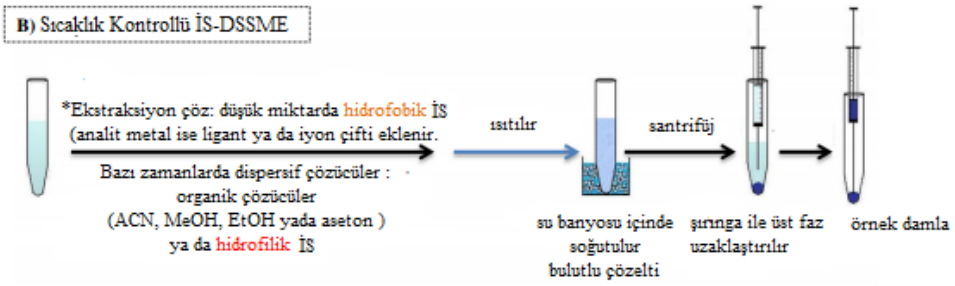
Geleneksel İS-DSSME yönteminde, Şekil 1.3' de de görüldüğü gibi analitlerin bulunduğu sulu örnek ile İS ekstraksiyon çözücü ve dispersif çözücü olarak kullanıldığı basit karışıma dayanır. Karışım elle karıştırılabilir ve analitler İS mikrodamlacıklarında zenginleştirilir ve daha sonra santrifüj ile ayrılır. Herhangi bir ekstra adıma ihtiyaç yoktur çünkü oldukça basit bir yöntemdir. Dispersif çözücü olarak genelde metanol kullanılmıştır. İS-DSSME yönteme genel olarak DSSME yöntemine benzer, ekstraksiyon çözücüsünde organik çözücü yerine İS kullanılır. Bu yöntemin ilk Liu ve arkadaşları tarafından (Liu, Zhao, Zhu, Gao ve Zhou, 2009), su içinde heterosiklik insektisitlerin analizi için tanımlanmıştır. Dispersif çözücü olarak metanol, ekstraksiyon çözücü olarak iyonik sıvı olan 1-hekzil-3-metilimidazolyum-hekzaflorafosfat kullanılmıştır (Trujillo-Rodríguez ve diğer, 2013).



Şekil 1.3 Geleneksel İS-DSSME yönteminin şematik gösterimi

1.7.1.2 Sıcaklık Kontrollü İS-DSSME

Sıcaklık kontrollü İS-DSSME yönteminde, analitleri içeren sulu örnek çözelti içerisinde mikro damlacıkların yeterli oluşumunu sağlamak için ekstraksiyon çözücü olarak kullanılan hidrofobik iyonik sıvının ısıtılması gerekir. İS' ların çözünürlüğü belirli sıcaklık ile artar, bu nedenle ısıtma İS' nın sulu çözelti içinde dağılmasını sağlar. Yönteme göre ayrıca, ekstrakte edilen analitleri içerin İS mikro damlacıkların çökmesini kolaylaştırmak için çözeltinin soğutulması gerekir. Bazı durumlarda, yöntem, metanol, etanol, asetonitril ya da aseton gibi dispersif çözücülerin kullanımı gerektirebilir. Şekilde 1.4' de yöntem görülmektedir. Bu yöntemde çözelti bulanıklığı, dispersif çözücü kullanılmadığı sürece soğutma aşamasında görülür.



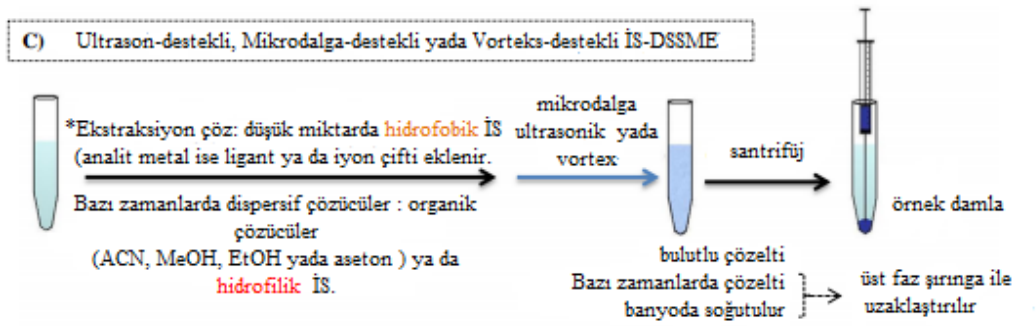
Şekil 1.4 Sıcaklık kontrollü İS-DSSME yönteminin şematik gösterimi

Dispersif çözücüsü kullanılmadığında, sıcaklık kontrollü İS-DSSME uygulamalarında damlacık hacmi nadiren kaydedilir, çünkü, soğutma işleminden sonra dondurulmuş damlacığın hacmini ölçmek kolay değildir.

Zhou ve arkadaşları (Zhou, Bai, Xie ve Xiao, 2008) organik bileşiklerin tayininde bu teknikle ilk olarak kullanmışlardır. Bağdadi ve Shemirani (Baghdadi ve Shemirani, 2008) ise, metallerin belirlenmesinde sıcaklık kontrollü DSSME yöntemini kullanmışlardır.

1.7.1.3 Ultrason-destekli, Mikrodalga-destekli yada Vorteks-destekli İS-DSSME

Bu İS-DLLME yöntemlerinde, sulu çözelti içine, hidrofobik iyonik sıvının dağılmasını kolaylaştırmak için ultrasonik, mikrodalga, vorteks, ya da herhangi bir ilave kuvvetli karıştırma yapılmaktadır ve böylece mikro damlacıkların yeterli oluşumu sağlanmaktadır. Vorteks, mikrodalga ya da ultrasonik uygulama, ekstraksiyon tüpünde sıcaklığın artmasına neden olur. Bazı durumlarda, dispersiyon çözücü kinetiğini artırmak için gereklidir ve bir organik çözücü, bir yüzey aktif madde veya bir hidrofilik İS de olabilir. Bu yöntemlerde, ekstraksiyon süresi 7 dakikadan azdır ancak soğutma işlemi gerekirse biraz daha uzun olabilir. Ancak, yine de ekstraksiyon süresi hala bu yöntemde kısadır (Şekil 1.5).

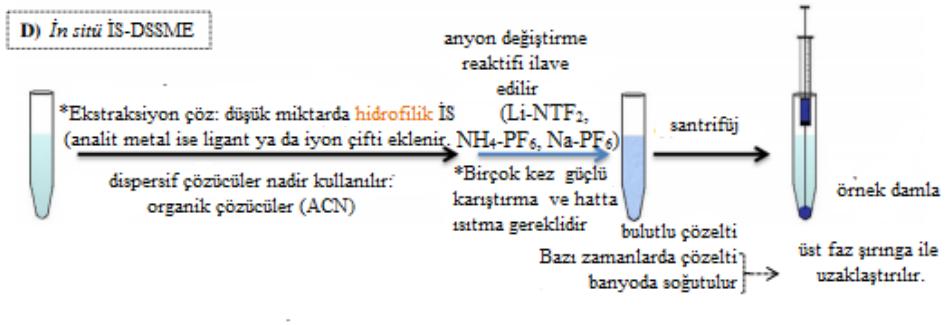


Şekil 1.5 Ultrason-destekli, Mikrodalga-destekli ya da Vorteks-destekli İS-DSSME yönteminin şematik gösterimi

İS-DSSME ile kombinasyon halinde ultrason kullanımının ilk Zhou ve arkadaşları (Zhou, Zhang ve Xiao, 2009) tarafından, su içinde aromatik aminler belirlenmesi için, hemen hemen eş zamanlı olarak ve Li ve arkadaşları (Li, Cai, Hu, Chen ve Liu, 2009) tarafından su içinde kadmiyum belirlenmesi çalışmalarında kullanılmıştır.

1.7.1.4 İn-situ İS-DSSME

İn-situ İS-DSSME yönteminde, iyonik sıvılara dayanan mikroekstraksiyon için in-situ çözücü oluşumu, analitlerin bulunduğu sulu çözelti içinde ekstraksiyon çözücüsü olarak hidrofilik İS kullanımına dayanır. Bir anyon değiştirici reaktifi, ilave edilir, metastesis reaksiyonu ile hidrofilik İS, hidrofobik İS' ye dönüşerek içinde analitleri zenginleştirir. Yöntem genellikle metastesis (çifte bozunma) reaksiyonu kinetiği geliştirmek için vorteks, mikrodalga, ultrasonik ya da çalkalama kullanımını gerektirir. Yöntem şekilde de görülmektedir (Şekil 1.6). Anyon değişim reaktifi ile hidrofilik İS molar oranları genelde 1:1 olacak şekilde ilave edilirler.



Şekil 1.6 Yönteminin şematik gösterimi *İn-situ*-İS-DSSME

Yöntemi ilk geliştirenler (Baghdadi ve Shemirani, 2009), salin çözeltilerinde Hg (II) belirlemişlerdir. Anyon değişim reaktifi olarak sodyum hekzaflorofosfat ve hidrofilik İS olarak 1-hekzil-3-metilimidazolyum-tetrafloroborat kullanılmıştır. Tuzlu sulu numuneler söz konusu olduğunda bu yöntem özellikle iyi bir performans (Trujillo-Rodríguez ve diğer, 2013).

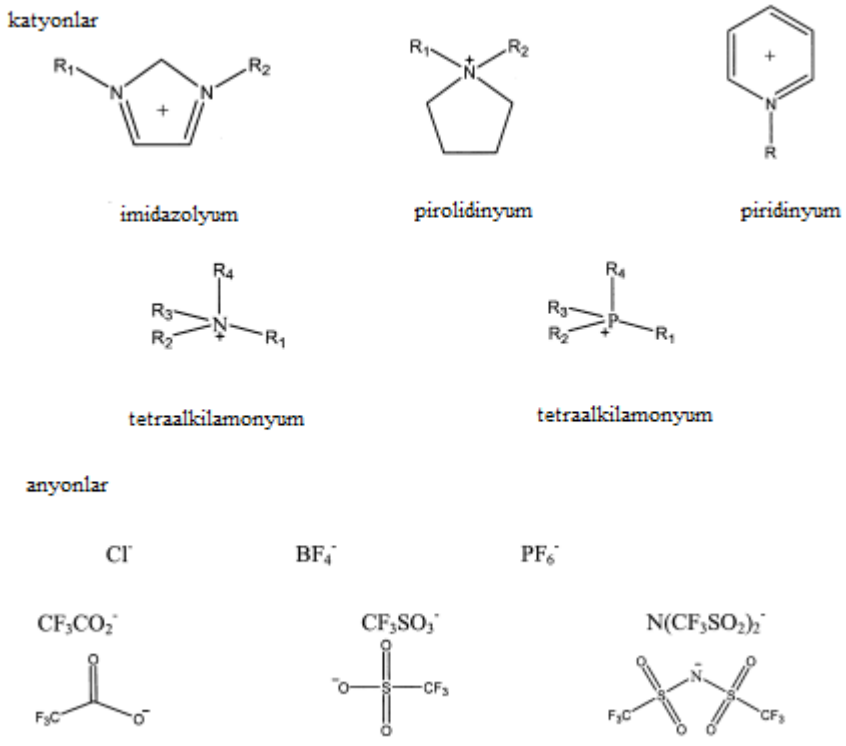
1.8 İyonik Sıvılar

Son zamanlarda, oda sıcaklığındaki iyonik sıvılar, çeşitli anyonlar ve organik katyonların birleşiminden oluşan iyonik ortam olup, uçuculuğun az olması, genellikle iyi termal stabilitede, elektriksel iletkenlik, iyi solvatasyon özelliklerinden dolayı oldukça dikkat çekmiştir ve daha çok ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır.

Düşük uçuculuk ve kendine özgü solvatlayıcı özellikleri, ayırma tekniklerinde daha iyi bir şekilde kullanılmak üzere değerlendirilmektedir (Hou, Guan ve Di, 2011).

Oda sıcaklığındaki iyonik sıvılar (OİS), iyonik sıvıların bir alt sınıfıdır. Bu sıvıların kendine has özellikleri, metalik erimiş tuzlar gibi tamamen iyonlardan oluştuğu gerçeğidir, örneğin sodyum klorür (NaCI).

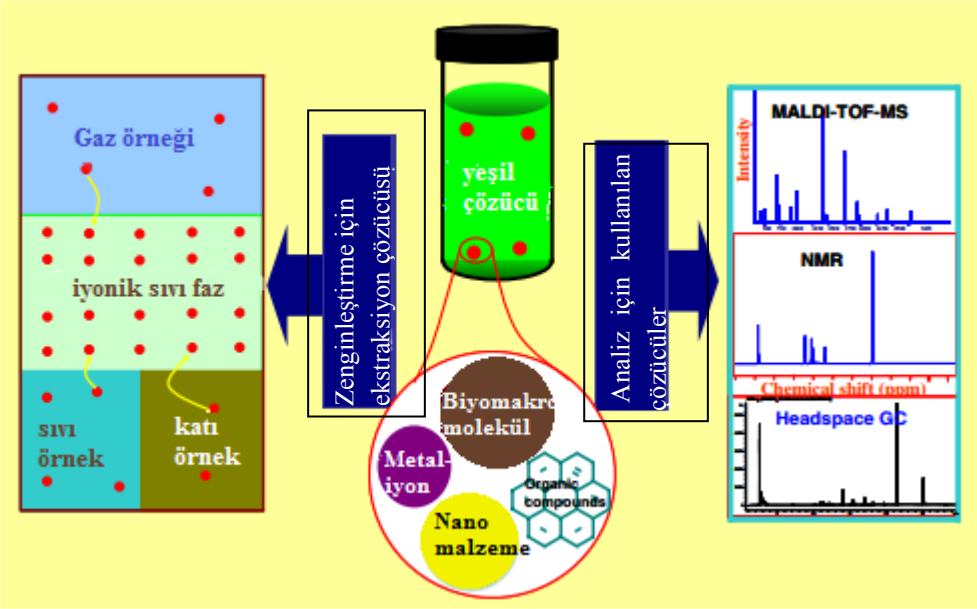
Birçok organik katyonlar (imidazolyum, piridinyum, pirolidinyum, fosfonyum, amonyum) vardır. Anyonlar inorganik olabilir, Cl^-, PF_6^-, BF_4^- de içerebilir ve OİS' de genelde en fazla organik iyonlar bulunmaktadır, örneğin, triflorometilsülfonat $[CF_3SO_3]^-$, bis[(triflorometil)sülfonil]imid $[(CF_3SO_2)_2N]^-$ (kısaltması; NTF_2), trifluoroethanoate $[CF_3CO_2]^-$, vb. sıklıkla kullanılan anyon ve katyonlar Şekil 1.7' de gösterilmiştir. İS'lerin önemli bir özelliği de, değişen anyon ve ya katyonların, fiziksel ve kimyasal özelliklerini önemli derecede etkileyebilir olmasıdır (Sun ve Armstrong, 2010).



Şekil 1.7 İS' lerde yaygın olarak kullanılan anyon ve katyonlar

1982 yılında ilk kez Wilkes ve arkadaşları tarafından dialkilimidazoltum kloroalümünat bileşiğinden oluşan iyonik sıvıyı sentezlemiştir (Wilkes, Levisky, Pflug, Hussey ve Scheffler, 1982).

İyonik sıvıların kendilerine has özelliklerinden dolayı kullanım alanları çok fazladır (Şekil 1.8). Elektriksel iletkenlik özelliğinden dolayı kılcal elektrofez ve elektrokimyasal tekniklerde elektrolit olarak kullanılırlar. Sulu ve susuz ortamlardaki çözünürlüklerinden ve çözünürlük özelliklerinden dolayı analitlerin önderiştirilmesi ve ekstraksiyonlarında önemli rol oynarlar. İyonik sıvının anyon ve katyon grupları ile analitlerin elektrostatik etkileşimleri seçiciliği etkiler. İyonik sıvılardaki farklı sübstitiye grupların varlığı spesifik seçiciliği sağlar, polar gruplar polar analitler ile dipolar etkileşimi seçici kılar, uzun alifatik alkil zincirleri apolar analitler ile dispersif etkileşimleri sağlar ve kiral özellik içerenler izomer analizine de izin verirler (García-Alvarez-Coque, M. C., Ruiz-Angel, M. J., Berthod, A. ve Carda-Broch, 2015).

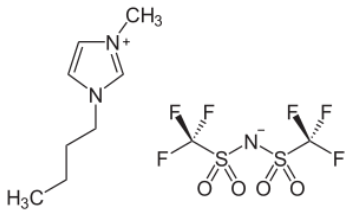
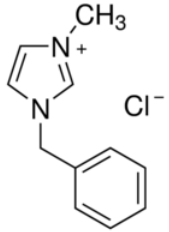


Şekil 1.8 İS' lerin başlıca uygulamalarının şematik diyagramı

İyonik sıvılar, ekstraksiyon çözücü görevi (Visser, Swatloski, Reichert, Mayton, Sheff, Wierzbicki ve diğer, 2001) dışında, elektroanalitik uygulamalarda elektrot olarak (Wang, Zakeeruddin, Moser ve Grätzel, 2003), gaz kromatografide sabit faz

(Armstrong, He ve Liu, 1999), kütle spektrometresinde matriks olarak kullanılması (Armstrong, Zhang, He ve Gross, 2001) gibi birçok kullanım alanları vardır. Yöntemlerde kullanılan iyonik sıvılar ve özellikleri Tablo 1.6' da verilmiştir.

Tablo 1.6 Çalışmada kullanılan iyonik sıvıların yapıları ve özellikleri

İyonik Sıvı (İS)	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Erime Noktası	Yoğunluğu (g/cm^3)	Viskozitesi (25˚C) (Pa*s)	Sudaki Çözünürlüğü ($g\ L^{-1}$)	Referans
 $[C_6MIM][(CF_3SO_2)_2N]$ 1-Hegzil-3-metil imidazolyım bis(triflloro metil sülfonil)imid	447	189.15	1.33	0.68	0.34	Trtić-Petrović ve Dimitrijević, 2014).
 $[C_{11}H_{13}ClN_2]$ 1-Benzil-3-metil-imidazolym klorür	208,69	197,35	1,08	-	-	Zhang, Sun, He, Lu ve Zhang, 2006)

1.9 Literatür Taraması

Tsai ve arkadaşları, dispersif katı faz mikroekstraksiyon (KFME) yöntemi ile TS, OTS, KTS ve DOS analiz etmişlerdir. Farklı silis bazlı ve polimerik sorbentler kullanılmıştır. Primer amin, sekonder amin yada karbonil gruplarıyla fonksiyonize edilmiş silis bazlı sorbentler, polimer sorbentlerden daha yüksek kapasite göstermişler. Dispersif KFME yöntemine göre, asetonitril ve tuz etkisi ile ekstraksiyon, dispersif silika bazlı primer ve sekonder amin sorbentler ile tetrasiklinlerin bir kısmı adsorbe olur, desorpsiyon çözeltisinin düşük miktarı ile desorbe olur ve diyot-array dedektörü ile HPLC' de analiz edilmiştir. Ortalama geri kazanımlar % 97,1 ile 104,1 arasında değişmektedir. TS kalibrasyon eğrileri 0,997 üzerinde bulunmuştur. Su ve süt örneklerindeki TC' lerin gözlenebilme sınırları (LOD) sırasıyla; 0,7 – 3,5 ng mL^{-1} ve 7,9 – 35,3 ng g^{-1} olarak değişmektedir (Tsai, Huang, Huang, Hsue & Chuang, 2009).

Shariati ve arkadaşları, sığır sütü, insan plazması ve su örneklerinde yüksek hidrofilik tetrasiklin antibiyotikleri olan TS, OTS ve DOS' in eser miktarının tayini için HPLC ile tayin öncesi, üç fazlı sıvı faz mikroekstraksiyonu geliştirmişlerdir. 1-oktanol çözeltisi, gözenekli polipropilen oyuk fiberin gözeneklerinde immobilize edilmiştir. Sulu alıcı faz, oyuklu fiber lümen içinde bulunur ve fiber sulu fazın içine transfer edilir. Ekstraksiyondan sonra alıcı faz doğrudan HPLC' ye enjekte edilir. Yüksek ekstraksiyon verimliliğini elde etmek için, sıvı faz mikroekstraksiyonu etkileyen parametreler değerlendirilip optimize edilmiştir. Optimum koşullar altında, kalibrasyon eğrileri TS ve OTS için 0,5-1000 g L^{-1} aralığı içinde lineer olduğu iyi doğrusallık ($r^2 > 0.995$) ile DOS 5-1000 g L^{-1} aralığındadır (Shariati, Yamini & Esrafili, 2009).

Karageorgou ve arkadaşları, ultrason destekli matriks katı faz dispersif ekstraksiyon, seçici izolasyonu ve sütteki TS' lerin (OTS, TS, epi-KTS, KTS ve DOS) clean-up' ı uygulanmıştır. Geri kazanımları % 82,0 ile % 108 arasında değişmektedir (Karageorgou, Armeni, Moschou, & Samanidou, 2014)

Yang ve arkadaşları, iyonik sıvı-anyonik yüzey aktif maddeye dayalı sulu iki-faz ekstraksiyonu geliştirmiş ve baldaki tetrasiklin, oksitetrasiklin ve kloramfenikol ekstraksiyonuna uygulamıştır. Bal örneği EDTA çözeltisi ile karıştırılmıştır. Sodyum dodesil sülfat, iyonik sıvı olarak 1-oktil-3-metil-imidazolyum bromür ve sodyum klorür karışımı ilave edilmiştir. Elde edilen karışım ultrasonikte çalkalanmıştır ve santrifüj edildikten sonra, sulu iki fazlı sistem oluşmuş ve analitler, üst faz içine ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon verimliliğini etkileyen; iyonik sıvı hacmi, tuz türü ve miktarı, örnek pH değeri, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık gibi parametreler incelenmiştir. Mevcut yöntem gerçek bal örneklerin analizine uygulandığında, analitlerin geri kazanımları %85,5 ile %110,9 arasında değişmiştir (Yang, Zhang, Yu, Liu, Lei, Li ve diğer 2014).

Hou ve arkadaşları, bu çalışmayla, DSSME ile ultra-HPLC- ultraviyole dedektör yöntemi ile sulu örnekteki eser miktarda tetrasiklinlerin (4-Epi-TS,4-epi-KTS, DOS, KTS, OTS, TS, 4-epi-anhydrotetrasiklin ve anhydrotetrasiklin) analizi ve zenginleştirilmesi geliştirilmiştir. İyonik sıvı olarak, 1-bütil-3-metilimidazolium hekzafloro fosfat kullanılmıştır. La(III), TS' lerle hidrofobik kompleks bileşik oluşturmak üzere şelat maddesi olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon verimini etkileyen parametreler optimize edilmiştir. Optimum koşullar altında, LOD ve tayin sınrı (LOQ) değerleri sırasıyla 0,031–0,079 ve 0,10–0,26 μg L^{-1} aralığındadır. Nehir suyu, balık havuzu suyu ve domuz pislikli suyun içindeki sekiz hedef bileşiklerin geri kazanımları sırasıyla % 62,6-96,3, 58,9-94,5, 55,1-86,1 aralığında elde edilmiştir (Hou, Guan & Di, 2011).

Song ve arkadaşları, İS-DSSME ile birlikte HPLC yöntemini yumurtadaki TS' in antibiyotiklerin analizi için geliştirmişlerdir. İyonik sıvı olarak 1-butil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat kullanmışlardır. Ekstraksiyon verimliliğini arttırmak için birçok parametre incelenmiş ve optimize edilmiştir. Yumurta için LOD değerleri 2– 12 ng g^{-1} arasındadır ve TS içermeyen yumurta örneğine belli miktarda standart TS eklendiğinde geri kazanım yüzde değerleri % 58,6-%95,3 aralığında bulunmuştur (Song ve diğer, 2014).

1.10 Çalışmanın Amacı

Çeşitli gıda ürünlerinde antibiyotik kalıntısı tayini önemlidir ve yaygın olarak çalışılmaktadır. Düşük miktarlarından dolayı, TS antibiyotiklerinin analiz öncesi zenginleştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, gıda ürünlerinde (süt, bal ve yumurta) bulunması olası bazı TS antibiyotik kalıntılarının (MNS, OTS, TS, KTS, MTS, DOS) HPLC ile tayin öncesi özütlenmeleri için geleneksel-İS-DSSME ve *in*-sitü-İS-DSSME yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın aşamaları aşağıda sıralanmıştır:

1. TS antibiyotiklerinin HPLC' de kromatografik davranışlarının incelenmesi
2. İS-DSSME yöntemin optimizasyonu (pH, tuz türü, ekstraksiyon çözücüsü hacmi, dispersif çözücü türü, dispersif çözücü miktarı, ekstraksiyon süresi, santrifüj süresi) ve *in-sitü*-İS-DSSME yönteminin optimizasyonu (NH_4PF_6 tuz çözeltisinin hacimi, denge süresi, santrifüj süresi, iyonik sıvı/tuz hacim oranları)
3. Analitik parametrelerin belirlenmesi
4. Geliştirilen yöntemlerin gerçek örneklere uygulanması (süt, bal ve yumurta)

BÖLÜM İKİ
MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Reaktifler

Tetrasiklin hidroklorür, klortetrasiklin hidroklorür (% ≈80), oksitetrasiklin hidroklorür (% ≥95), minosiklin hidroklorür, metasiklin hidroklorür (% 99,2) ve doksisiklin hiklat (% ≥ 98) standartları AppliChem, Fluka ve Sigma firmalarından temin edilmiştir. İyonik sıvı olarak 1-hegzil-3-metilimidazolyım bis(triflorometil sülfonil)imid (*h*-MIM-NTF_2)/([C_6MIM][$(CF_3SO_2)_2N$], %98,0), 1-benzil-3-metil imidazolyum klorür (BMIM-CI)/([$C_{11}H_{13}ClN_2$], %97,0) Aldrich ve Tokyo Chemical Industry firmalarından satın alınmıştır.

Sodyum klorür (% 99,0), ($La(NO_3)_3.6H_2O$, % ≥ 99,0) sodyum dodesil sülfat ($C_{12}H_{25}NaO_4S$,% ≥ 95,0), sodyum hidroksit, amonyum hekzaflorofosfat tuzları Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, Fluka, J.T.Baker ve Alfa Aesar firmalarından temin edilmiştir.

Çözücü olarak, metanol (MeOH) (CH_3OH, % ≥ 99,9), asetonitril (CH_3CN (ACN) % ≥99,0), aseton (C_3H_6O, % ≥99,0), trifloro asetik asit (TFA) ($C_2HF_3O_2$) HPLC analitik saflıkta olup Merck, Sigma-Aldrich veya Fluka firmalarından temin edilmiştir.

2.2 Standart Çözeltilerin ve Tamponların Hazırlanışı

Çalışılan TS antibiyotiklerinin ana stok standart çözeltileri (1000 mg L^{-1}) metanol içerisinde aylık hazırlanmıştır. Ana stok standart çözeltiler -18˚C'de saklanmıştır. Ara stok çözeltiler (100 mg L^{-1}) MeOH' de haftalık olarak hazırlanmıştır. Çalışma çözeltileri ise ara stok çözeltinin ultra saf su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Ultra saf su, Mili-Q sistemi (Milipore) ile sağlanmıştır. Tampon olarak kullanılan 0,01 mol L^{-1} trifloro asetik asit (TFA) çözeltisi 500 mL hacimde hazırlanmıştır. Tampon çözeltisinin pH' sı 5 mol L^{-1} NaOH ile pH 3' e ayarlanmıştır.

Yerinde*(in-situ*-İS-DSSME yönteminde, 0,4 g BMIM-CI iyonik sıvısı 1 mL suda çözülerek ve 1,04 g NH_4PF_6 tuzu 10 mL suda çözülerek gerekli çözeltiler hazırlanmıştır.

2.3 Cihazlar

Tetrasiklinlerin kromatografik analizi için Dionex Ultimate 3000 model Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda Heidolph Reaxtop marka vorteks, Bandelin Sonorex marka ultrasonik banyo, Buchi marka evaporatör, Selecta marka orbital çalkalayıcı ve Nüve marka santrifüj kullanılmıştır. pH çalışmaları İnolab pH model pH metre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.4 Tetrasiklinlerin HPLC ile Analizi

Tetrasiklinlerin analizi için kullanılan HPLC kromatografik analiz koşulları Tablo 2.1 de özetlenmiştir. Kullanılan C18 kolonlarının boyutları 150 mm x 4,6 mm ve 50 mm x 4,6 mm olup partikül boyutları 3 μm' dir. TS bileşikleri sırasıyla MNS, OTS, TS, KTS, META ve DOS, DAD dedektöründe 360 nm' de analiz edilmişlerdir. Hareketli fazın uygulanan gradienti (A) ACN ve (B) 0,01 M TFA (pH 3)' den oluşmaktadır. Gradiyent % 20 (A) ile başlatılmıştır ve 15 dk sonra % 30' a yükseltecek şekilde gradiyente devam edilmiş ve sonra 2 dk içinde % 20' ye geri indirilmiş, toplam 17 dk süren gradiyent sistemi ile çalışılmıştır.



Şekil 2.1 Dionex Ultimate 3000 model HPLC cihazı

Tablo 2.1 HPLC cihaz parametreleri ve analiz koşulları

Cihaz parametreleri ve analiz koşulları	
HPLC Cihazı	Dionex Ultimate 3000 model HPLC
Kolon Sıcaklığı	25˚C
Kolon	C18 analitik Kolon
Enjektör	Otomatik enjektör
Dedektör	Fotodiyot array dedektör (DAD)
Mobil faz	TFA (0,01 M, pH:3) /ACN (80/20 Gradiyent sistem)
Akış hızı	1mL/dk
Enjeksiyon hacmi	10 µL

2.5 Gerçek Örnekler

Geliştirilen İS-DSSME yönteminin çeşitleri olan geleneksel İS-DSSME ve *in-sitü*-DSSME yöntemlerinin uygulanabilirliğini göstermek için süt, bal ve yumurta ile çalışılmıştır. Gerçek örnekler İzmir'deki yerel marketlerden satın alınmıştır.

2.5.1 Gerçek Örneklerin Analize Hazırlanması

2.5.1.1 Süt

10 g homojen süt örneği 15 mL' lik plastik santrifüj tüpüne alınmıştır. Sonra standart TS antibiyotik karışımdan eklenmiş 1,5 dakika vortekslenmiş ve 1 saat buzdolabında bekletilmiştir. Üzerine 1 mL suda hazırlanmış % 15 (w/v) trikloroasetik asit eklenip karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 3000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek proteini çöktürülmüştür. Üst faz 0,45' lik filtreden geçirilmiştir ve analize kadar 4˚C' de buzdolabında saklanmıştır (Han, Wang, Yu, Yan ve Xie, 2011). Optimize edilen İS-DSSME yöntemleriyle ekleme yapılan ve yapılmayan süt örneklerinin analizleri yapılmıştır.

2.5.1.2 Bal

Bal örneği 1 g alınıp standart TS antibiyotik karışımdan eklenmiş, 5 mL su ile çözülerek homojenize edildikten sonra 1 saat cam viyallerde balık yardımı ile karıştırılmıştır. Daha sonra 0,45' lik fitreden geçirildi ve analize kadar 4˚C' de buzdolabında saklandı (Chen, Chen, Ying, Huang ve Liao, 2009). Optimize edilen İS-DSSME yöntemleriyle ekleme yapılan ve yapılmayan bal örneklerinin analizleri yapılmıştır.

2.5.1.3 Yumurta

2 g yumurta örneği alınıp üzerine standart TS antibiyotik karışımı ve 2 mL su eklenerek 1 saat cam viyallerde karıştırılmıştır.. Arkasından karışıma ACN içinde hazırlanmış % 1 (v/v) asetik asitten 10 mL eklenerek, karışım 2 dk vortekste karıştırıldı ve 5 dk santrifüj ile protein çöktürüldü. Elde edilen yumurta fazı 0,45' lik filtreden geçirilerek protein uzaklaştırıldı, santrifüj tüpüne alındı ve ACN evaporatörde 40˚C' de uçuruldu (Zhao, Li, Qiu, Wang, Yang ve Chen, 2014). Daha sonra pH' ı 3' e ayarlanmış su ile 5 mL' ye tamamlanmış (Song, Zhang, Zhang, Feng, Wanga, & Wang, 2014) ve buzdolabında analize kadar saklanmıştır.

Optimize edilen İS-DSSME yöntemleriyle ekleme yapılan ve yapılmayan gerçek örneklerin analizleri yapılmıştır.

2.6 Geleneksel İS-DSSME Yöntemi

TS antibiyotiklerini 250 μg L^{-1} derişimde içeren 5 mL sulu örnek çözeltisi 1 mol L^{-1} formik asit ile pH 4' e ayarlanmıştır. Daha sonra, ependorf tüplerinin içerisinde 50 μL *h*-MIM-NTF_2 ve 500 μL metanol vorteks yardımı ile karıştırılarak sulu örnek çözeltisine hızlıca eklenmiştir. Karışım 1,5 dk vortekste karıştırılıp, 8,5 dk çalkalayıcıda çalkalanmış ve bulutlanmış bir çözelti oluşmuştur. Son olarak, 10 dakika 4000 rpm' de bulutlanmış karışım santrifüj edilmiştir. Tetrasiklinleri içeren 45 μL' lik alt faz, mikropipet yardımıyla alınmış, 100 μL' ye metanol ile seyreltilmiş ve tetrasiklinler Bölüm 2.4' de belirtildiği şekilde HPLC' de analiz edilmiştir.

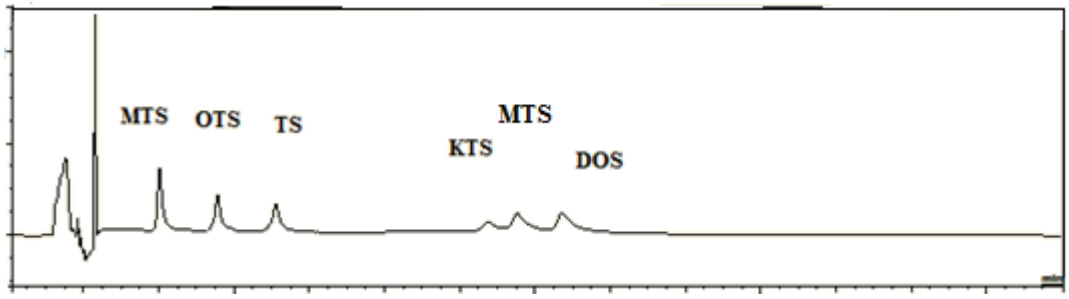
2.7 *İn-sitü*-İS-DSSME Yöntemi

TS antibiyotiklerini 250 μg L^{-1} derişimde içeren 5 mL sulu örnek çözeltisi 1 mol L^{-1} formik asit ile pH 3' e ayarlanmıştır. Sulu örnek çözeltisine 0,4 g/mL *benzil*-MIM-CI/su çözeltisinden 100 μL eklenmiş, daha sonra 0,104 g/mL NH_4PF_6 sulu çözeltisinden 300 μL eklenmiştir. Oluşan bulutlu çözelti orbital çalkalayıcıda 1 dk karıştırılıp 5 dk 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Analitleri içeren alt faz ACN ile yıkanarak mikropipet yardımıyla alınıp 100 μL' ye ACN ile seyreltilmiş ve tetrasiklinler Bölüm 2.4' de belirtildiği şekilde HPLC' de analiz edilmiştir.

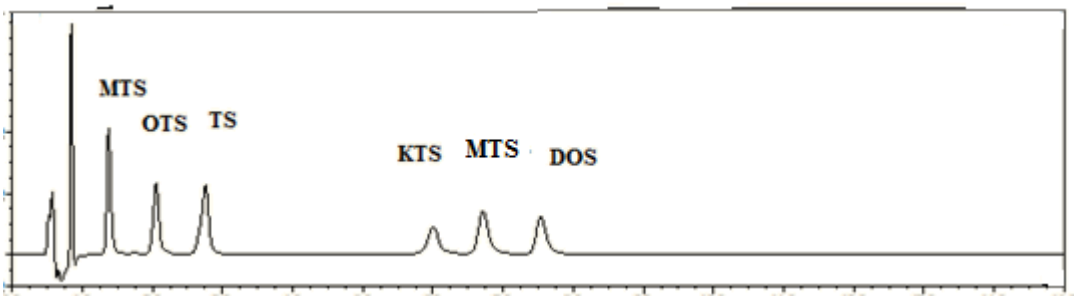
BÖLÜM ÜÇ
DEĞERLENDİRME

3.1 TS Antibiyotiklerinin HPLC ile Analizi

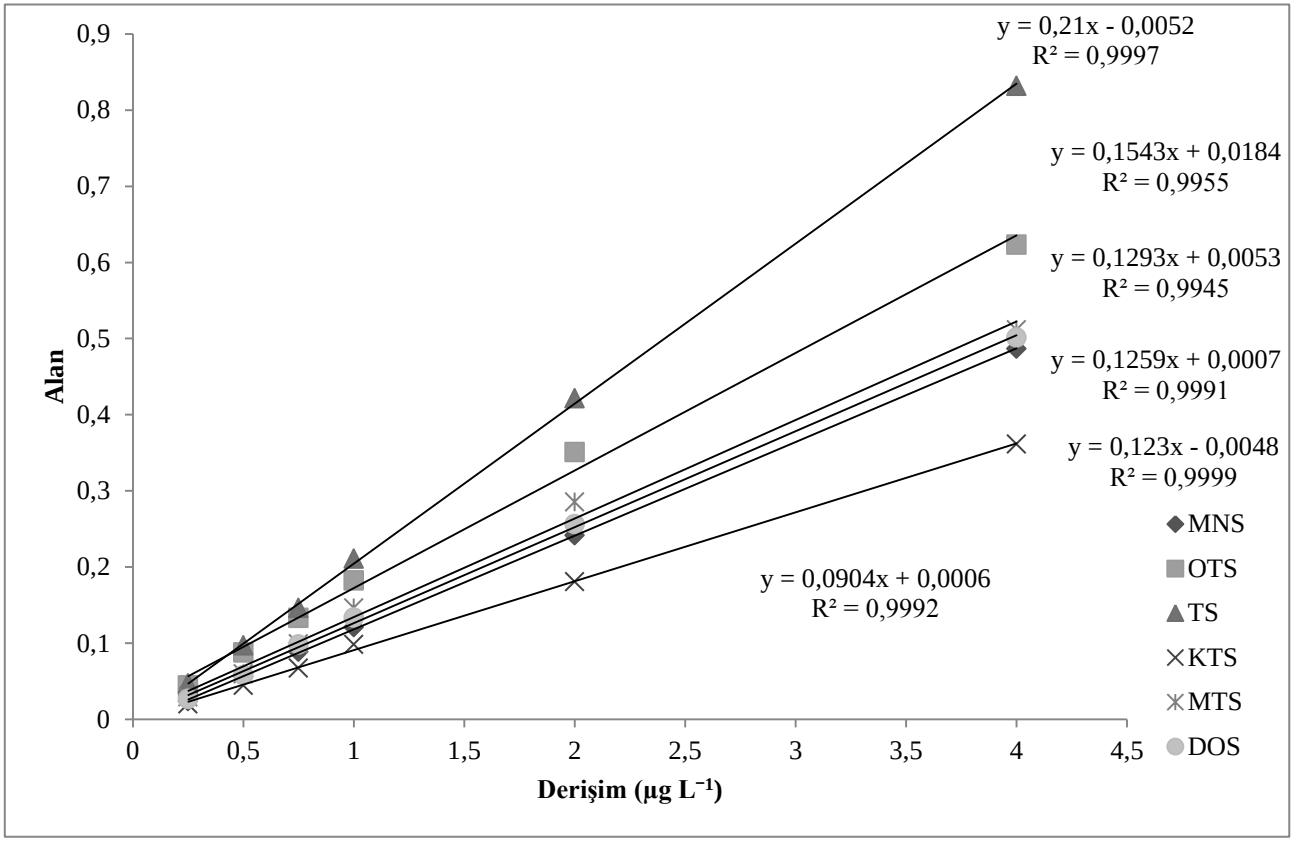
Çalışma boyunca iki çeşit HPLC kolonu ile çalışıldığı Bölüm 2.4' de belirtilmişti. Uzunluğu 150 mm olan HPLC kolonu ile yapılan çalışmada MTS, OTS, TS, KTS, META ve DOS antibiyotiklerinin alıkonma zamanları sırasıyla; 3,7, 5,4, 6,9, 12,5, 13,5, 15 dakika olarak belirlenmiştir. Uzunluğu 50 mm olan HPLC kolonu ile yapılan çalışmada MTS, OTS, TS, KTS, META ve DOS antibiyotiklerinin analizi boyunca alıkonma zamanları sırasıyla; 1,5, 2,0, 2,8, 6,0, 6,7 ve 7,5 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 3. 1 ve 3. 2). TS' lerin aletsel analitik parametreleri Tablo 3. 1 de verilmiştir. TS'lerin kalibrasyon doğruları Şekil 3.3de verilmiştir.



Şekil 3.1 TS karışımının 5 µg mL^{-1} standart derişimdeki kromatogramı (150 mm lik HPLC kolonu)



Şekil 3.2 TS karışımının 5 µg mL^{-1} standart derişimdeki kromatogramı (50 mm' lik HPLC kolonu)



Şekil 3.3 TS bileşiklerinin aletsel kalibrasyon doğruları

Tablo 3.1 TS bileşiklerinin aletsel analitik parametreleri

Analitler	Çalışma Aralığı (mg L^{-1})	Eğim± SD[a]	Kesme noktası ±SD[a]	$S_{y/x}$[b]	R[c]
MNS	0,25-4	0,1230±0,0006	-0,0048±0,0012	0,0019	0,999
OTS	0,25-4	0,1543±0,0052	0,0184±0,0099	0,0162	0,997
TS	0,25-4	0,2100±0,0019	-0,0052±0,0036	0,0059	0,999
KTS	0,25-4	0,0904±0,0013	0,0006±0,0025	0,0040	0,999
MTS	0,25-4	0,1293±0,0048	0,0053±0,0091	0,0150	0,997
DOS	0,25-4	0,1259±0,0019	0,0007±0,0037	0,0060	0,999

[a] Kalibrasyon seviyeleri için eğim ve kesme noktaları ve standart sapmaları

[b] Regresyon standart sapması.

[c] Korelasyon Katsayısı

3.2 İS-DSSME Yöntemlerinin Optimizasyonu

3.2.1 Geleneksel İS-DSSME Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları

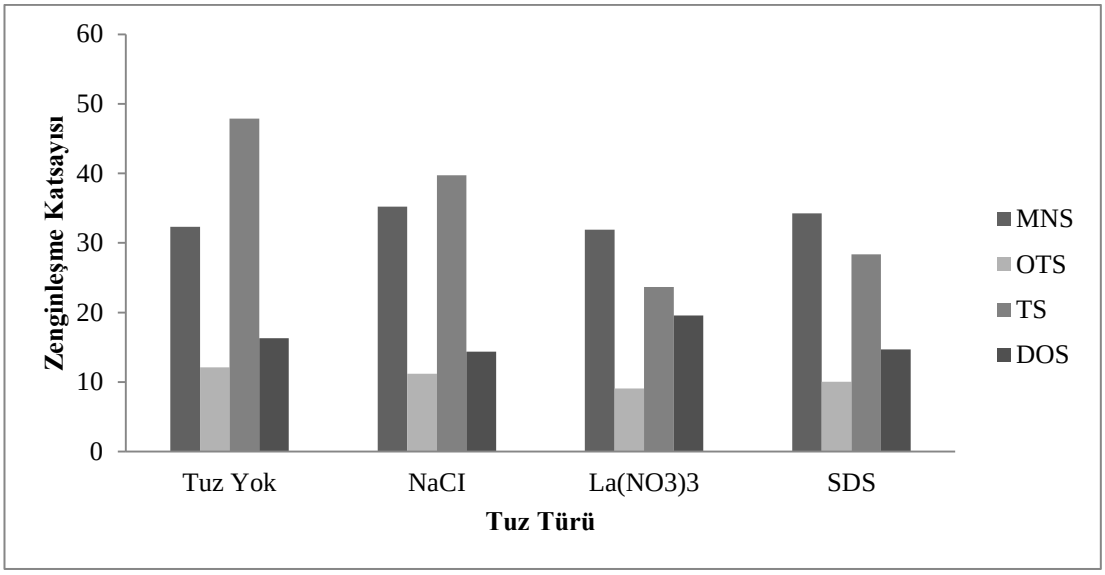
TS antibiyotiklerini içeren sulu örnek çözeltisi içerisine *h*-MIM-NTF_2 ve metanol vorteks yardımı ile karıştırılarak hızlıca eklenmiştir. Karışım vortekste karıştırılıp, orbital çalkalayıcıda çalkalanmış ve bulutlanmış bir çözelti oluşmuştur. Son olarak, bulutlanmış karışım santrifüj edilmiştir. TS' leri içeren alt faz metanol ile seyreltilmiş ve TS' ler UHPLC' de analiz edilmiştir.

Yöntemi optimize etmek için çalışılan parametreler aşağıda verilmiştir:

- pH (3, 3,5, 4, 5)
- tuz etkisi ($La(NO_3)_3$, NaCI, SDS)
- ekstraksiyon çözücüsü hacmi (*hekzil*-MIM-NTF_2 hacmi) (30, 50, 70 µL)
- dispersif çözücü türü (MeOH, ACN, aseton)
- dispersif çözücü miktarı (200, 400, 500, 750, 1000 µL)
- ekstraksiyon süresi (10, 15, 20 dakika)
- santrifüj süresi (3, 5, 10 dakika)

3.2.1.1 Tuz Etkisi

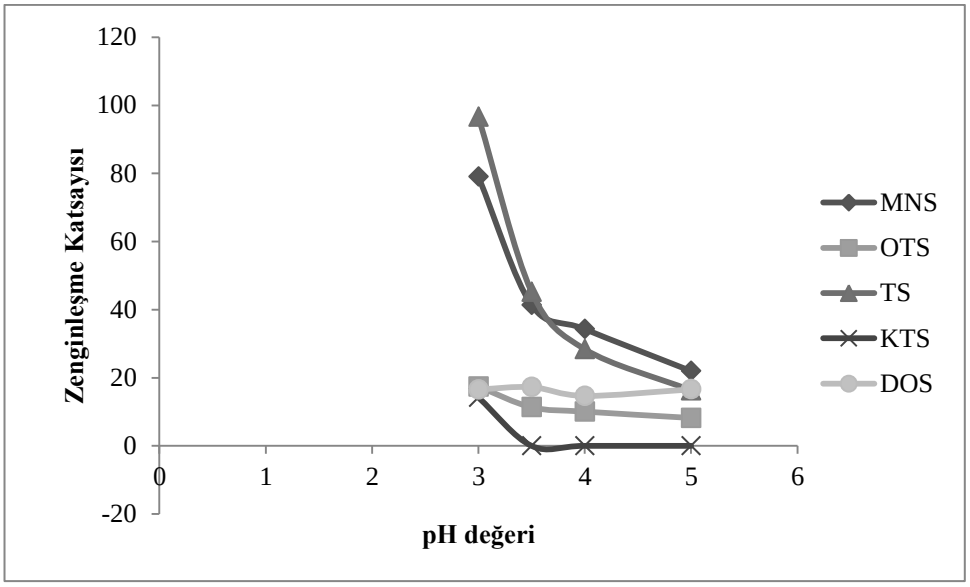
İyonik kuvvetin, İS' nın ekstraksiyon verimliliği üzerine etkisi vardır. Ancak iyonik kuvvet artışı ile ekstraksiyon verimliliğini arttırmak, sulu çözeltideki İS' nın çözünürlüğü azaltılabilir (Song, Zhang, Zhang, Feng, Wanga ve Wang, 2014). Bu çalışmada, üç farklı tuzun (SDS, NaCI, $La(NO_3)_3$) etkisi incelenmiştir. Çalışmada 10^{-3} M 250µL SDS; % 0,1 NaCI/Su 500mL; 0,4 10^{-3} M 50µL $La(NO_3)_3$ kullanılmıştır. Ancak Şekil 3. 4' de görüldüğü gibi ekstraksiyon verimi, tuz ilavesi ile genelde azaldığı için İS-DSSME yöntemlerin ikisinde de kullanılmamıştır.



Şekil 3.4 Geleneksel İS-DSSME yönteminde tuz etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; tuz miktarı [250µL 10^{-3} M SDS; % 0,1 NaCI/Su 500mL; 50µL $0{,}4x10^{-3}$ M $La(NO_3)_3$]; pH=4; 50µL *hegzil*-MIM-NTF_2; 500µL MeOH ; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama; 10 dk 4000 rpm santrifüj).

3.2.1.2 pH Etkisi

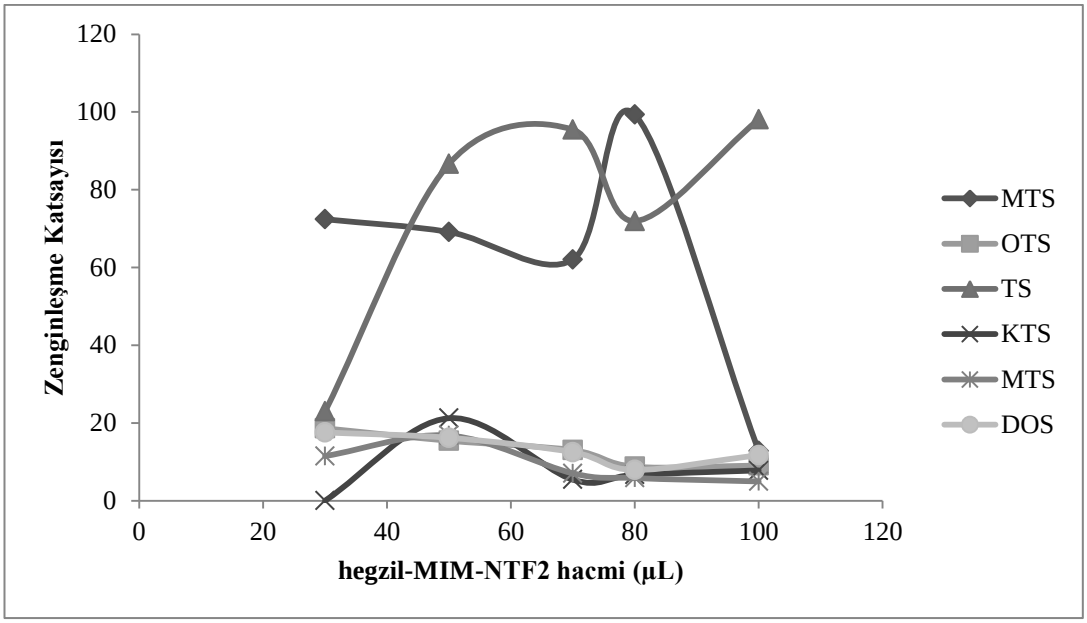
Ekstaksiyon verimi, analitleri içeren sulu çözeltinin pH değerinin ayarlanması ile değişebilir. Bu çalışmada, TS karışımını içeren sulu çözeltilerin pH değerleri 1 mol L^{-1} formik asit ile 3 - 5 değerleri arasında ayarlanmıştır. TS' lerin sadece asidik koşullar altında İS' ya geçtiği görülmüştür. Şekil 3. 5'te görüldüğü gibi en iyi sonuç pH 3' de gözlenmiştir Ekstraksiyon sonrası her pH değerine karşılık zenginleşme katsayısıları hesaplanmıştır. TS' lerin asitlik sabitleri C3'deki hidroksit deprotasyonu ile ilişkilidir ve tetrasiklin bileşiklerinde tüm pH aralığında yükler lokalize olur ve sadece pH 3 - 9 arası melez iyonlar olarak nötr hale geçerler. TS' ler için optimum pH 3 bulunduğu için, bu pH değerinde ekstraksiyon çalışmalarına devam edilmiştir.



Şekil 3.5 Geleneksel İS-DSSME yönteminde pH etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; 50µL *hegzil*-MIM-NTF_2; 500µL MeOH ; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama; 10 dk 4000 rpm santrifüj).

3.2.1.3 İyonik Sıvı Hacmi

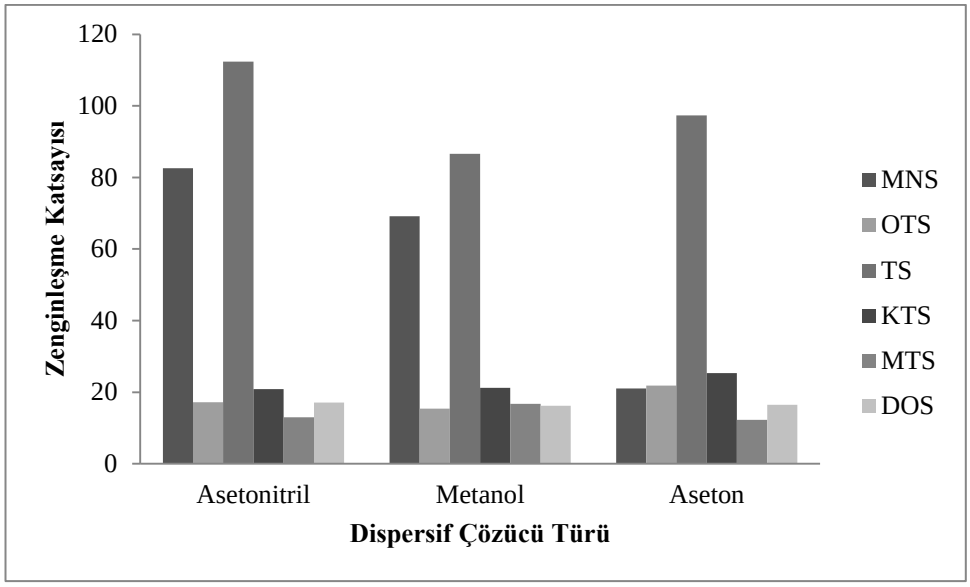
İyonik sıvı hacmi ekstraksiyon verimliliğini etkilemektedir. DSSME yönteminde kullanılacak olan ekstraksiyon çözücüsünün sudan daha fazla yoğun olması, suda çözünmemesi analitin çözünürlüğünün yüksek olması gerekmektedir. Bu çalışmada, ekstraksiyon çözücüsü olarak *hegzil*-MIM-NTF_2 kullanılmıştır. Şekil 3. 6' da görüldüğü gibi, İS hacmi arttıkça ekstraksiyon verimliliği artmıştır ancak kromatogramlarda yayılmalar arttığı görülmüştür. Bu nedenle, optimum İS hacmi olarak 50 µL kabul edilmiştir ve sonraki ekstraksiyon çalışmalarında İS hacmi 50 µL ile devam edilmiştir.



Şekil 3.6 Geleneksel İS-DSSME yönteminde iyonik sıvı hacminin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 500µL MeOH ; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama; 10 dk 4000 rpm santrifüj).

3.2.1.4 Dispersif Çözücü Türü

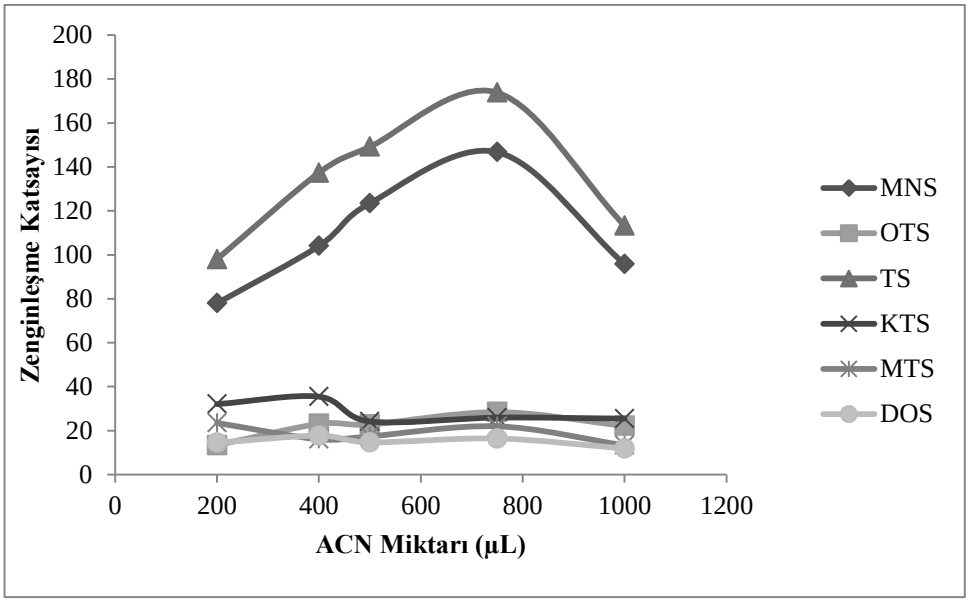
İS-DSSME yönteminin gelişimi için, dispersif çözücü çok önemlidir, çünkü bulutlu çözelti oluşturmak için İS faz ve sulu çözelti ile karışabilirliği iyi olmalıdır. Bu çalışmada dispersif çözücü olarak MeOH, ACN ve aseton kullanılmıştır ve her biri için ZK hesaplanmıştır. Şekil 3. 7' de görüldüğü gibi ACN' in verimliliği daha yüksek çıkmış ve daha sonraki çalışmalarda dispersif çözücü olarak ACN ile devam edilmiştir.



Şekil 3.7 Geleneksel İS-DSSME yönteminde dispersif çözücü türünün etkisi (Çalışma koşulları:5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 50µL *hegzil*-MIM-NTF_2 ; 500 µL dispersif çözücü; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama; 10 dk 4000 rpm santrifüj).

3.2.1.5 Dispersif Çözücü Hacmi

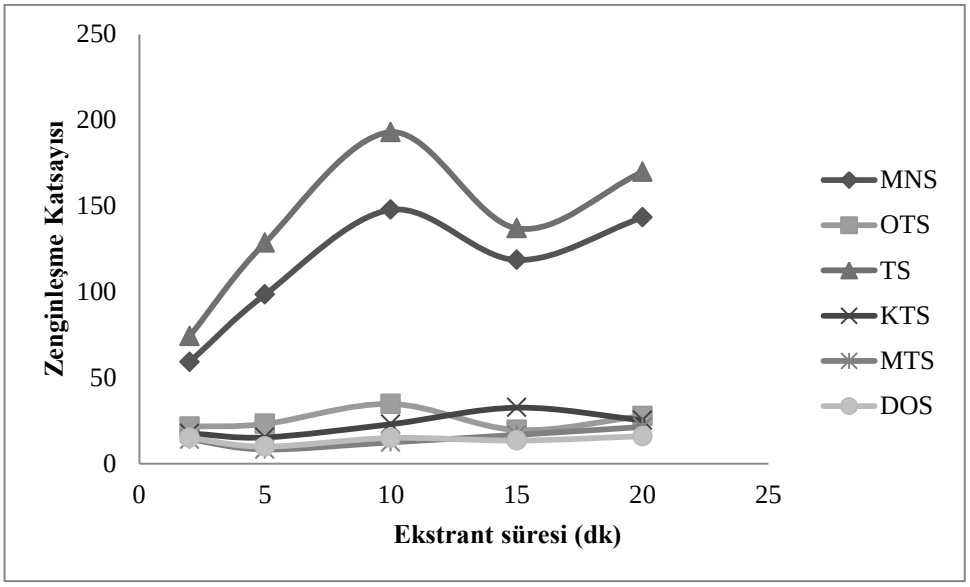
Dispersif çözücü hacmi, doğrudan bulutlu çözelti oluşumu ve sulu çözeltideki İS' nın dispersiyon derecesini, ekstraksiyon sonra sedimente olan iyonik sıvının hacmini doğrudan etkilemektedir (Baghdadi ve Shemirani, 2008). Bu çalışmada, farklı hacimde asetonitril miktarı kullanılmış ve her biri için ekstraksiyon sonrası ZK' leri hesaplanmıştır. Şekil 3. 8' de görüldüğü gibi en iyi ekstraksiyon verimi 750 µL' de elde edilmiş ve bundan sonraki ekstraksiyon çalışmalarında bu hacimle devam edilmiştir.



Şekil 3.8 Geleneksel İS-DSSME yönteminde dispersif çözücü hacminin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 50µL *hegzil*-MIM-NTF_2 ; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama; 10 dk 4000 rpm santrifüj).

3.2.1.6 Ekstraksiyon Süresi

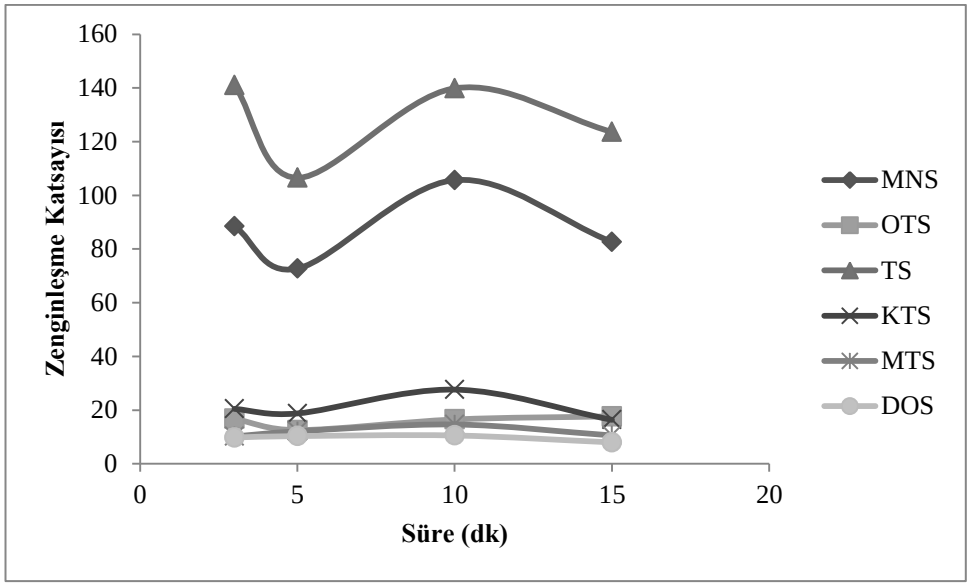
Ekstraksiyon süresi, bulutlanma çözeltisi oluşumu ile santrifüj öncesi aralığı içerir (Song, 2014). Optimum ekstraksiyon belirlenmesi için farklı zaman aralıkları ile çalışılmıştır. Şekil 3. 9' da görüldüğü gibi, ekstraksiyon verimi 10 dakikadan sonra önce azalmış daha sonra az da olsa artmıştır. Bu nedenle de bundan sonraki çalışmalarda ekstraksiyon süresi 10 dk olarak devam edilmiştir.



Şekil 3.9 Geleneksel İS-DSSME yönteminde ekstraksiyon süresinin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 50µL *hegzil*-MIM-NTF_2; 750µL ACN; 10 dk 4000 rpm santrifüj).

3.2.1.7 Santrifüj Süresi

Santrifüj, İS fazının sulu fazdan ayrılması gibi önemli rol oynar ve bu işlem sonrasında İS faz, propilen tüpün alt kısmında toplanmıştır. Santrifüj süresinin etkisini değerlendirmek için, bulanık çözeltiler farklı zaman aralıklarında 4000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Sonrasında her bir TS için ZK hesaplanmıştır. Şekil 3. 10' da görüldüğü gibi en iyi verim 10 dk da elde edilmiştir. Gerçek örneklere uygulanması sırasında santrifüj süresi 10 dk olarak devam edilmiştir.



Şekil 3.10 Geleneksel İS-DSSME yönteminde santrifüj süresinin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 50µL *hegzil*-MIM-NTF_2; 750µL ACN; 1,5 dakika vorteks, 8,5 dakika çalkalama).

3.2.2 İn-sitü-İS-DSSME Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları

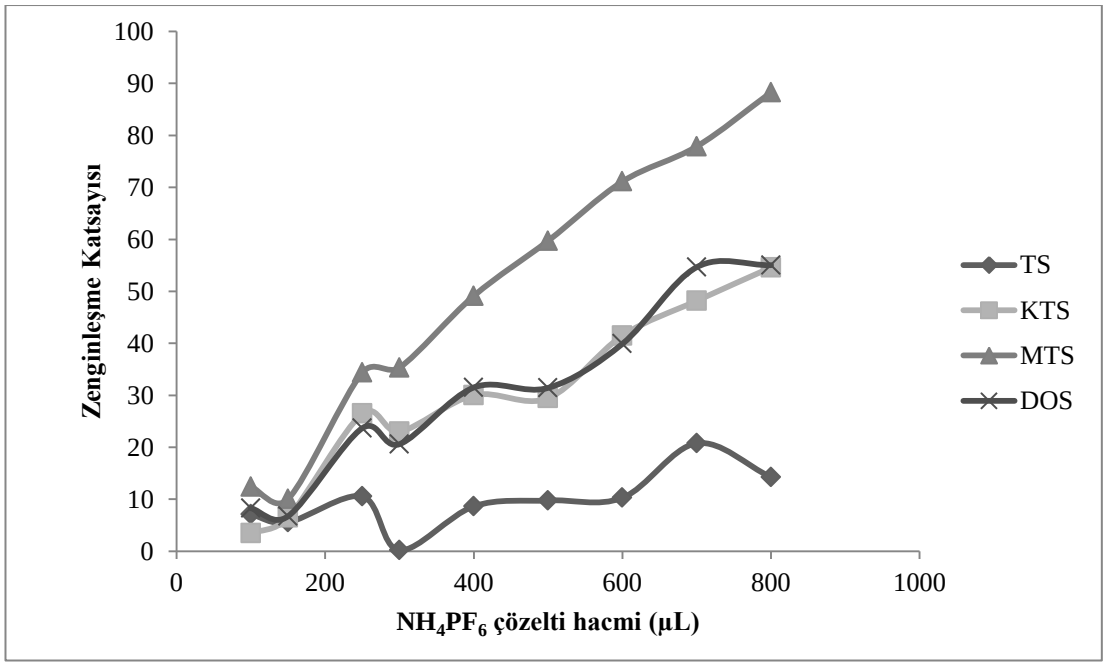
TS' leri içeren sulu örnek çözeltisine *benzil*-MIM-CI/su çözeltisinden eklenmiş, daha sonra NH_4PF_6 sulu çözeltisinden eklenmiştir. Oluşan bulutlu çözelti orbital çalkalayıcıda dengeye getirilip, santrifüj edilmiştir. Analitleri içeren alt faz asetonitril ile yıkanmış ve tetrasiklinler UPLC' de analiz edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında, İS-DSSME yönteminde TS bileşiklerinin pH 3'de ve tuzsuz sulu çözeltisinde daha iyi ekstraksiyon verimi alındığı için pH etkisi ve tuz etkisi tekrar edilmemiştir.

Yöntemi optimize etmek için çalışılan parametreler aşağıda verilmiştir:

- NH_4PF_6 tuz çözeltisinin hacimi (100, 150, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 µL)
- denge süresi (0,30,1, 2,5, 5, 20 dk)
- santrifüj süresi (5, 10, 15, 20 dk)
- iyonik sıvı/tuz hacim oranları (40/280, 60/420, 80/560, 100/700, 120/840, 140/980, 160/1120, 180/1260 µL/µL)

3.2.2.1 NH_4PF_6 Tuz Çözeltisinin Hacim Etkisi

Hidrofilik İS ile iyon-değiştirme reaktifinin molar oranlarının TS' lerin ekstraksiyon verimliliği üzerindeki etkisini araştırmak için, 100 µL *benzil*-MIM-CI sulu çözeltisi (0,4 g mL^{-1}) ile farklı hacimlerde 0,104 g $mL^{-1}NH_4PF_6$ sulu çözeltisi kullanılarak test edilmiştir. Şekil 3. 11' de görüldüğü gibi NH_4PF_6 sulu çözeltisinden 700 µL alındığı zaman ZK değeri maksimuma ulaşmıştır ve *benzil*-MIM-CI/ NH_4PF_6 mol oranları 1/ 2,3 olarak hesaplanmıştır. Bundan sonraki ekstraksiyon çalışmalarında bu oranda devam edilmiştir.

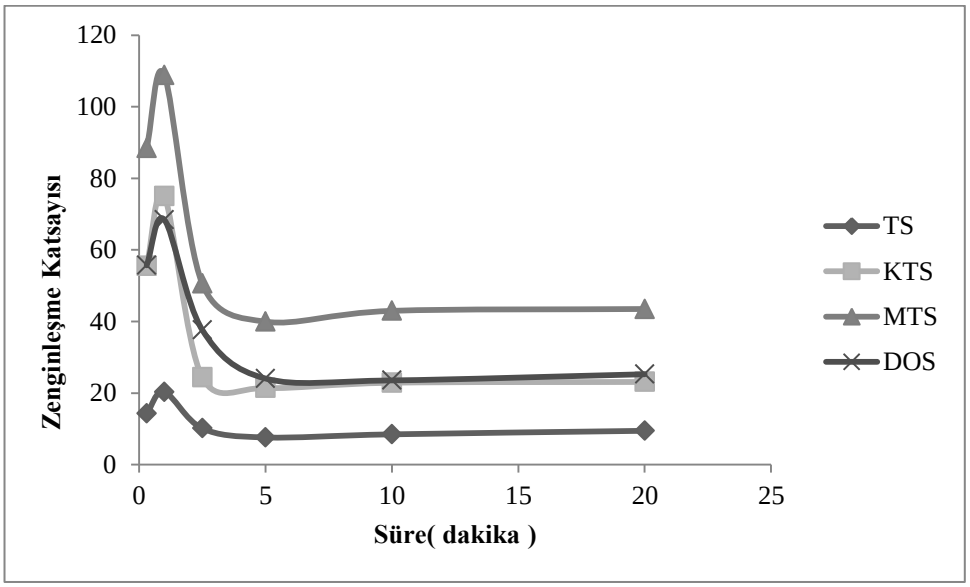


Şekil 3.11 *İn-sitü*-İS-DSSME yönteminde NH_4PF_6 çözelti hacminin etkisi. (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi, pH=3; 100µL 0,4g/mL *benzil*-MIM-Cl çözeltisi; 4 dk çalkalama; 10 dk 40000 rpm santrifüj)

3.2.2.2 Denge Süresi

Denge süresinin etkisi, mikroekstraksiyonu yöntemleri için önemli bir faktördür. Analitlerin ekstrakte miktarını etkileyen ekstraksiyon süresi, 0,3-20 dakika arasındaki zaman aralığında araştırılmıştır. Şekil 3. 12' de görüldüğü gibi denge süresinin artması belirgin etkisi olmamıştır. Görünüşe göre, sulu çözeltiden İS' ya ekstraksiyonu arasında analit moleküllerin kütle transferi çok hızlıdır, bu durum çok

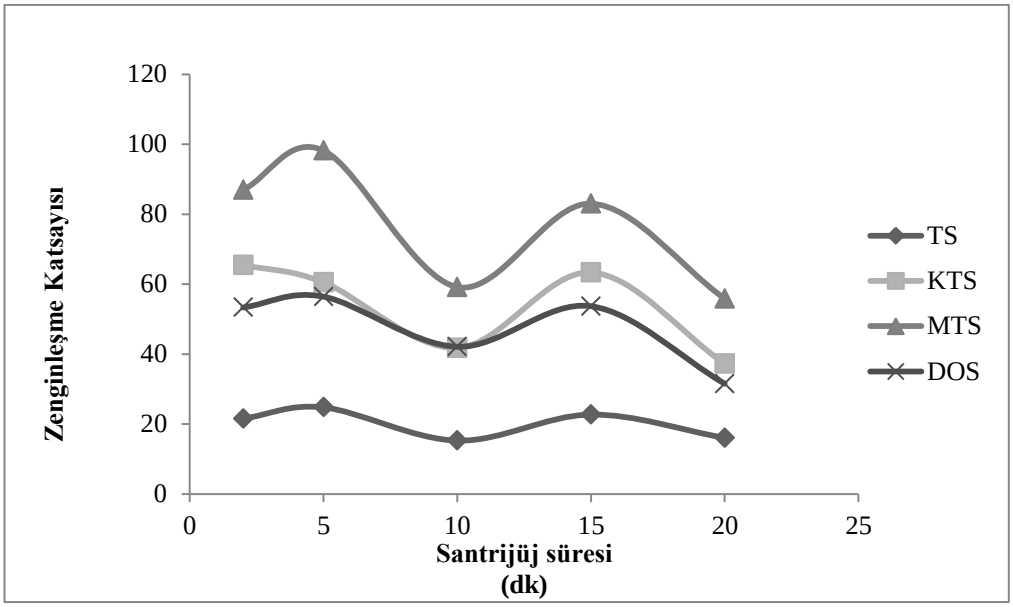
kısa sürede denge oluşumuna neden olur (Yao ve Anderson, 2009). Bu nedenle, sadece 60 sn orbital çalkalayıcıda çalkalanmış ve bundan sonraki çalışmalarda denge süresi 60 sn olarak alınmıştır.



Şekil 3.12 *İn-sitü*-İS-DSSME yönteminde denge sürelerin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 100µL 0,4g/mL *benzil*-MIM-Cl; 700µL 0,104g/mL NH_4PF_6 ;10 dk 4000 rpm santrifüj).

3.2.2.3 Santrifüj Süresi

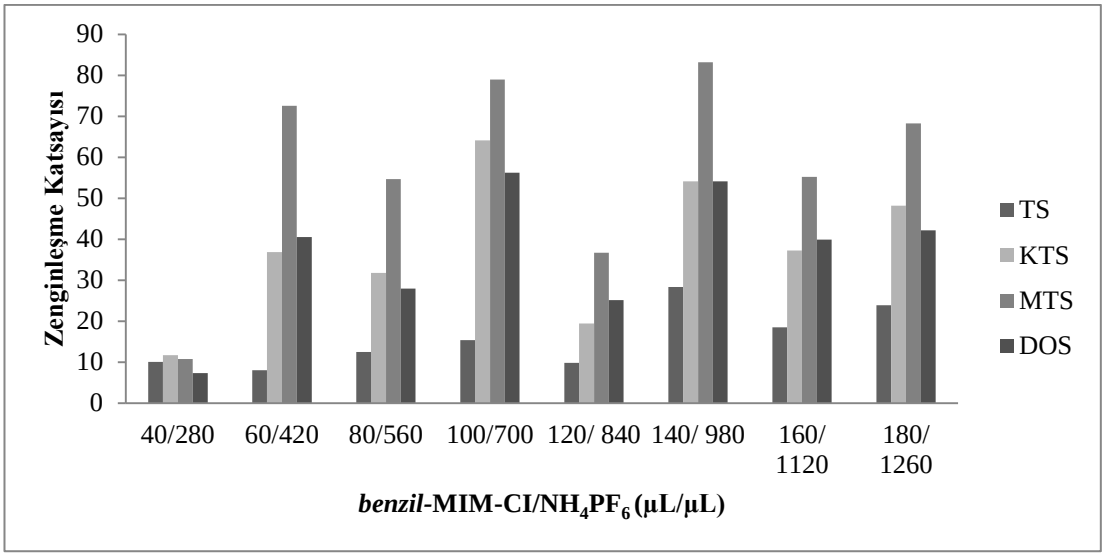
Santrifüj süresi, *in-sitü*-İS-DSSME yönteminde, İS fazını sulu çözeltiden ayırmada kullanılan önemli adımdır. Santrifüj etkisi, 4000 rpm hızında 5-20 dk zaman aralığında çalışılmıştır ve her bir TS için ZK değerleri hesaplanmıştır. Şekil 3.13 'te görüldüğü gibi 5 dk' dan sonra ZK değerinde düşme görülmüştür. Bundan sonraki ekstraksiyon çalışmalarında santrifüj süresi 5 dk olarak çalışılmıştır.



Şekil 3.13 *İn-sitü*-İS-DSSME yönteminde santrifüj süresinin etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 100µL 0,4g/mL *benzil*-MIM-Cl; 700µL 0,104g/mL NH_4PF_6; 60 sn çalkalama).

3.2.2.3 İyonik sıvı/Tuz Hacim Oranları

Burada, *benzil*-MIM-CI/ NH_4PF_6' ın 1/ 2,3 mol oranları sabit tutularak, *benzil*-MIM-CI ve NH_4PF_6' ın sulu çözeltilerinin farklı hacimleri, farklı hacimlerde hidrofobik *benzil*-MIM-PF_6 oluşturarak TS' lerin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisini araştırmak için test edilmiştir (Fan, Li ve Cao, 2015). Şekil 3. 14' de görüldüğü gibi TS' lerin ZK değerleri, İS çözeltisi hacminin 40 µL' den 140 µL' ye artışı kütle transferi etkisi ile artmıştır. . Gerçek örneklere uygulanması sırasında 140 µL *benzil*-MIM-CI ve 980 µL NH_4PF_6 sulu çözeltileri ile çalışılmıştır.



Şekil 3.14 *İn-sitü*-İS-DSSME yönteminde *benzil*-MIM-Cl (µL)/NH_4PF_6 (µL) hacim oranlarının etkisi (Çalışma koşulları: 5 mL çalışma çözeltisi; pH=3; 60 sn çalkalama; 5 dk santrifüj).

3.3 İS-DSSME Yöntemlerinin Analitik Performansı

3.3.1 Geleneksel-İS-DSSME Yönteminin Analitik Performansı

Çalışılan TS'ler için geleneksel-İS-DSSME yöntemi kullanılarak zenginleştirilmiş ve sonrasında UPLC/DAD analizi ile kalibrasyon doğruları elde edilmiş ve altı TS için doğrusal aralık, gözlenebilme sınırı, korelasyon katsayısı ve keskinlik hesaplanmıştır.

Yöntemin kesinliği 3 paralel olarak 100 µg L^{-1} derişiminde günler içi ve günler arası çalışılarak belirlenmiştir. Kesinlik, % bağıl standart sapma (% BSS) ile ifade edilmiştir.

$$\%BSS=\frac{\text{standart sapma (SD)}}{\text{ortalama } (\bar{x})}$$

Yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) ; TS' lerin kalibrasyon eşitliğindeki en düşük derişimin 10 paralel analizi ile şu şekilde hesaplanmıştır:

LOD = 3* (Standart sapma (SD)/ Kalibrasyon doğrusunun eğimi (m))

Yöntemin tüm analitik performans sonuçları Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.2 Geleneksel-İS-DSSME yöntemin analitik performansı

Parametreler	MNS	OTS	TS	KTS	MTS	DOS
Doğrusal Aralık ($\mu g\ L^{-1}$)	50-1000	50-1000	50-1000	50-1000	50-1000	50-1000
Kalibrasyon Eşitliği	y = 0,1419x - 0,1808	y = 0,0186x + 4,9889	y = 0,1893x + 0,7227	y = 0,0197x + 5,2483	y = 0,0063x + 5,9956	y = 0,0025x + 4,649
R^2	0,9972	0,8617	0,9984	0,8469	0,7232	0,6244
LOD ($\mu g\ L^{-1}$)	3,9328	9,0561	4,5331	1,5964	16,3023	8,8258
% BSS gün-içi						
100 $\mu g\ L^{-1}$	7,14	1,54	1,43	7,24	1,59	0,83
250 $\mu g\ L^{-1}$	3,98	7,66	4,50	1,31	5,70	0,48
% BSS günler-arası						
100 $\mu g\ L^{-1}$	2,46	3,51	6,95	3,63	6,07	1,56
250 $\mu g\ L^{-1}$	9,96	1,67	10,12	2,01	1,83	5,44

3.3.2 İn-sitü-İS-DSSME Yönteminin Analitik Performansı

Çalışılan TS'ler için *in-sitü*-İS-DSSME yöntemi kullanılarak zenginleştirilmiş ve sonrasında UPLC/DAD analizi ile kalibrasyon doğruları elde edilmiş ve dört TS için doğrusal aralık, gözlenebilme sınırı, korelasyon katsayısı ve keskinlik hesaplanmıştır.

Yöntemin kesinliği 3 paralel olarak 25 μg L^{-1} derişiminde gün içi ve günler arası çalışılarak belirlenmiştir. Yöntemin tüm analitik performans sonuçları Tablo 3.3' de verilmiştir.

Tablo 3.3 *İn-situ*-İS-DSSME yöntemin analitik performansı

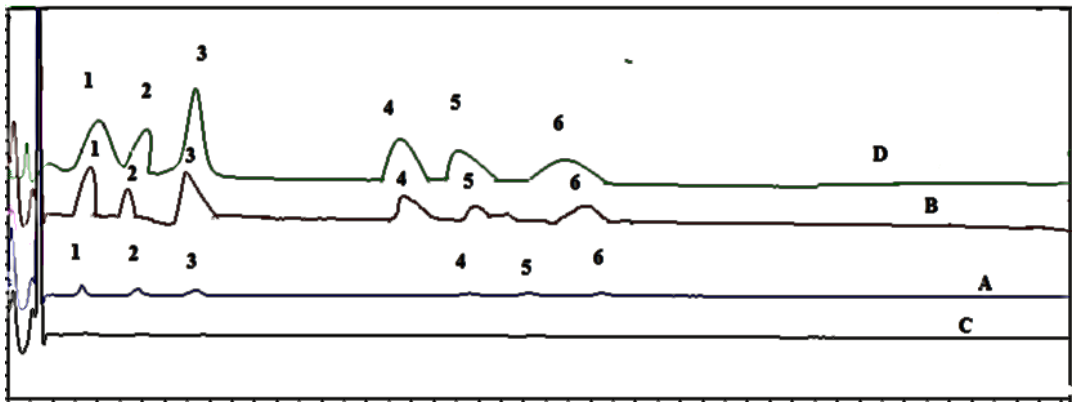
Parametreler	TS	KTS	MTS	DOS
Doğrusal Aralık ($\mu g\ L^{-1}$)	25-1000	25-1000	25-1000	25-1000
Kalibrasyon Eşitliği	y = 3,6297x + 0,031	y = 4,2665x - 0,1125	y = 9,8782x + 0,1898	y = 8,1397x + 0,0984
R^2	0,9992	0,9969	0,9971	0,9861
LOD ($\mu g\ L^{-1}$)	0,12	0,45	0,38	0,21
%BSS* gün-içi	0,67	0,86	1,17	0,56
%BSS* günler-arası	1,02	0,90	1,17	1,11

*25 $\mu g\ L^{-1}$ derişimi

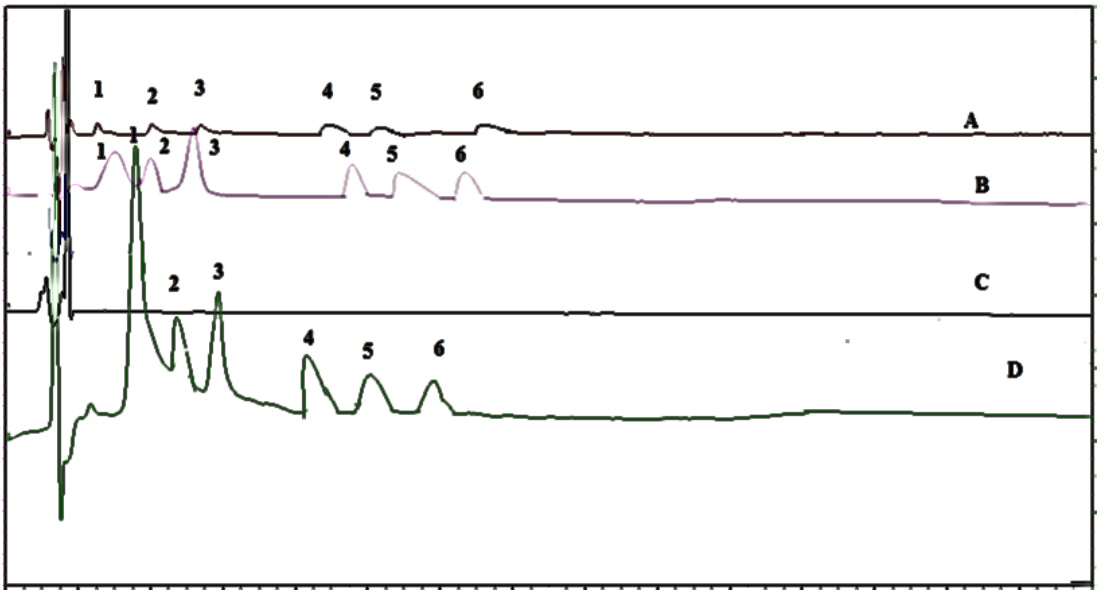
3.4 Gerçek Örnekler

3.4.1 Geleneksel-İS-DSSME Yöntemiyle

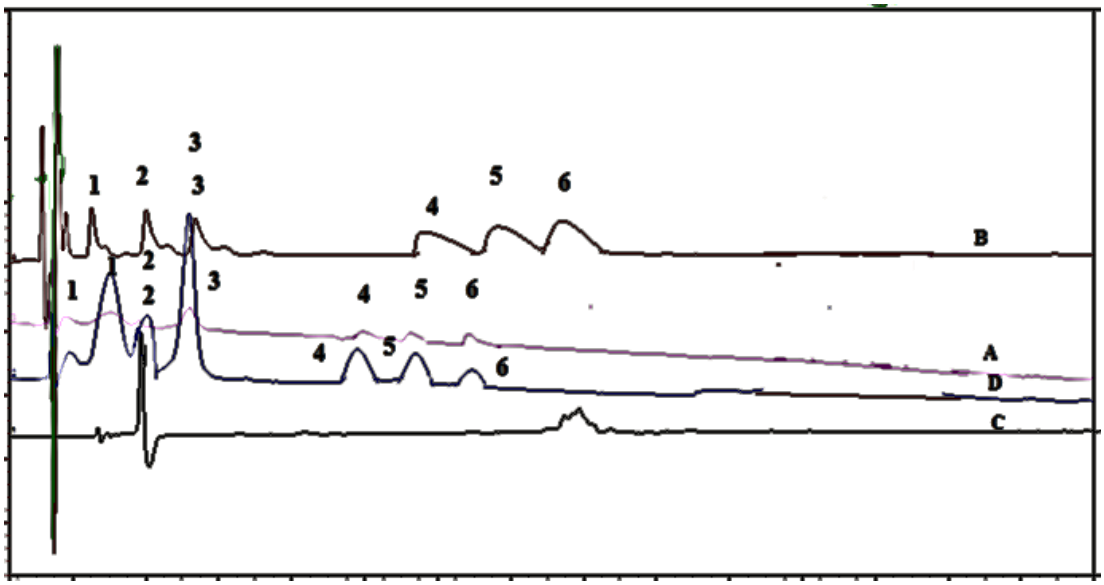
Gerçek örnekler olan süt, bal ve yumurta İzmir' de marketlerden satın alınmıştır. Bölüm 2.5.1' deki yöntemlere göre örnek çözeltileri hazırlanarak geleneksel-İS-DSSME yönteminin optimizasyon koşullarına göre analiz edilmiştir. Örnek çözeltilere 100-250 µg L^{-1} standart TS antibiyotikleri eklenmiştir. Şekil 3.15 -3.17'de sırasıyla süt, yumurta ve bala ait UPLC kromatogramları verilmiştir. Geri kazanım yüzdeleri tüm örnekler için % 17 ila % 98 arasında değişim göstermiştir (Tablo 3. 4).



Şekil 3.15 TS' in kromatogramları (50 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler ve (B) Geleneksel-İS-DSSME yöntemi sonrası (250 µg L^{-1}), (C) süt örneği ve (D) süt örneğine 250 µg L^{-1} standart TS eklendikten sonra (1 = MSN, 2=OTS, 3=TS, 4= KTS, 5 = MTS, 5 = DOS).



Şekil 3.16 TS' in kromatogramları (50 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler ve (B) Geleneksel-İS-DSSME yöntem sonrası (250 µg L^{-1}), (C) yumurta örneği ve (D) yumurta örneğine 250 µg L^{-1} standart TS eklendikten sonra (1 = MSN, 2=OTS, 3=TS, 4= KTS, 5 = MTS, 5 = DOS)



Şekil 3.17 TS' in kromatogramları (50 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler ve (B) Geleneksel-İS-DSSME yöntem sonrası (250 µg L^{-1}), (C) bal örneği ve (D) bal örneğine 250 µg L^{-1} standart TS eklendikten sonra (1 = MSN, 2=OTS, 3=TS, 4= KTS, 5 = MTS, 5 = DOS).

Tablo 3.4 Geleneksel-İS-DSSME yöntemi ile süt bal yumurta örneğinde TS antibiyoiklerinin analiz sonuçları

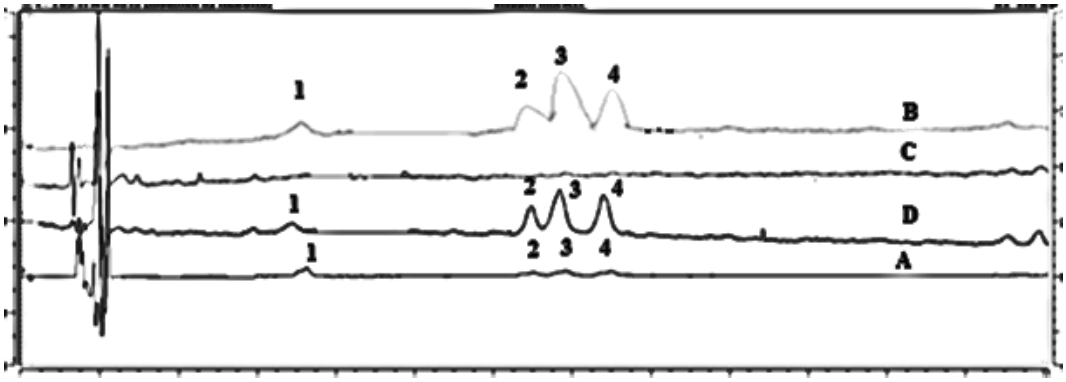
Analitler	Eklenen ($\mu g\ L^{-1}$)	Süt		Yumurta		Bal	
		Bulunan	%Geri Kazanım	Bulunan	%Geri Kazanım	Bulunan	%Geri Kazanım
MNS	100	1,10±0,01	74,4±0,2	1,80±0,01	93,3±3,5	0,09±0,01	90,6±0,5
	250	1,91±0,03	76,1±2,4	2,30±0,02	84,0±0,1	0,18±0,02	72,3±1,3
OTS	100	0,60±0,01	35,1±2,2	0,40±0,01	37,2±0,8	0,04±0,01	35,2±3,9
	250	0,40±0,02	17,6±3,4	1,12±0,02	43,3±4,6	0,05±0,02	21,8±2,8
TS	100	0,50±0,06	40,3±8,7	1,62±0,01	70,3±0,0	0,08±0,01	76,4±0,3
	250	1,50±0,01	51,7±2,6	0,20±0,05	63,7±1,6	0,19±0,02	74,2±0,9
KTS	100	0,70±0,01	43,4±5,3	0,04±0,06	48,5±0,4	0,05±0,01	46,1±3,7
	250	0,40±0,03	33,5±4,1	0,20±0,02	49,2±0,0	0,14±0,03	56,8±0,2

Tablo 3.4 Geleneksel-İS-DSSME yöntemi ile süt bal yumurta örneğinde TS antibiyoiklerinin analiz sonuçları (devamı)

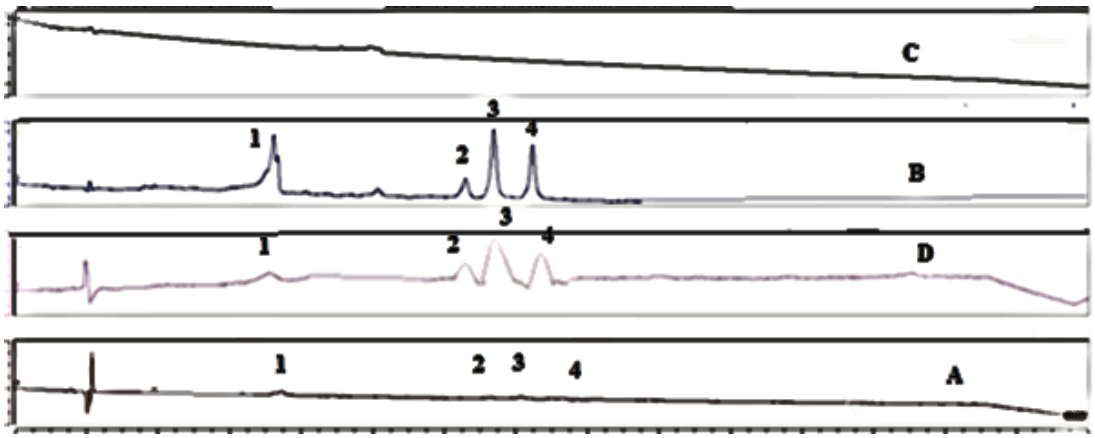
Analitler	Eklenen ($\mu g\ L^{-1}$)	Süt		Yumurta		Bal	
		Bulunan	%Geri Kazanım	Bulunan	%Geri Kazanım	Bulunan	%Geri Kazanım
MTS	100	1,2±0,01	75,6±3,2	0,04±0,08	40,2±3,3	0,04±0,13	43,1±3,7
	250	1,0±0,02	76,8±5,2	0,10±0,1	46,3±2,3	0,08±0,06	33,9±5,2
DOS	100	1,0±0,01	62,8±3,5	0,05±0,20	49,5±0,0	0,05±0,05	47,8±0,1
	250	0,9±0,03	58,4±4,5	0,012±0,12	48,3±0,0	0,08±0,02	35,0±0,2

3.4.2 İn-sitü-İS-DSSME Yöntemiyle

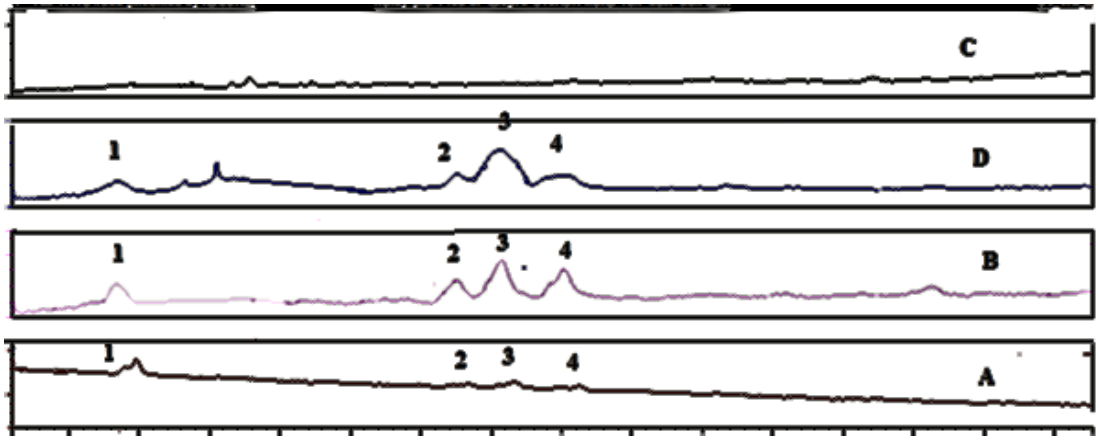
Gerçek örnekler olan süt, bal ve yumurta İzmir' de marketlerden satın alınmıştır. Bölüm 2.5.1' deki yöntemlere göre örnek çözeltiler hazırlanarak optimize edilen *in-sitü*-İS-DSSME yöntemine göre analiz edilmiştir. Örnek çözeltilere 50-250 µg L^{-1} standart TS antibiyotikleri eklenmiştir. Şekil 3. 18 -3. 20'de sırasıyla süt, yumurta ve bala ait UPLC kromatogramları verilmiştir. Gün içi ve günler arası geri kazanım yüzdeleri tüm örnekler için % 65 ila % 120 arasında değişim göstermiştir (Tablo 3. 5 ve Tablo 3. 6).



Şekil 3.18 TS' in kromatogramları (150 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler ve (B) in-sitü-İS-DSSME yöntem sonrası (250 µg L^{-1}), (C) süt örneği ve (D) süt örneğine 250 µg $L^{-}1$ TS eklendikten sonra (1 = TS, 2= KTS, 3 = MTS ve 4 = DOS).



Şekil 3.19 TS' in kromatogramları (150 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler (B) *in-situ*-İS-DSSME yöntem sonrası (250 µg L^{-1}), (C) yumurta örneği ve (D) yumurta örneğine 250 µg L^{-1} TS eklendikten sonra (1 = TS, 2= KTS, 3 = MTS ve 4 = DOS).



Şekil 3.20 TS' in kromatogramları(150 mm lik HPLC kolonu) (A) 250 µg L^{-1} standart TS'ler (B) *in-situ*-İS-DSSME yöntem sonrası (250 µg L^{-1}), (C) bal örneği ve (D) bal örneğine 250 µg L^{-1} TS eklendikten sonra (1 = TS, 2= KTS, 3 = MTS ve 4 = DOS).

Tablo 3.5 *İn-situ*-İS-DSSME yöntemi ile süt bal ve yumurta örneğinde TS antibiyoiklerinin gün-içi analiz sonuçları

		Süt		Bal		Yumurta	
Analitler	Eklenen (ng mL^{-1})	Bulunan	% Geri Kazanım	Bulunan	% Geri Kazanım	Bulunan	% Geri Kazanım
TS	0,05	0,04±0,01	86,3±7,3	0,047±0,01	94,3±3,5	0,039±0,01	78,2±1,7
	0,25	0,21±0,02	85,8±6,2	0,17±0,03	70,0±9,4	0,17±0,03	68,3±7,2
KTS	0,05	0,05±0,01	93,9±10,5	0,046±0,01	93,3±5,6	0,044±0,02	88,0±9,1
	0,25	0,248±0,00	99,2±1,2	0,04±0,02	86,3±4,2	0,22±0,02	89,7±6,0
MTS	0,05	0,06±0,06	120,4±6,8	0,05±0,01	109,2±8,0	0,05±0,01	109,2±8,0
	0,25	0,16±0,08	65,0±2,0	0,25±0,01	102,6±9,0	0,26±0,02	103,1±13
DOS	0,05	0,05±0,01	107,2±1,5	0,05±0,03	108,7±3,1	0,054±0,01	108,7±1,3
	0,25	0,26±0,02	105,3±2,3	0,25±0,01	101,6±7,2	0,28±0,03	115,0±6,0

Tablo 3.6 *İn-situ*-İS-DSSME yöntemi ile süt bal yumurta örneğinde TS antibiyoiklerinin günler-arası analiz sonuçları

		Süt		Bal		Yumurta	
Analitler	Eklenen (ng mL⁻1)	Bulunan	% Geri Kazanım	Bulunan	% Geri Kazanım	Bulunan	% Geri Kazanım
TS	0,05	0,04±0,05	91,1±5,0	0,03±0,02	60,0±5,2	0,03±0,03	61,2±1,3
	0,25	0,15±0,07	60,8±4,3	0,20±0,05	82,5±7,4	0,16±0,01	62,0±2,0
KTS	0,05	0,05±0,01	103,9±6,0	0,04±0,03	79,7±2,3	0,036±0,02	72,2±2,0
	0,25	0,16±0,06	64,0±4,3	0,20±0,01	82,7±3,0	0,15±0,02	60,0±2,0
MTS	0,05	0,06±0,04	128,3±2,5	0,05±0,05	111,1±1,8	0,05±0,1	101,1±10,0
	0,25	0,16±0,08	64,0±35,8	0,27±0,04	109,7±8,4	0,27±0,08	109,0±8,0
DOS	0,05	0,05±0,01	97,5±3,5	0,04±0,06	90,7±1,60	0,05±0,09	107,0±1,0
	0,25	0,16±0,02	64,8±3,52	0,22±0,06	89,3±5,60	0,29±0,03	116,0±3,0

BÖLÜM DÖRT
SONUÇLAR

Bu çalışmada, TS antibiyotiklerinin HPLC ile tayin öncesi zenginleştirilmeleri için geleneksel iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu yöntemi ve in-sitü iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu yöntemleri geliştirilmiş ve yöntemler optimize edilerek, süt, bal ve yumurta örneklerine uygulanmıştır.

Çalışmada TS bileşiklerinin HPLC' de ayrılması ve nicel analizleri için kromatografik şartlar belirlenmiştir.

İlk olarak, geleneksel iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon yöntemi çalışılmıştır. İyonik sıvı olarak, 1-*hegzil*-3metil-imidazolyum bis(triflloro metil sülfonil)imid kullanılmış ve yöntemin optimizasyon basamakları (pH, tuz etkisi, ekstraksiyon çözücüsü hacmi, dispersif çözücü türü, dispersif çözücü miktarı, ekstraksiyon süresi, santrifüj süresi) geliştirilmiştir. Optimizasyon koşulları: pH 3; iyonik sıvı hacmi 50 µL; dispersif çözücü olarak asetonitril; dispersif çözücü hacmi 750 µL; ektraksiyon süresi 10 dak; santrifüj süresi 5 dk olarak belirlenmiştir. Tuz etkisinin ekstraksiyon verimliliğini azalttığı görüldüğü için tuz eklenmemiştir.

İn-sitü iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu yönteminde ise, iyonik sıvı olarak 1-*benzil*-3metilimidazolyum bromür kullanılmıştır. Yöntem, ekstraksiyon verimliliğini arttırmak için optimizasyon basamakları (NH_4PF_6 tuz çözeltisinin hacimi, denge süresi, santrifüj süresi, iyonik sıvı/tuz hacim oranları) geliştirilmiştir. Optimizasyon koşulları: NH_4PF_6 tuz çözeltisinin hacimi 700 µL; denge süresi 1 dk; santrifüj süresi 5 dk; 1-*benzil*-3metil-imidazolyum bromür / NH_4PF_6 tuz çözeltisi 140 µL / 980 µL olarak belirlenmiştir. İlk çalışılan yöntemde pH ve tuz etkisi çalışıldığı için tekrar edilmemiştir.

Geliştirilen yöntemler için çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, gün-içi tekrarlanabilirlik gibi analitik parametreler incelenmiştir. İn-sitü iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu yönteminde günler-arası tekrarlanabilirlik de

çalışılmıştır. Yöntem, süt, bal ve yumurta örneklerine başarıyla uygulanmıştır. Gerçek örneklerde tetrasiklin kalıntılarına rastlanılmamıştır. Her iki yöntemde de yeşil çözücü olarak adlandırılan çevre dostu iyonik sıvı kullanılmıştır. Geleneksel iyonik sıvı bazlı mikroekstraksiyonu yönteminde, ekstraksiyon süresi; in-sitü iyonik sıvı bazlı mikroekstraksiyonu yönteminde ise, denge süresi oldukça kısadır. Bu iki yöntemin sonuçları, son zamanlarda yapılmış iyonik sıvı bazlı mikroekstraksiyon çalışmaları ile karşılaştırılmıştır. Tablo 3.7' de görüldüğü gibi bu çalışmada geliştirilen yöntem ile elde edilen ZK ve LOD değerleri literatürdeki benzer yöntemleri ile yarışabilir veya bazılarından daha iyidir.

Tablo 3.7 Geliştirilen İS-DSSME yönteminin literatürdeki diğer yöntemler ile karşılaştırılması

Yöntem	Analit	Çalışma aralığı ($\mu g\ L^{-1}$)	ZK	LOD ($\mu g\ L^{-1}$)	Matriks	Ref
İS-DSSME, $BMIMPF_6$	OTS, TS, KTS, DOS	5-1000	12-44	2-12	Yumurta	Song, Zhang, Zhang, Feng, Wang ve Wang, (2014)
Scaklık kontrollü İS-DSSME, $BMIM\text{-}PF_6$,	OTS, TS, KTS, DOS	0,1-200		0,031-0,079	Su	Hou, Guan ve Di, 2011
İS-DSSME, $BMIM\text{-}PF_6$	TS, KTS, MTS, DOS	10-500	78-82	0,46-0,57	Su	Du, Wu, Kang, Wang, Huang ve Li, 2014
Ultrasonikdispersif SPE	OTS, TS, KTS, DOS			4,8-18,7	Süt	Karageorgou, Armeni, Moschou ve Samanidou, 2014
İS-DSSME, *hekzil*-$MIM\text{-}NTF_2$	MNS, OTS, TS, KTS, MTS, DOS	50-1000	13-148	1,6-16,3	Süt, bal, yumurta	Bu çalışma
İnsitü-İS-DSSME, *benzil*-MIM-Cl,	TS, KTS, MTS, DOS	25-1000	25-98	0,12-0,45	Süt, bal, yumurta	Bu çalışma

KAYNAKLAR

Akkan, A. G. (1997). Antibiyotiklerin sınıflandırılması. *Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, 53-62, İstanbul.

Andraščíková, M., Matisová, E. ve Hrouzková, S. (2015). Liquid phase microextraction techniques as a sample preparation step for analysis of pesticide residues in food. *Separation ve Purification Reviews*, *44*(1), 1-18.

Antibiotics: Types and Side Effects, (bt). 28 Mayıs 2015, http://www.emedexpert.com/classes/antibiotics.shtml

Armstrong, D. W., He, L. ve Liu, Y. S. (1999). Examination of ionic liquids and their interaction with molecules, when used as stationary phases in gas chromatography. *Analytical Chemistry*, *71*(17), 3873-3876.

Armstrong, D. W., Zhang, L. K., He, L. ve Gross, M. L. (2001). Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *73*(15), 3679-3686.

Babić, S., Horvat, A. J., Pavlović, D. M. ve Kaštelan-Macan, M. (2007). Determination of pK a values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *26*(11), 1043-1061.

Baghdadi, M. ve Shemirani, F. (2008). Cold-induced aggregation microextraction: a novel sample preparation technique based on ionic liquids. *Analytica Chimica Acta*, *613*(1), 56-63.

Baghdadi, M. ve Shemirani, F. (2009). In situ solvent formation microextraction based on ionic liquids: a novel sample preparation technique for determination of inorganic species in saline solutions. *Analytica Chimica Acta*, *634*(2), 186-191.

Brüning, A., Brem, G. J., Vogel, M. ve Mylonas, I. (2014). Tetracyclines cause cell stress-dependent ATF4 activation and mTOR inhibition. *Experimental Cell Research*, *320*(2), 281-289.

Chen, H., Chen, H., Ying, J., Huang, J. ve Liao, L. (2009). Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. *Analytica Chimica Acta*, *632*(1), 80-85.

Chen, X., Ren, S., Meng, F., Zhang, Y. ve Zhong, D. (2005). Determination of methacycline in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *553*(1), 15-20.

Chen, Y. ve Schwack, W. (2014). High-performance thin-layer chromatography screening of multi class antibiotics in animal food by bioluminescent bioautography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1356*, 249-257.

Du, D., Wu, Y., Kang, D., Wang, H., Huang, C. ve Li, Y. (2014). Determination of tetracyclines in water by ethyl acetate–ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, *47*(10), 1783-1795.

Erol, İ. ve İplikçioğlu, G. (2007). *Antibiyotik Kullanım Stratejileri ve Kalıntıları Sempozyumu,*43-49, İzmir.

Fan, C., Li, N. ve Cao, X. (2015). Determination of chlorophenols in honey samples using in-situ ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction as a pretreatment method followed by high-performance liquid chromatography.*Food Chemistry*, *174*, 446-451.

Fernandez-Gonzalez, R., Garcıa-Falcón, M. S. ve Simal-Gandara, J. (2002). Quantitative analysis for oxytetracycline in medicated premixes and feeds by second-derivative synchronous spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, *455*(1), 143-148.

García-Alvarez-Coque, M. C., Ruiz-Angel, M. J., Berthod, A. ve Carda-Broch, S. (2015). On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review. *Analytica Chimica Acta*, *883* (2015) 1–21.

Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A. ve Galvez, J. (2013). What is behind the non-antibiotic properties of minocycline?. *Pharmacological Research*, *67*(1), 18-30.

González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K. Ve diğer, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. *Water Research*, *47*(6), 2050-2064.

Gürler, B., Özkorucuklu, S. P. ve Kır, E. (2013). Voltammetric behavior and determination of doxycycline in pharmaceuticals at molecularly imprinted and non-imprinted overoxidized polypyrrole electrodes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *84*, 263-268.

Han, J., Wang, Y., Yu, C. L., Yan, Y. S. ve Xie, X. Q. (2011). Extraction and determination of chloramphenicol in feed water, milk, and honey samples using an ionic liquid/sodium citrate aqueous two-phase system coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *399(*3), 1295-1304.

Hopkins, Z. R. ve Blaney, L. (2014). A novel approach to modeling the reaction kinetics of tetracycline antibiotics with aqueous ozone. *Science of the Total Environment*, *468*, 337-344.

Hou, D., Guan, Y. ve Di, X. (2011). Temperature-induced ionic liquids dispersive liquid–liquid microextraction of tetracycline antibiotics in environmental water samples assisted by complexation. *Chromatographia,73*(11-12), 1057-1064.

Hu, X., Pan, J., Hu, Y., Huo, Y. ve Li, G. (2008). Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fiber based on molecularly imprinted polymers for trace analysis of tetracyclines in complicated samples. *Journal of Chromatography A*, *1188*(2), 97-107.

Jeon, M. ve Paeng, I. R. (2008). Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, *626*(2), 180-185.

Junza, A., Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Barrón, D., Ballesteros, O., Barbosa, J. ve Navalón, A. (2014). Multiclass method for the determination of quinolones and β-lactams, in raw cow milk using dispersive liquid–liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1356*, 10-22.

Kaale, E., Chambuso, M. ve Kitwala, J. (2008). Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column. *Food Chemistry, 107*(3), 1289-1293.

Karageorgou, E., Armeni, M., Moschou, I. ve Samanidou, V. (2014). Ultrasound-assisted dispersive extraction for the high pressure liquid chromatographic determination of tetracyclines residues in milk with diode array detection. *Food Chemistry*, *150*, 328-334.

Li, S., Cai, S., Hu, W., Chen, H. ve Liu, H. (2009). Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for a sensitive determination of cadmium in water samples. Spectrochimica Acta Part B: *Atomic Spectroscopy*, *64*(7), 666-671.

Li, Z., Schulz, L., Ackley, C. ve Fenske, N. (2010). Adsorption of tetracycline on kaolinite with pH-dependent surface charges. *Journal of Colloid and İnterface Science*, *351*(1), 254-260.

Lian, W., Huang, J., Yu, J., Zhang, X., Lin, Q., He, X. ve diğer, S. (2012). A molecularly imprinted sensor based on β-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*(2), 620-627.

Liu, Y., Yang, H., Yang, S., Hu, Q., Cheng, H., Liu, H. ve Qiu, Y. (2013). High-performance liquid chromatography using pressurized liquid extraction for the determination of seven tetracyclines in egg, fish and shrimp. *Journal of Chromatography B*, *917*, 11-17.

Liu, Y., Zhao, E., Zhu, W., Gao, H. ve Zhou, Z. (2009). Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction in water samples. *Journal of Chromatography A*, *1216*(6), 885-891.

Lv, J. M., Ma, Y. L., Chang, X. ve Fan, S. B. (2015). Removal and removing mechanism of tetracycline residue from aqueous solution by using Cu-13X.*Chemical Engineering Journal*, *273*, 247-253.

Mamani, M. C. V., Reyes, F. G. R. ve Rath, S. (2009). Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry*, *117*(3), 545-552.

Oka, H., Ito, Y. ve Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, *882*(1), 109-133.

Önal, A. (2011). Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices. *Food Chemistry*, 127(1), 197-203.

Pamreddy, A., Hidalgo, M., Havel, J. ve Salvadó, V. (2013). Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1298*, 68-75.

Pomorska-Mól, M., Kwit, K., Markowska-Daniel, I. ve Pejsak, Z. (2014). The effect of doxycycline treatment on the postvaccinal immune response in pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology, 278*(1), 31-38.

Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M. R. M., Aghaee, E., Ahmadi, F. ve Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A, 1116*(1), 1-9.

Rok, J., Buszman, E., Delijewski, M., Otręba, M., Beberok, A., ve Wrześniok, D. (2015). Effect of tetracycline and UV radiation on melanization and antioxidant status of melanocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 148*, 168-173..

Shariati, S., Yamini, Y. ve Esrafili, A. (2009). Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC–UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics. *Journal of Chromatography B, 877*(4), 393-400.

Song, J., Zhang, Z., H., Zhang, Y., Q., Feng, C., Wanga, G., N. ve Wang, J., P., (2014). Ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for determination of tetracycline drugs in eggs. *Anal. Methods, 6*, 6459–6466.

Sun, P.ve Armstrong, D. W. (2010). Ionic liquids in analytical chemistry.*Analytica Chimica Acta*, *661*(1), 1-16.

Sun, X., He, X., Zhang, Y. ve Chen, L. (2009). Determination of tetracyclines in food samples by molecularly imprinted monolithic column coupling with high performance liquid chromatography. *Talanta*, *79*(3), 926-934.

The European Commission, (2010). *Commission regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin*, Official Journal of the European Union L15 1–72.

Trtić-Petrović, T. ve Dimitrijević, A. (2014). Vortex-assisted ionic liquid based liquid-liquid microextraction of selected pesticides from a manufacturing wastewater sample. *Open Chemistry*, *12*(1), 98-106.

Trujillo-Rodríguez, M. J., Rocío-Bautista, P., Pino, V. ve Afonso, A. M. (2013). Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *51*, 87-106.

Tsai, W. H., Huang, T. C., Huang, J. J., Hsue, Y. H. ve Chuang, H. Y. (2009). Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A,1216*(12), 2263-2269.

Visser, A. E., Swatloski, R. P., Reichert, W. M., Mayton, R., Sheff, S., Wierzbicki, ve diğer (2001). Task-specific ionic liquids for the extraction of metal ions from aqueous solutions. *Chemical Communications*, (1), 135-136.

Wang, L., Yang, H., Zhang, C., Mo, Y. ve Lu, X. (2008). Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography.*Analytica Chimica Acta*, *619*(1), 54-58.

Wang, P., Zakeeruddin, S. M., Moser, J. E. ve Grätzel, M. (2003). A new ionic liquid electrolyte enhances the conversion efficiency of dye-sensitized solar cells. *The Journal of Physical Chemistry B*, *107*(48), 13280-13285.

Xiao-Huan, Z. A. N. G., Qiu-Hua, W. U., ZHANG, M. Y., Guo-Hong, X. I. ve Zhi, W. A. N. G. (2009). Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, *37*(2), 161-168.

Yang, J., Chen, X. ve Jin, H. (2015). Online prediction for contamination of chlortetracycline fermentation based on Dezert–Smarandache theory. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *23*(6), 1009-1016.

Yang, X. Q., Yang, C. X. ve Yan, X. P. (2013). Zeolite imidazolate framework-8 as sorbent for on-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of tetracyclines in water and milk samples. *Journal of Chromatography A*, *1304*, 28-33.

Yang, X., Zhang, S., Yu, W., Liu, Z., Lei, L., Li, N., ... ve Yu, Y. (2014). Ionic liquid-anionic surfactant based aqueous two-phase extraction for determination of antibiotics in honey by high-performance liquid chromatography. *Talanta,124*, 1-6.

Yao, C. ve Anderson, J. L. (2009). Dispersive liquid–liquid microextraction using an in situ metathesis reaction to form an ionic liquid extraction phase for the preconcentration of aromatic compounds from water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *395*(5), 1491-1502.

Yu, H., Chen, S. ve Cao, P. (2012). Synergistic bactericidal effects and mechanisms of low intensity ultrasound and antibiotics against bacteria: a review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *19*(3), 377-382.

Zgoła-Grześkowiak, A. ve Grześkowiak, T. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *30*(9), 1382-1399.

Zhang, S., Sun, N., He, X., Lu, X. ve Zhang, X. (2006). Physical properties of ionic liquids: database and evaluation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *35*(4), 1475-1517.

Zhao, S., Li, D., Qiu, J., Wang, M., Yang, S. ve Chen, D. (2014). Simultaneous determination of amantadine, rimantadine and chlorpheniramine in animal-derived food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after fast sample preparation. *Analytical Methods*, *6*(17), 7062-7067.

Zhou, Q., Bai, H., Xie, G. ve Xiao, J. (2008). Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, *1188*(2), 148-153.

Zhou, Q., Zhang, X. ve Xiao, J. (2009). Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase micro-extraction: A novel approach for the sensitive determination of aromatic amines in water samples. *Journal of Chromatography A*, *1216*(20), 4361-4365.

Zhu, J., Liu, S., Liu, Z., Li, Y., Tian, J. ve Hu, X. (2014). A highly sensitive and selective assay of doxycycline by dualwavelength overlapping resonance Rayleigh scattering. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *124*, 237-242.