DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAYVANSAL GIDA ÖRNEKLERİNDE PENİSİLİN GRUBU BAZI ANTİBİYOTİK KALINTILARININ BELİRLENMESİNE YÖNELİK KİTOSAN BAZLI SORBENTLERİN HAZIRLANMASI

İrem BAYAR

Mayıs, 2014
İZMİR

HAYVANSAL GIDA ÖRNEKLERİNDE PENİSİLİN GRUBU BAZI ANTİBİYOTİK KALINTILARININ BELİRLENMESİNE YÖNELİK KİTOSAN BAZLI SORBENTLERİN HAZIRLANMASI

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

İrem BAYAR

Mayıs, 2014

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

İREM BAYAR, tarafından **PROF. DR. M. NALAN TÜZMEN** yönetiminde hazırlanan **"HAYVANSAL GIDA ÖRNEKLERİNDE PENİSİLİN GRUBU BAZI ANTİBİYOTİK KALINTILARININ BELİRLENMESİNE YÖNELİK KİTOSAN BAZLI SORBENTLERİN HAZIRLANMASI"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN

Yönetici

Prof. Dr. Mehmet Kadir Yurdakoç

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Ayşe OKUR
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın tüm safhalarında ve tezin hazırlanmasında destek ve yardımını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerinden dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Melek MERDİVAN ve Doç. Dr. Serap Seyhan BOZKURT'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince benden yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma teşekkürlerimi borç bilirim.

111T404 no'lu proje ile tez sürem boyunca sağlamış olduğu maddi destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Yoğun çalışmalarım süresince her zaman maddi ve manevi destek veren ve yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkürler.

İrem BAYAR

PREPARATION OF CHITOSAN-BASED SORBENTS FOR THE DETERMINATION OF RESIDUES OF PENICILLIN GROUP ANTIBIOTICS IN FOODS OF ANIMAL ORIGIN

ABSTRACT

Antibiotics have been widely used for the prevention of animal diseases. Antibiotic residues in food samples of animal origin cause to resistance development in microorganisms as well as the health problems in humans. Accurate determination of trace amount of the antibiotic residues is very difficult because of the complexity of the food. Therefore, extraction of these compounds which are in trace levels is necessary before analysis. For this purpose, new sorbents and ligands (ionic liquids) were synthesized for the extraction of penicillin group of antibiotics in food samples of animal origin before analysis. Spectroscopic properties of the synthesized ionic liquids (1-butyl-3-methylimidazolium bromide; 1-octyl-3-methylimidazolium iodide; 1-butyl-3-methylimidazolium hexaflorophosphate and 1-octyl-3-methyl imidazolium hexaflorophosphate) were investigated. Chitosan was modified with the synthesized ionic liquids and the prepared sorbents were characterized with FTIR, DTA and SEM. Adsorption parameters were optimized with the chitosan sorbents modified with ionic liquids for the extraction of penicillin group of antibiotics [amoxicillin (AMX), ampicillin (AMP), penicillin V (PENV), oxacillin (OXA), cloxacillin (CLO)]. Applicability of the developed method before the analysis of residue levels of antibiotics in the food samples of animal origin with high performance liquid chromatography was also determined.

Keywords: Chitosan, ionic liquid, penicillins, adsorption

HAYVANSAL GIDA ÖRNEKLERİNDE PENİSİLİN GRUBU BAZI ANTİBİYOTİK KALINTILARININ BELİRLENMESİNE YÖNELİK KİTOSAN BAZLI SORBENTLERİN HAZIRLANMASI

ÖZ

Antibiyotikler hayvan hastalıklarını engellemek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Hayvansal gıdalardaki antibiyotik kalıntıları, insanlarda bazı sağlık sorunlarının ortaya çıkmasının yanı sıra, mikroorganizmalarda direnç gelişimi gibi etkilerin de meydana gelmesine neden olmaktadır. Son derece komplike yapıdaki gıda örneklerinde eser düzeyde bulunan antibiyotik kalıntılarının doğru tayini oldukça zordur. Bu yüzden, eser miktarda bulunan bileşiklerin analiz öncesi ekstraksiyonu gerekli bir zorunluluktur. Bu amaçla, hayvansal gıda örneklerindeki penisilin grubu antibiyotiklerin tayini öncesi ekstraksiyonlarına yönelik yeni sorbent ve ligandlar (iyonik sıvılar) sentezlendi. Sentezlenen iyonik sıvıların (1-butil-3-metil imidazolyum bromür; 1-oktil-3-metil imidazolyum iyodür; 1-butil-3-metil imidazolyum hekzaflorofosfat ve 1-oktil-3-metil imidazolyum hekzaflorofosfat) spektroskopik özellikleri incelendi. Kitosan, sentezlenen iyonik sıvılar ile modifiye edildi ve elde edilen sorbentler FTIR, DTA ve SEM ile karakterize edildi. Hazırlanan iyonik sıvı ile modifiye edilmiş kitosan sorbentleri ile penisilin [amoksisilin (AMX), ampisilin (AMP), penisilin V (PENV), oksasilin (OXA), kloksasilin (CLO)] grubu antibiyotiklerin ekstraksiyonu için adsorpsiyon parametreleri optimize edildi. Geliştirilen yöntemin hayvansal gıda (yumurta ve tavuk eti) örneklerindeki antibiyotik kalıntı miktarlarının yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini öncesi uygulanabilirliği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Kitosan, iyonik sıvı, penisilinler, adsorpsiyon

İÇİNDEKİLER

Sayfa

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

BÖLÜM BİR – GİRİŞ 1

1.1 Antibiyotikler. 1
1.1.1 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması. 1
1.2 Beta Laktam Antibiyotikler 6
1.3 Penisilinler 9
1.3.1 Penisilinlerin Kimyasal Yapısı ve Genel Özellikleri 10
1.3.2 Penisilinlerin Antibakteriyel Etkinliği. 12
1.3.3 Penisilinlerin Sınıflandırılması. 13
1.3.4 Penisilin (Antibiyotiklerin) Metabolizması 16
1.4 Veteriner İlaç Olarak Kullanılan Antibiyotikler 17
1.5 Kalıntı Kaynakları ve Kalıntıların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri 17
1.6 Antibiyotik Direnci 18
1.6.1 Penisilin Direnci. 19
1.7 Maksimum Kalıntı Limitleri (MRL) 20
1.8 Kalıntı Tayininin Önemi 21
1.9 Antibiyotik Kalıntılarının Analizinde Kullanılan Yöntemler. 22
1.9.1 Kalıntı Analizi Öncesi Numune Hazırlama. 25
1.10 Kitosan 28
1.11 İyonik Sıvılar 31
1.12 Çalışmanın Amacı. 33

BÖLÜM İKİ – MATERYAL VE METOT 34

2.1 Reaktifler.....34
2.2 Kullanılan Cihazlar.....35
2.3 İyonik Sıvıların Sentezlenmesi.....36
2.3.1 BMIM-Br ve OMIM-I sentezi.....36
2.3.2 BMIM-PF_6 ve OMIM-PF_6 sentezi 38
2.4 Kitosanın İyonik Sıvı ile Modifikasyonu.....39
2.4 Penisilinlerin Adsorpsiyonunun Optimizasyonu.....39
2.5.1 pH Etkisi.....39
2.5.2 Adsorban Miktarı. 40
2.5.3 Akış Hızı.....40
2.6 Desorpsiyon.....40
2.7 Penisilinlerin HPLC ile Analizi.....41
2.8 Hayvansal Gıda Örneklerindeki Penisilinlerin Adsorpsiyonu. 43
2.8.1 Yumurta Örnekleri İçin Ekstraksiyon Yöntemi.....44
2.8.2 Tavuk Eti Örnekleri İçin Ekstraksiyon Yöntemi. 44

BÖLÜM ÜÇ - BULGULAR VE TARTIŞMALAR 45

3.1 İyonik Sıvıların Karakterizasyonları 45
3.1.1 İyonik Sıvıların FTIR Spektrumları. 45
3.1.2 İyonik Sıvıların ^{1}H-NMR Spektrumları 47
3.1.3 İyonik Sıvıların Termal Analizleri. 48
3.2 İyonik Sıvı ile Modifiye Edilmiş Kitosan Sorbentlerinin Karakterizasyonu...49
3.2.1 Kitosan Sorbentlerinin FTIR Spektrumları. 49
3.2.2 Kitosan Sorbentlerinin Termal Analiz Sonuçları.....52
3.2.3 Kitosan Sorbentlerinin Termal SEM Analizleri. 52
3.3 Penisilinlerin Adsorpsiyon Koşullarının Değerlendirilmesi.....53
3.3.1 pH Optimizasyonu. 53
3.3.2 Adsorban Miktarı Optimizasyonu.....55
3.3.3 Akış Hızı Optimizasyonu. 55

3.4 Penisilin Grubu Antibiyotiklerin Kitosana Adsorpsiyonu. 56
3.5 Desorpsiyon Çalışmaları. 57
3.6 Hayvansal Gıda Örneklerinde Penisilinlerin Tayini. 59

BÖLÜM DÖRT – SONUÇLAR. 61

.

KAYNAKLAR 62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Antibiyotiklerin etki derecelerine göre sınıflandırılması 2
Şekil 1.2 Bakteri hücre yapısı.....3
Şekil 1.3 Antibiyotik etki mekanizmaları 5
Şekil 1.4 Beta-laktam halkası 6
Şekil 1.5 Penisilinlerin kimyasal yapısı 7
Şekil 1.6 Sefalosporinlerin kimyasal yapısı 7
Şekil 1.7 Peptidoglikan yapısı 8
Şekil 1.8 Beta-laktam antibiyotiklerin etki mekanizması 8
Şekil 1.9 Penisilin grubu bazı antibiyotikler 10
Şekil 1.10 Penisilinlerin temel yapısı.....11
Şekil 1.11 Penisilinlerden beta-laktamaz enzimleri ile penisiloik asit oluşumu 11
Şekil 1.12 Penisilin ile D-alanil-D-alanin arasındaki yapı benzerliği 12
Şekil 1.13 Antibiyotiklerin direnç mekanizması 20
Şekil 1.14 Adsorpsiyon kolonunun yapısı 26
Şekil 1.15 Kolon tipi adsorpsiyon yönetimi ile maddelerin ayrılma şekilleri 27
Şekil 1.16 Kitinin deasetilasyonu 29
Şekil 1.17 Kitosanın amin gruplarının deprotonlanması 30
Şekil 1.18 İyonik sıvı yapısı 32
Şekil 2.1 Çalışılan penisilin grubu antibiyotiklerin açık yapıları 34
Şekil 2.2 Agilent 1100 Serisi HPLC Sistemi 36
Şekil 2.3 BMIM-Br sentezi 37
Şekil 2.4 OMIM-I sentezi.....37
Şekil 2.5 BMIM-PF_6 sentezi 38
Şekil 2.6 OMIM-PF_6 sentezi 39
Şekil 2.7 Penisilinlerin HPLC kromatogramı.....43
Şekil 3.1 OMIM-PF_6 iyonik sıvısının FTIR spektrumu.....45
Şekil 3.2 BMIM-PF_6 iyonik sıvısının FTIR spektrumu 46
Şekil 3.3 BMIM-PF_6 iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi.....48
Şekil 3.4 OMIM-PF_6 iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi.....49
Şekil 3.5 Kitosanın FTIR spektrumu 50

Şekil 3.6 CH-OMIM-PF_6 sorbentinin FTIR spektrumu 50
Şekil 3.7 CH-BMIM-PF_6 sorbentinin FTIR spektrumu 51
Şekil 3.8 CH-OMIM-PF_6 sorbentinin TG-DTG eğrisi 52
Şekil 3.9 Modifiye edilmiş kitosanın (CH-OMIM-PF_6) SEM görüntüleri.....53
Şekil 3.10 Penisilin grubu antibiyotiklerin farklı pH'lardaki adsorpsiyon sonuçları .54
Şekil 3.11 a) Kitosan + iyonik sıvı b) Elektrostatik, H bağı ve hidrofobik etkileşim 54
Şekil 3.12 Penisilinlerin farklı sorbent miktarlarındaki adsorpsiyon sonuçları 55
Şekil 3.13 Penisilinlerin tutunma akış hızları sonuçları.....56
Şekil 3.14 Penisilinlerin kitosana tutunma sonuçları 57
Şekil 3.15 Penisilinlerin farklı desorpsiyon ajanlarındaki % geri kazanım sonuçları 58
Şekil 3.16 Penisilinlerin geri alma akış hızları sonuçları.....58

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.....6
Tablo 1.2 Penisilinlerin antibakteriyel spektrumlarına göre sınıflandırılması.....15
Tablo 1.3 Bazı Penisilinlerin Maksimum Kalıntı Limitleri 21
Tablo 2.1 Penisilin grubu antibiyotiklerin pK_a değerleri.....35
Tablo 2.2 Deneyde kullanılan cihazlar 35
Tablo 2.3 Çalışılan desorpsiyon ajanları.....41
Tablo 2.4 Mobil faz değişim programı 42
Tablo 3.1 İyonik sıvıların FTIR spektrum verileri 46
Tablo 3.2 İyonik sıvı modifiye kitosan sorbentlerinin FTIR spektrum verileri.....51
Tablo 3.3 Yumurta örneklerinde penisilinlerin analiz sonuçları.....59
Tablo 3.4 Tavuk eti örneklerinde penisilinlerin analiz sonuçları.....60

BÖLÜM BİR
GİRİŞ

1.1 Antibiyotikler

Antibiyotikler, bakteriler, mantarlar gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve diğer mikroorganizmaların büyümelerini engelleyen veya onları öldüren çok çeşitli kimyasal maddelerdir (Evaggelopoulou ve Samanidou, 2013). Antibiyotikler, mikrobiyolojik sentez yolu ile yapılan biyoaktif ve kemoteröpatik grupların en önemlilerindendir (Joshi, 2002). Bugün çoğu antibiyotik, gıda üreten hayvanların büyümelerine destekleyici olmalarının yanı sıra bazı hastalıkların tedavisi ve engellenmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Carson, Righter ve Wagner, 1994; Di Corcia ve Nazzari, 2002).

Antibiyotiklerin kullanılması ile özellikle geçmişte çok sayıda ölüm ve ekonomik kayba yol açmış olan birçok hastalık bugün daha ortaya çıkmadan engellenebilmektedir. Ancak bu maddelerin, bilinçsizce kullanılmaları bazı olumsuz durumların oluşmasına sebep olmaktadır. Özellikle son yıllarda, antibiyotiklerin yem katkı maddesi olarak büyümeyi ve gelişmeyi hızlandırıcı amaçla kullanılmaları (Philips ve diğer., 2004) hayvansal gıdalarda kalıntılara, bu gıdaları tüketen bireylerde alerjik reaksiyonların oluşmasına, insan ve hayvanlarda hastalığa neden olan bakteri türleri arasında dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Wang, Leung ve Lenz, 2006; Evaggelopoulou ve Samanidou, 2013). Antibiyotiklere dirençli suşlar, bir yandan kendisine önceden verilen antibiyotiğin etkinliğini azaltırken diğer yandan da hayvandan hayvana ve hayvandan insana geçen hastalıkların yaygınlaşmasına yol açarlar (Karen, 1999).

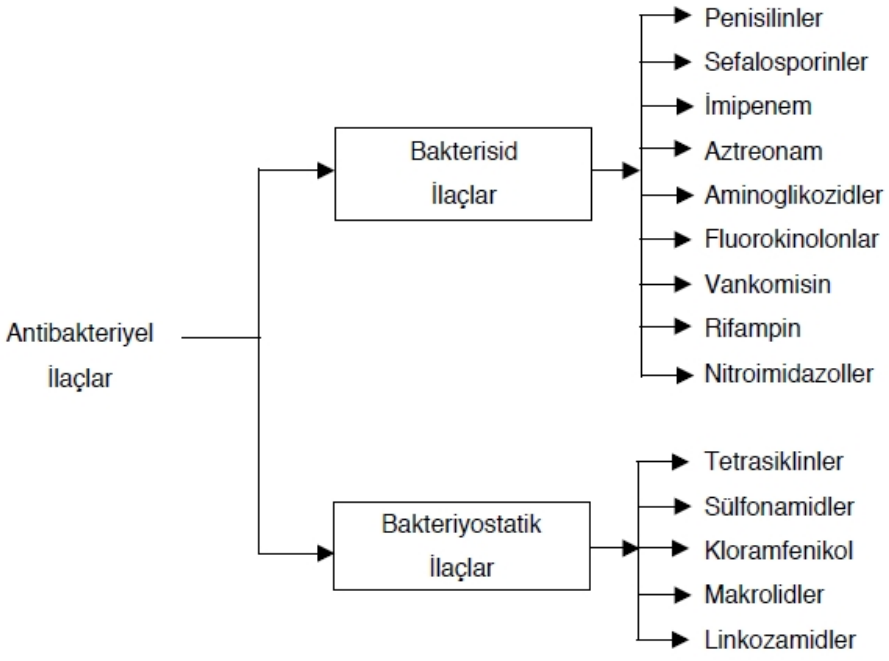
1.1.1 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikleri, etki mekanizmalarına, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine ve kimyasal yapılarına göre olmak üzere çeşitli kategorilerde sınıflandırabilmek mümkündür. Antibiyotikler, farklı tür kimyasal yapılara sahiptirler ve bakteri mekanizmasının farklı kısımlarında etkinlik gösterirler.

Genel olarak antibiyotikler bakteri üzerindeki etkilerine göre iki gruba ayrılırlar (Prasad ve Smith, 2013) :

Bakteriyostatik olanlar: Bu antibiyotikler, bakteri hücrelerinin gelişmesini ve üremesini önlerler, bakteriyi doğrudan doğruya öldüremezler. Sulfonamidler, tetrasiklinler ve makrolidler, bu grup antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (Zhang, 2007; Carvalho, David ve Silva, 2012).

Bakterisid olanlar: Bu antibiyotikler, bakterinin hücre duvarına veya hücre içerisine etki göstererek doğrudan bakteri hücresini yok ederler. Penisilinler ve florokinolonlar bu grup antibiyotiklere örnek gösterilebilir (Zhang, 2007; Carvalho, David ve Silva, 2012). Bakteriyostatik ve bakterisid ilaç örneklerinden bazıları Şekil 1.1'de verilmiştir:

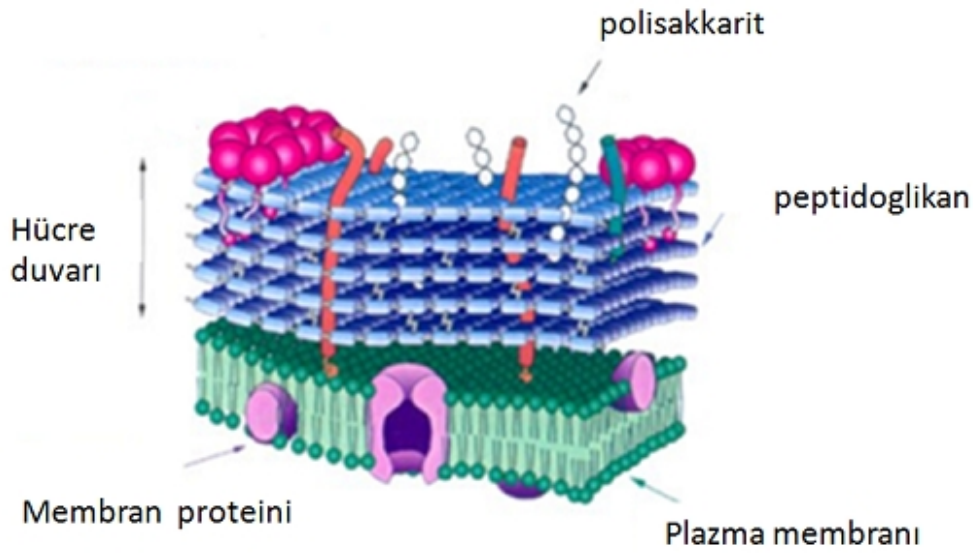


Şekil 1.1 Antibiyotiklerin etki derecelerine göre sınıflandırılması

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre beş gruba ayrılırlar (Zhang, 2007):

1. <u>Bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive edenler:</u>

Bakteri hücresi, bütün hücrelerde olan lipoprotein yapısındaki sitoplazma membranına ek olarak bu membranın dış yüzünü çevreleyen sert bir hücre duvarına sahiptir (Şekil 1.2). Hücre duvarının ana maddesi, murein adı verilen bir polimer bileşiktir. Bu madde, lineer peptidoglikan zincirlerinin yan dallarla birbirine bağlanması sonucu oluşur. Bakteri hücre duvarı peptidoglikan yapısı ile etkinliğini gösterir. Bazı antibiyotikler, bakteri hücre duvarının sentezi ile ilgili biyokimyasal reaksiyonları bozarlar. Hücre duvarı oluşamadığı için bakteri hücresi ölür. Bu tip antibiyotikler, gelişmesini tamamlamış olan bakterilerde etkili değillerdir; çünkü bu bakterilerde hücre duvarı oluşumu tamamlanmıştır. Bu ilaçlar, özellikle gelişmekte ve üremekte olan bakteriler üzerinde bakterisid etki gösterirler (Kayaalp, 2009; Carvalho, David ve Silva, 2012) .



Şekil 1.2 Bakteri hücre duvarı yapısı

2. Sitoplazma membranın geçirgenliğini bozanlar (Deterjan etkisi yapanlar):

Sitoplazma membranı, osmotik bir engel görevi görür. Bakteri için gerekli olan maddeler ortamdan, sitoplazma membranına pasif difüzyon veya aktif transport ile geçerek alınırlar. Yüzey aktif antibiyotikler sitoplazma membranının geçirgenliğini arttırarak, sitoplazma içindeki önemli etkiye sahip küçük moleküllü bileşenlerin (aminoasitler, nükleotidler gibi) hücreden dışarı sızmalarına neden olurlar ve bakterisid etki meydana getirirler. Bu antibiyotikler, hücre duvarı sentezini bozan antibiyotiklerin aksine, gelişmesini tamamlamış olan bakterileri de öldürürler (Kayaalp, 2009).

3. Ribozomlarda protein sentezini bozanlar:

Bu grupta bulunan antibiyotiklerin antibakteriyel spektrumları oldukça geniştir. Hem peptidoglikan hücre duvarı daha kalın, dolayısıyla boya tutma kuvvetleri fazla olan gram-pozitif hem de peptidoglikan tabakası ve bunun dışında yer alan lipopolisakkarit yapılı zar arasında periplazmik boşluk denen bir boşluk içeren gram-negatif mikroorganizmaların gelişimini inhibe ederler. Birçoğu bakteriyostatik, aminoglikozidler gibi bazı türleri ise bakterisid etki yaparlar. Bu şekilde etki gösteren antibiyotikler, bakterlerin 30S ve 50S ribozomal alt ünitesine bağlanırlar ve burada RNA tarafından yönetilen protein sentezini bozarlar (Kayaalp, 2009; Carvalho, David ve Silva, 2012).

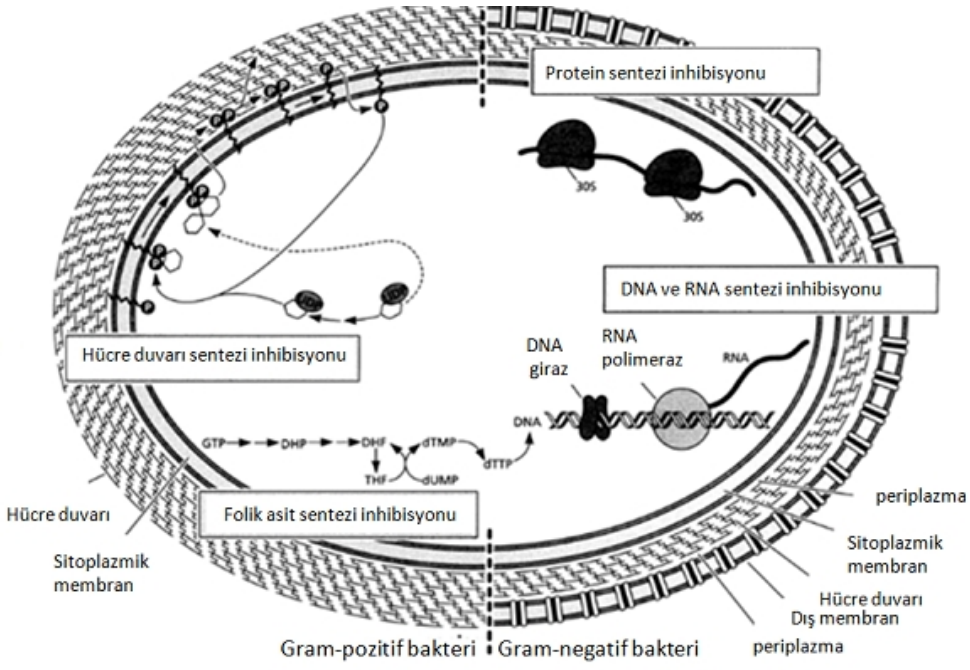
4. Bakteri genetik materyali üzerine etki yapanlar (DNA ve RNA sentezini bozanlar):

Bu gruptakilerin büyük kısmı memeli hücresinin çekirdeğini de etkilediklerinden dolayı sitotoksik ilaçlardır. Aktinomisinler, rifamisinler, kinolonlar, mitomisinler bu şekilde etkinlik gösteren antibiyotiklere örnektir. Aktinomisinler ve rifamisinler, DNA'nın oluşturduğu kalıba göre, RNA polimeraz enzimi yardımıyla genetik materyalde yapılan DNA sentezini (transkripsiyon) inhibe ederler. Kinolonlar, DNA giraz enzimini inhibe ederler, DNA için gerekli bu enzimin inhibisyonu, DNA

fonksiyonlarını bozar ve bakterinin ölümüne neden olur. Mitomisin ve diğer benzer antibiyotikler ise, dialkilleme yolu ile DNA çift zincirindeki DNA moleküllerinin çapraz bağlanmasına neden olur ve birbirinden ayrılmalarını önleyerek DNA replikasyonunu engellerler (Kayaalp, 2009).

5. <u>Folik asit sentezini inhibe ederek etki edenler:</u>

Bakteri hücresi, DNA sentezi için gerekli olan folik asidi kendisi sentezler. Sulfonamid ve trimetoprim gibi antibiyotikler, DNA ve RNA oluşumunu sağlayan nükleotitlerin biyosentezinden sorumlu kofaktör görevi gören folik asit sentezi için gerekli olan bazı enzimlerin sentezini önleyerek antimikrobiyal etki gösterirler (Dzidic, Suskovic ve Kos, 2008; Chung, Lee, Chung ve Lee, 2009). Antibiyotiklerin etki mekanizması Şekil 1.3'te özetlenmiştir.



Şekil 1.3 Antibiyotik etki mekanizmaları (Walsh, Trauger, Courvalin ve Davies, 2011)

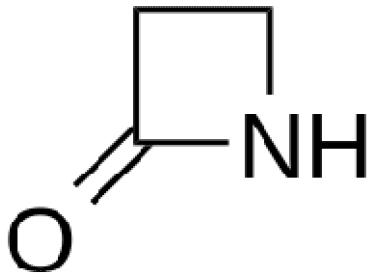
Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması ise Tablo 1.1'deki gibidir. Benzer kimyasal yapıya sahip antibiyotikler, genellikle benzer toksisite ve alerjik etkinlik gösterirler.

Tablo 1.1 Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması

Aminoglikozitler	İmidazoller
Fenikoller	**"Beta-laktam antibiyotikler"**
Sulfonamidler	Nitrofuranlar
Tetrasiklinler	Polipeptidler
Linkozamidler	Rifamisinler
Makrolidler	Florokinolonlar

1.2 Beta-Laktam Antibiyotikler

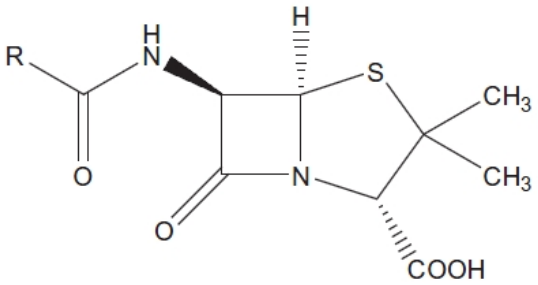
Molekülünün çekirdek kısmında antibakteriyel etkinlikten sorumlu olan beta-laktam halkası içeren antibiyotiklere beta-laktam antibiyotikler denir. Beta-laktam halkası biri azot, üçü karbondan oluşan 4 üyeli bir halkadır (Kayaalp, 2009), (Şekil 1.4).



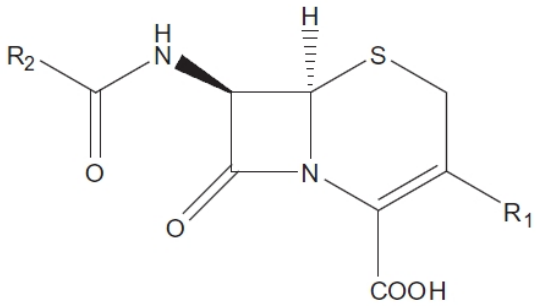
Şekil 1.4 Beta-laktam halkası

Beta-laktam antibiyotikler, çok çeşitli semisentetik penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemlerden oluşur (Lara, Iruela, Blanco, Molina ve Campaña, 2012). Bu grubun üyelerinin ortak özelliği, tümünün bir beta-laktam halkasına sahip olması, etki mekanizmaları ve direnç yollarıdır (Briscoe, McWhinney, Lipman, Roberts ve Ungerer, 2012). Sahip oldukları beta-laktam halkası; antibakteriyel aktivite, kimyasal ve farmakolojik özelliklerindeki önemli farklılıkların oluşumuna neden olan değişen yan zincirlerlerden sorumludur. Örneğin; penisilinler, beta-laktam halkasına bağlı, beş üyeli tiyazolidin halkasına

sahip iken (Şekil 1.5), sefalosporinler bu halkaya bağlı altı üyeli dihidrotiyazin halkasına (Şekil 1.6) sahiptirler (Cha, Yang ve Carlson, 2006).

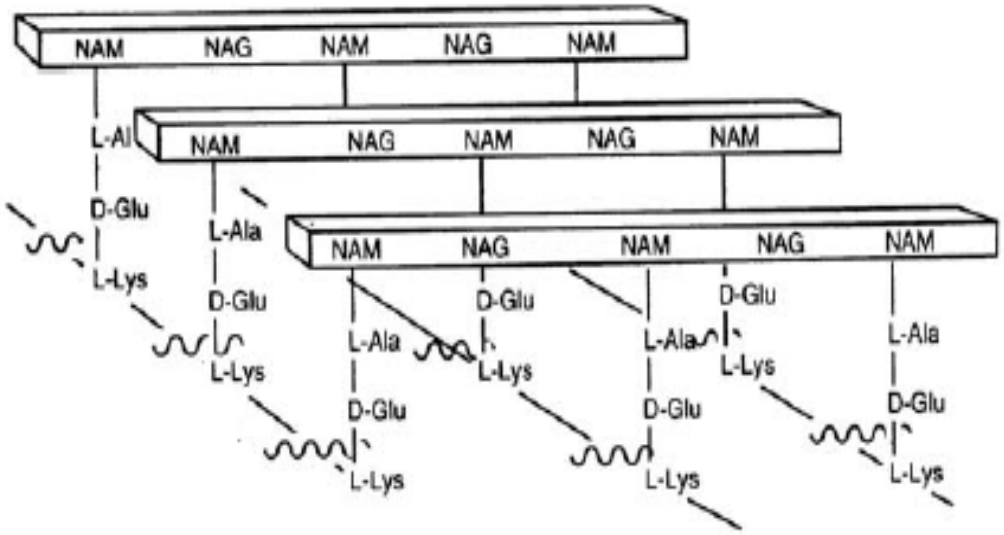


Şekil 1.5 Penisilinlerin kimyasal yapısı (Lara ve diğer., 2012)

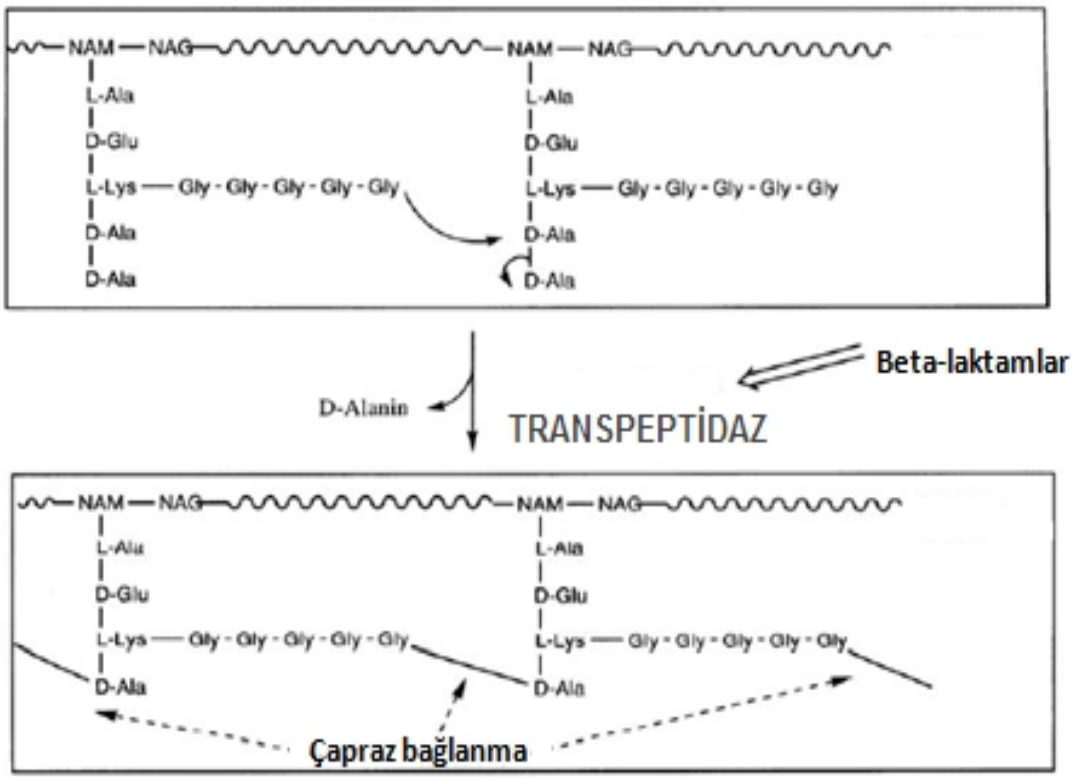


Şekil 1.6 Sefalosporinlerin kimyasal yapısı (Lara ve diğer., 2012)

Beta-laktam antibiyotikler, bakterilerin hücre duvarı sentezinden sorumlu olan penisilin bağlayıcı protein (PBP)'lere bağlanarak peptidoglikan molekülündeki (Şekil 1.7) N-asetilmuramikasit-N-asetilglukozamin yapıları arasındaki çapraz bağlanmayı katalizleyen transpeptidaz aktivitesini bloke ederek peptidoglikan sentezini engellerler (Mandell, Bennett ve Dolin, 2000; Lamar ve Petz, 2007), (Şekil 1.8). Bunun sonucunda bakteri, hücre duvarı sentezini yapamaz ve ölür (Wang ve diğer., 2012).



Şekil 1.7 Peptidoglikan yapısı

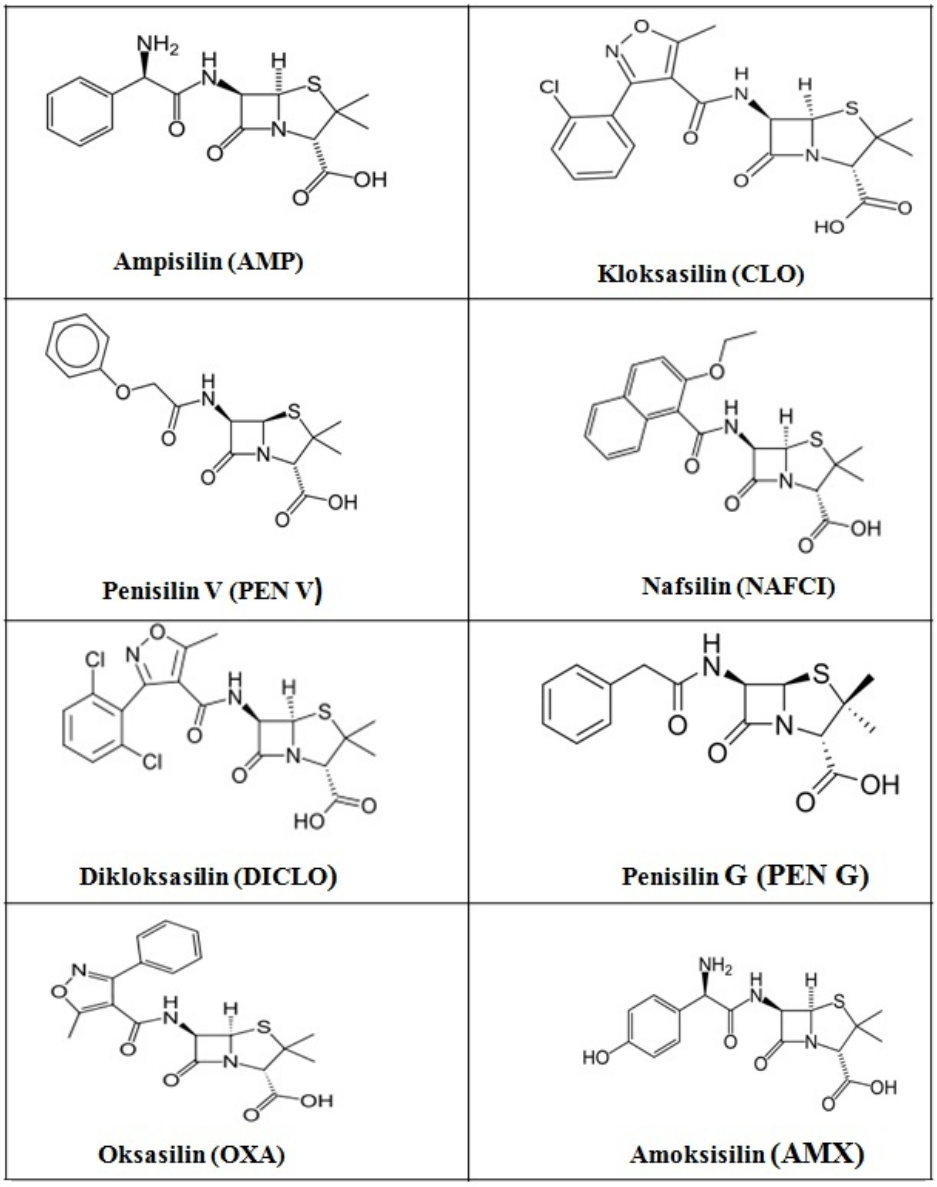


Şekil 1.8 Beta-laktam antibiyotiklerin etki mekanizması

Beta-laktam antibiyotikler, hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı etki göstermeleri nedeniyle uzun yıllardan beri kullanılan en yaygın antimikrobiyal ilaçlardır ve hala günümüzde en önemli antibiyotik grubunu oluştururlar (Lara ve diğer., 2012).

1.3 Penisilinler

Penisilinler, enfeksiyonların tedavisinde yaygın şekilde kullanılan en eski ve en önemli antibiyotik grubudur ve beta-laktam grubu antibiyotiklerin bir üyesidir (Samanidou ve Evaggelopoulou, 2007). Doğal penisilin (benzilpenisilin), 1928'de Alexander Fleming tarafından *Penicillium notatum* türü mantarın çevresinde stafilokokların üreyememesini gözlemlemesi ile tesadüfen keşfedilmiş ve 1942'de ilk kez klinik uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır (Raynor, 1997; Samanidou, 2006). Bakteriyel özelliklerinin iyi olması, tüm vücuda dağılabilmeleri, ucuz olmaları ve toksik etkilerinin diğer antibiyotiklere göre daha az olması bu ilaç ailesini son derece önemli hale getirmektedir. Ancak ilaç endüstrisinde devrim yaratmış olmalarına rağmen tüm bakterilere karşı etkili olamamaları ve bazı bakteri türlerine direnç geliştirmeleri de önemli problemlere sebebiyet vermektedir. Şekilde penisilin grubu bazı antibiyotikler örnek olarak verilmiştir (Şekil 1.9).

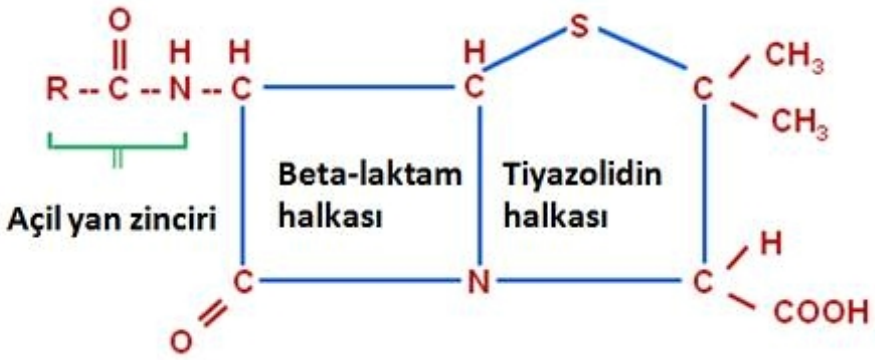


Şekil 1.9 Penisilin grubu bazı antibiyotikler

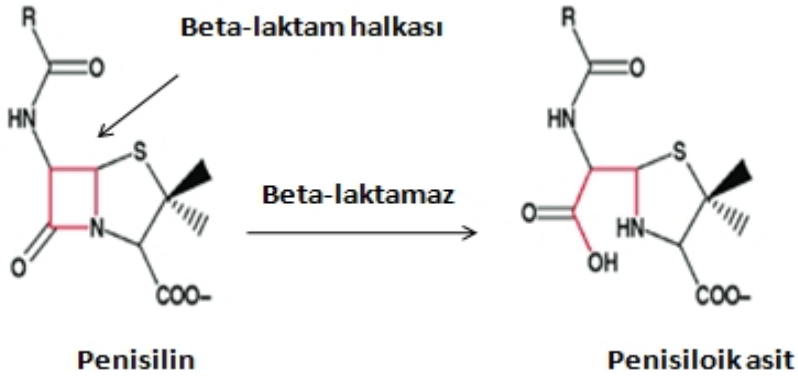
1.3.1 Penisilinlerin Kimyasal Yapısı ve Genel Özellikleri

Tüm penisilinlerde temel yapı, 6-aminopenisilanik asittir (6-APA). 6-APA; bir tiyazolidin halkası, buna bağlı bir beta laktam halkası ve yan zincirden oluşur (Raynor, 1997). Tiyazolidin halkasına bir karboksil (-COOH) ve beta-laktam halkasına da bir amin (NH_2) grubu bağlanmıştır (Şekil 1.10). Penisilinlerin çoğunda karboksil grubu serbesttir, bu yüzden penisilinler asidik bileşiklerdir (Kayaalp,

2009). Beta-laktam halkasına bağlı olan sekonder amin grubuna (NH_2) çeşitli R grupları bağlanarak farklı özelliklerde penisilinler elde edilir. R grubunun değişimi, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel spektrumun etkinliğini değiştirir (Samanidou ve Evaggelopoulou, 2007). Eğer 6-APA'nın beta-laktam halkası, beta-laktamaz enzimleri tarafından açılırsa, bu maddeden penisiloik asit meydana gelir (Şekil 1.11). Penisiloik asit, penisiline karşı antikor oluşmasında ve alerjik reaksiyonların başlamasında etki gösterir (Kayaalp, 2009).



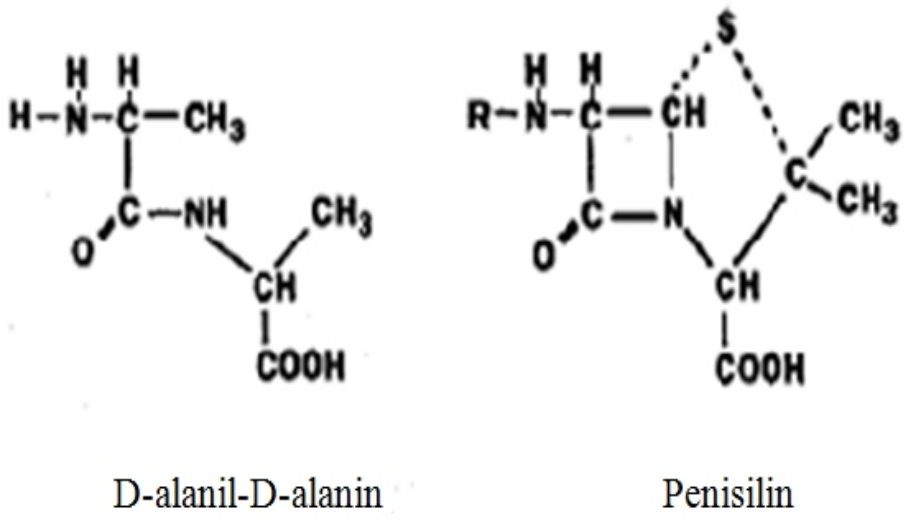
Şekil 1.10 Penisilinlerin temel yapısı



Şekil 1.11 Penisilinlerden beta-laktamaz enzimleri ile penisiloik asit oluşumu

1.3.2 Penisilinlerin Antibakteriyel Etkinliği

Penisilinler, diğer beta-laktam antibiyotikler gibi insan vücudunda çeşitli enfeksiyonlara neden olan bakterilerin çoğalmasını engelleyici veya bu bakterileri yok edici (bakterisid) etkiye sahiptir (Soares ve diğer., 2012). Penisilinler, bakterinin hücre duvarı sentezi esnasında, bu işlemden sorumlu olan transpeptidaz enziminin, penisilin bağlayan proteinlerle etkileşerek baskılanması sonucu peptidoglikan sentezini inhibe eder ve bakteri hücre duvar bütünlüğünü bozar (Soares ve diğer., 2012). Çünkü penisilin, peptidoglikanın son bağlantı ucundaki D-alanil-D-alanin yapısına benzer yapıdadır ve bu durum, PBP için bir çeşit substrat görevi görmesini sağlar (Soares ve diğer., 2012), (Şekil 1.12). Peptidoglikan, çapraz bağlanmanın katalizinin gerçekleşmesi için artık uygun olmadığından bu işlem engellenir ve hücre duvarı bütünlüğü için gerekli olan bileşenler sentezlenemez (Samanidou, Evaggelopoulou ve Papadoyannis, 2006).



Şekil 1.12 Penisilin ile D-alanil-D-alanin arasındaki yapı benzerliği (Kayaalp, 2009).

1.3.3 Penisilinlerin Sınıflandırılması

Penisilin antibiyotik grubu ailesi, antibakteriyel spektrumlarının etkinliğine göre üç temel grupta toplanırken (dar, genişçe ve geniş spektrumlu) kimyasal yapılarına bağlı olarak altı temel grupta incelenir (Tablo 1.2). Bunlar;

1. Doğal penisilinler

- Penisilin G tuzları ve esterleri
- Fenoksipenisilinler (penisilin V vb.)

2. Beta-laktamazlara (penisilinazlara) dirençli penisilinler

3. Aminopenisilinler

4. Karboksipenisilinler

5. Açilüreidopenisilinler

6. Diğer penisilinler (Öncül, 2002).

1. Doğal Penisilinler

En dar spektrumlu etkiye sahip doğal penisilinler, oral yolla uygulanan penisilin V gibi fenoksipenisilinlerden ve sindirim dışı yolla uygulanan penisilin G tuzları ve esterlerindenden oluşur. Penisilin V, 6-APA çekirdeği üzerinde benzil grubunun yerine fenoksi (C_6H_5-O–CH_2) grubu içerir ve penisilin G'ye göre aside karşı daha dayanıklıdır. Bu ilaçlar, klinikte kullanıma sunulan ilk antibiyotiklerdir (Samanidou, Evaggelopoulou ve Papadoyannis 2006). Gram-pozitif bakterilere karşı etkin iken gram-negatif bakterilere karşı (*Salmonella, Shigella, Bordetella pertussis, Pseudomonas, Yersinia pestis*) etkili değillerdir (Samanidou, Evaggelopoulou ve Papadoyannis 2006).

2. Beta-laktamazlara (penisilinazlara) dirençli penisilinler

Beta-laktamaz üreten bakteriyel türlerin ortaya çıkması ilk sentetik penisilinlerin üretimine yol açmıştır. Penisilin molekülüne büyük bir yan zincir eklenmesi ile etkinlik gösterebilen bu ilaç grubu, stafilokokların ürettiği beta-laktamaza dayanıklı olan penisilin grubudur. Stafilokoklar dışındaki bakterilerin üzerinde daha az etkinlik

gösteren ya da etkisiz olan, buna karşılık stafilokokların çoğunda etkili penisilin türleri oldukları için bu penisilinlere 'antistafilokoksik penisilinler' de denir (Öncül, 2002). Oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin, nafsilin, flukloksasilin ve metisilin bu gruba ait olan penisilinlerdir (Samanidou, Evaggelopoulou ve Papadoyannis 2006).

3. Aminopenisilinler

Aminopenisilinler, gram-negatif bakterilere karşı etkinlik gösteren ilk penisilin grubudur. Genişçe spektrumlu aktiviteye sahiptir (Samanidou, Evaggelopoulou ve Papadoyannis 2006). Benzilpenisilin molekülünün yan zincirinin α-karbonu üzerine bir amino grubunun getirilmesiyle oluşan türevlerdir (Kayaalp, 2009). *Proteus mirabilis, Escherichia coli* ve *Salmonella* gibi bakteri türlerine karşı etkinlikleri doğal penisilinlerden daha yüksektir (Khardori, 2006). Amoksisilin, ampisilin, episilin, talampisilin, etasilin ve bakampisilin bu grubun üyesi olan antibiyotiklerdir. Ampisilin ilk semisentetik penisilin olmakla beraber, ampisilin yapısına bir hidroksil grubu bağlanması ile amoksisilin meydana gelmiştir (Samanidou, Evaggelopoulou ve Papadoyannis 2006).

4. Karboksipenisilinler

Aminopenisilinler, geniş bir alanda aktivite göstermelerine rağmen, beta-laktamaz üreten organizmalara karşı etkili değillerdir. Aminopenisilinlere beta laktamaz inhibitörlerinin eklenmesi ile spektrum aktivitesi genişletilir. Bu grup antibiyotikler geniş spektrumlu aktivite gösterirler. Tikarsilin ve karbenisilin bu gruba ait penisilinlerdir (Samanidou, Evaggelopoulou ve Papadoyannis 2006).

5. Açilüreidopenisilinler

Ampisilinin semisentetik türevlerinin oluşturduğu penisilin grubudur. Ampisilinin amino grubu yerine açilüre grubu gelmesiyle oluşurlar (Kayaalp, 2009). Azlosilin, piperasilin ve mezlosilin grubun üyeleridir. Geniş spektrumlu olan bu antibiyotikler, komplike enfeksiyonların tedavisinde oldukça etkin olmasına rağmen, kullanım şekillerinden dolayı olumsuz yan etkilerin oluşma sıklığı daha fazladır (Samanidou, Evaggelopoulou ve Papadoyannis 2006). Direncin özellikle sorun olduğu *Pseudomonas* türleri ve enterokoklara karşı etkilidirler (Kayaalp, 2009).

6. Diğer penisilinler

Bu antibiyotik grubu içerisinde bir amidinopenisilin olan mesilinam ve temosilin yer alır (Kayaalp, 2009).

Tablo 1.2 Penisilinlerin antibakteriyel spektrumlarına göre sınıflandırılması

I.Dar Spektrumlu Penisilinler	II. Genişçe Spektrumlu Penisilinler	III. Geniş Spektrumlu Penisilinler
A. Pen-G ve depo penisilinler: ▪ Pen-G (Benzilpenisilin) ▪ Prokain Pen-G ▪ Takviyeli Prokin Pen-G ▪ Klemizol Pen-G ▪ Benzatin Pen-G	▪ Aminopenisilinler: ▪ Amoksisilin ▪ Ampisilin ve esterleri: *Bakampisilin * Pivampisilin *Talampisilin ▪ Hetasilin ▪ Siklasilin ▪ Episilin	A.Karboksipenisilinler ▪ Tikarsilin ▪ Karbenesilin ve esterleri: *Karindasilin *Karfenesilin
B.Fenoksi (Aside Dayanıklı) Penisilinler: ▪ Pen V (Fenoksimetil Penisilin) ▪ Fenetisilin (Fenoksietil Penisilin) ▪ Propisilin (Fenoksipropil Penisilin)		B.Açilüreido Penisilinler: ▪ Mezlosilin ▪ Azlosilin ▪ Piperasilin
C.Beta-Laktamazlara (Penisilinaz) Dayanıklı Penisilinler: ▪ Metisilin ▪ Nafsilin ▪ İzoksazolil Penisilinler: * Oksasilin * Kloksasilin * Dikloksasilin * Flukloksasilin		C.Diğer Penisilinler: ▪ Amidinopenisilinler *Amdinosilin (Mesilinam) ▪ Temosilin

1.3.4 Penisilin (Antibiyotiklerin) Metabolizması

Antibiyotikler, uygulandıkları andan itibaren vücuttaki çeşitli enzimlerin etkisine maruz kalırlar. Bu enzimlerin etkisi ile vücutta kimyasal değişikliklerin meydana gelmesi olayına ilaç metabolizması (biyotransformasyon) denir. Antibiyotikler, insanlar ve hayvanlar tarafından kullanıldıktan sonra yaklaşık %30 civarında metabolize edilebilir (Kümmerer ve Henninger, 2003; Gao, Munir ve Xagoraraki 2012). Biyotransformasyon sonucu antibiyotiklerin dönüştüğü daha etkili ya da daha etkisiz bileşiklere o ilacın metaboliti adı verilir. Antibiyotiklerin çoğu, vücutta birden fazla kimyasal reaksiyona maruz kaldığından dolayı genellikle birkaç çeşit metabolit oluşur (Kayaalp, 2009).

Antibiyotikleri metabolize eden enzimler vücuttaki bazı organlarda daha fazla bulunurlar. Çeşit ve miktar bakımından en fazla enzim içeren organ, karaciğerdir. Karaciğerde biyotransformasyon açısından en önemli enzimler, mikrozomal enzimlerdir. Karaciğerin yanında, akciğerler, mide-barsak kanalı mukozası ve böbreklerde de antibiyotiklerin biyotransformasyonu gerçekleşir (Kayaalp, 2009).

Penisilinlerin birçoğu metabolize olmadan böbreklerden tübüler salınım yolu ile atılır. Bunların vücuda giren miktarının ancak %10-20'si karaciğerde metabolize edilir. Nefrit veya nefroz gibi tubuluslardan salgılanmanın bozulduğu durumlarda, atılımın yavaşlayıp penisilinlerin vücutta birikimi söz konusu olabilir. Penisilinlerin birçoğundan farklı olarak, nafsilin; oksasilin ve penisilin V karaciğerde yarı yarıya metabolize edilir. Nafsilin büyük ölçüde safra içerisine itrah edilir ve safra/serum oranı oldukça yüksektir. Nafsilin kadar olmasa bile, ampisilin, amoksisilin ve açilüreidopenisilinler de safra içinde yüksek düzeyde bulunur (Kayaalp, 2009).

1.4 Veteriner İlaç Olarak Kullanılan Antibiyotikler

Antibiyotikler, ülkemiz ve tüm dünyada hayvansal gıda üretiminde en gerekli ve önemli unsurlardandır. Antibiyotikler, diğer veteriner ilaçları ile birlikte hastalıkları önlemek ve kontrol altına almak için 1950'lerden bu yana yem katkısı olarak kullanılmaya başlanmışlardır. Hayvanlarda paraziter hastalıklardan korunmada, büyümeyi destekleyici, hastalıkların sağaltımı ve önlenmesinde, verimin ve yemden yararlanmanın arttırılmasında, antibiyotiklerin rolü büyüktür. Bu ilaçlar genellikle hayvanların yemlerine ve içme sularına katılarak uygulanır (Choi ve Ryu, 1987; Dafwang, Cook ve Sunde, 1987; Johnston, 2000; Di Corcia ve Nazzari, 2002). Antibiyotiklerin yaklaşık %90'ı çiftlik hayvanlarında kullanılır ve kümes hayvanlarında subterapötik konsantrasyonlarda verilir. Bu oranın yaklaşık %70'i hastalıktan koruma ve %30'u ise büyümeyi destekleme amaçlıdır (Sawant ve diğer, 2005). Veteriner hekimlikte en sık kullanılan antibiyotikler; β-laktam grubu antibiyotikler (sefalosporinler ve penisillinler), tetrasiklinler, sulfonamidler, makrolidler, kloramfenikol, spektinomisin, linkozamid, nitrofuran, nitroimidazol, polimiksin, trimethoprim, kinolonlardır (Chafer-Pericas, Maquieira ve Puchades, 2010). Hayvanlara yüksek miktarda ilaç verilmesi, yem ve suyla beraber ilaç kullanılması ve geri çekme sürelerine uyulmaması gibi yapılan yanlış uygulamalar sonucu gıda maddelerinde kalıntılar oluşmaktadır. Antibiyotikler, hayvanlarda özellikle karaciğer ve böbrek gibi iç organlar ile hayvanın diğer organ ve kaslarında birikebilmekte; et, süt, yumurta gibi hayvansal ürünlerine de geçebilmektedir (Takatsuki, Ushizawa, ve Shoji, 1987; Cordle, 1988).

1.5 Kalıntı Kaynakları ve Kalıntıların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı, önlenmesi ve kontrolü ile büyüme ve gelişmenin hızlandırılması amacıyla doğrudan enjeksiyon yoluyla veya oral yolla uygulanan ilaç ve diğer kimyasal maddelerin kullanılmaları sonucu hayvanın doku ve organlarında biriken veya depolanan değişmemiş metabolitler, parçalanma ürünleri, serbest veya bağlı haldeki ilaç ve kimyasal madde miktarları kalıntı olarak adlandırılır (World Health Organization [WHO] 1988; Kaya ve Ünsal, 2007). Kalıntı yönünden antibiyotiklerin diğer farmakolojik etkili maddelere göre daha etkin olduğu

öngörülür. Bunun nedenleri, hayvanlara öngörülenden fazla miktarda ilaç uygulanması ve ilaç verilen hayvanların ilacın yasal bekletme süresine uyulmadan kesime sevk edilmesi olarak ifade edilir. Bunun sonucu, antibiyotiklerin tamamen metabolize olamaması ve vücuttan tamamen atılamamasına bağlı olarak hayvanların doku ve organları ile hayvanlardan elde edilen gıdalarda antibiyotik kalıntısı bulunabilmektedir (Mussman, 1975; Kaya ve Şahal, 1989). Antibiyotiklerin veteriner hekimlikte kullanılması, insan sağlığı açısından da ciddi boyutta tehlikeler ortaya çıkarabilmektedir. İlaç kalıntıları, insanlarda hafif bir alerjiden başlayarak, doku ve organlarda hasara ve anafilaktik şoktan ölüme kadar değişen şiddette etkilere yol açar. En sık meydana gelen reaksiyonlar, alerjik reaksiyonlardır. Düşük penisilin düzeylerinin dahi önceden duyarlı hale gelmiş bireylerde alerjik reaksiyonlar meydana getirebileceği deneysel verilerle öngörülmüştür (Gustafson ve Bowen, 1997). Bunun yanında insanlarda oluşan diğer reaksiyonlar; serum hastalığı, şok ve deri döküntüleri, ciltte şişlik, astım ve ateş türü durumlardır. Bu reaksiyonlar çok düşük dozda bile oluşabildiğinden, duyarlı bireyler gıda maddeleriyle aldıkları düşük miktarlardan dahi etkilenebilmektedirler.

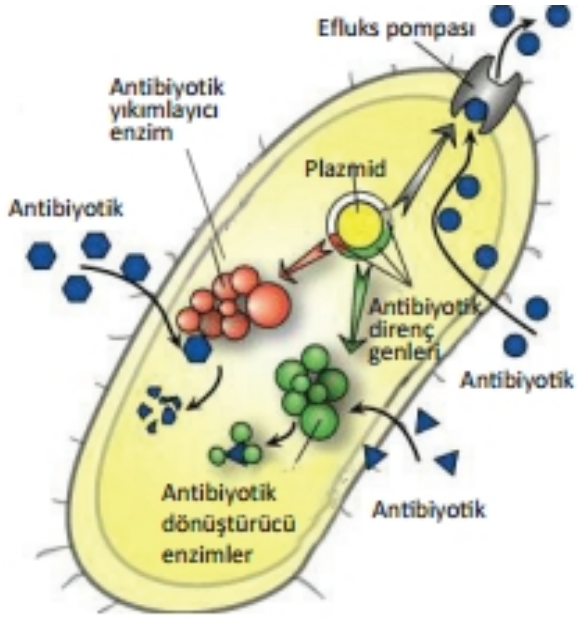
1.6 Antibiyotik Direnci

Direnç, bir bakteri veya mikroorganizmanın antimikrobiyal bir ilacın büyümeyi durdurucu veya yok edici etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. Direnç gelişimi ve yayılımı antibiyotiklerin amacına uygun olmayan şekilde yaygın olarak kullanımı ile artış göstermiştir. Antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanılması ile giderek artan sayıda mikroorganizmalar türemiş ve bunlardan meydana gelen sağlık sorunlarını önlemekte de sorunlar yaşanmaya başlanmıştır (Kayaalp, 2009). Direncin, doğal direnç, kazanılmış direnç ve çapraz direnç gibi çeşitleri vardır (Soares ve diğer., 2012). Bazı bakteri türleri, belirli bir antibiyotiğe kendiliğinden dirençlidir ve ilaçtan etkilenmez. Buna doğal direnç denir. Örneğin penisilin G, tetrasiklinler, kloramfenikol ve sulfonamidler, 1960'lardan önce tedaviye giren antibiyotiklere doğal direnç gösterir. Bazı durumlarda ise, bakteri antibiyotik ile ilk etkileşime girdiği zaman ilaç bakteri üzerinde etkinlik gösterir ancak, temas süresi boyunca bakteri ilacın antibakteriyel etkisine karşı direnç geliştirir. Buna ise kazanılmış direnç

denir. Bir antibiyotik çeşidine karşı duyarlılığını kaybetmiş olan bakteri türü, bu ilaca yakın kimyasal yapıda olan veya farklı yapıda fakat benzer etki mekanizmasına sahip olan bir antibiyotiğe de direnç kazanabilir. Bu da çapraz direnç olarak adlandırılır. Örneğin, oksatetrasikline direnç kazanan bir bakteri bu maddeye benzer kimyasal yapıda olan tetrasikline karşı da direnç kazanmış olur (Miranda ve Zemelman, 2002; Kayaalp, 2009).

1.6.1 Penisilin Direnci

Başlangıçta, penisilinler insanlarda enfeksiyonların oluşmasından sorumlu olan stafilokok ve streptokoksi türü iki bakterinin neden olduğu tüm enfeksiyonlara karşı oldukça etkinlerdi. Ancak, penisilinler birçok farklı sebepten dolayı bakteri direncinin artışı ile karşı karşıya kaldılar. Penisilin üretiminin gerçekleşmesinden hemen sonra, stafilokok bakteri türlerine karşı doğal penisilin direnci gelişmiştir. Bu durum, patojenlerin neden olduğu bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde penisilinlerin fayda sağlamamasına ve bu antibiyotik grubunun yerini yeni antibiyotik gruplarına vermesine neden olmuştur (Samanidou, Evaggelopoulou ve Papadoyannis 2006). Bakteri, bir veya daha fazla mekanizma izleyerek bakteri direnci gösterebilir. Bakteri, ilacın hedefinden uzaklaşmak için çeşitli yollar geliştirir ya da bakteri hücre duvarının penisilinlere karşı geçirgenliğini azaltır ve antibiyotik, dış membranı geçemeyerek hedefine ulaşamaz. Penisilinlere karşı diğer bir bakteri direnç mekanizması ise bazı bakteri türlerinin beta-laktamaz enzimi üretmesidir. Bu beta-laktamaz, bakterinin beta-laktam halkasının karbonil kısmına atak yaparak antibiyotiğin aktivitesini kaybetmesini sağlar (Samanidou, Evaggelopoulou ve Papadoyannis 2006).



Şekil 1.13 Antibiyotiklerin direnç mekanizması

1.7 Maksimum Kalıntı Limitleri (MRL)

Maksimum kalıntı limiti (MRL), insan ve hayvan besini olarak kullanılan ürünler üzerinde bulunmasına izin verilen kalıntı miktarıdır (World Health Organization [WHO], 2005). Gıdalarla birlikte alınabilecek ilaç kalıntıları ve onların metabolitlerinin sağlık açısından herhangi bir riske neden olup olmadığının izlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Gıdadaki ilaç kalıntılarının kontrolünün yapıldığı tüm ülkelerde MRL'lere bağlı olarak arınma süreleri kullanılmaktadır. Eğer belli bir veteriner ilacı için belirlenmiş MRL değeri yok ise, söz konusu gıda maddelerinde bu ilaç kalıntısının bulunmaması gerekir (Avrupa Birliği Halk Sağlığı, 1990).

Tablo 1.3 Bazı Penisilinlerin Maksimum Kalıntı Limitleri (Avrupa Birliği Halk Sağlığı, 1990).

Antibiyotikler	**MRL (ppb)**
Penisilin G	4
Ampisilin	4
Amoksisilin	4
Kloksasilin	30
Dikloksasilin	30
Oksasilin	30

1.8 Kalıntı Tayininin Önemi

Besinlerdeki veteriner ilaç kalıntılarının sebep olduğu zararlı etkilere karşı insan sağlığının korunabilmesi için öncelikli olarak bilimsel bir kalıntı izleme metodu geliştirilmelidir. Bu sayede, halk sağlığının korunması sağlanır ve bunun yanında besin endüstrisi ve tüketiciler için önemli olan hayati bilgilere ulaşılabilir. Ayrıca, böyle bir izleme ve kontrol sistemine sahip olan ülkenin besinlerinin güvenli olduğuna inanılması ihracatı arttırarak ülkeye ekonomik yönden kazanç sağlar (World Health Organization [WHO], 2005)**.** Gıdalardaki veteriner ilaç kalıntılarının tamamen ortadan kaldırılması mümkün olamayacağından, kalıntıların ve insan sağlığına olan olumsuz etkilerin azaltılabilmesi için bazı hususlara dikkat edilmelidir. Besin değeri olan hayvanlarda, ulusal otoritelerce tescil edilmiş olan, ruhsatlı, kullanım ve depolama şekli belli olan veteriner ilaçları kullanılmalıdır. Bu kullanım, yasal olarak belirlenmiş olan ve etiketlerinde de bulunan uygulamalara uygun şekilde gerçekleştirilmelidir. Hayvanlara uygulanacak olan maksimum ilaç dozu, sağaltım süreleri, son ilaç uygulamasına göre kesilmeme süreleri ve et, süt, yumurta gibi besinlerinin tüketilmeme sürelerinin bilinmesi gereklidir (Kaya ve Ünsal, 2007). Veteriner ilaçların hayvanlarda bilinçli ve kontrollü bir şekilde kullanımının sağlanması ile hayvansal kaynaklı besinlerdeki ilaç kalıntılarının neden olduğu olumsuz etkiler en aza indirgenebilir. Bu amaçla, bilimsel ve yasal denetim

temelinde, kalıntıların ve zararın azaltılması yönünde gerekli önlemler tam olarak uygulanmalıdır (Kaya ve Ünsal, 2007).

1.9 Antibiyotik Kalıntılarının Analizinde Kullanılan Yöntemler

Hayvansal gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntılarının, insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı, hayvansal dokuların analizlerinin yapılması oldukça önem kazanmıştır. Hayvansal gıdaların antibiyotik kalıntılarından arındırılması amacıyla uygulanması gereken, "yasal bekletme süresi'', ilaçla tedavinin durdurulması ve besinlerde bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı miktarının belirlenmesi amacıyla yapılan analizler, toplum sağlığı ve gıda güvenliği yönünde yapılan çalışmalara büyük katkı sağlamaktadır (Booth ve Harding, 1986). Kalıntı analizlerinde kullanılan bazı metotları şöyle özetleyebiliriz.

1. <u>Mikrobiyal İnhibisyon Analizleri</u>

Mikrobiyal inhibisyon analizleri, numunedeki duyarlı bir organizma (genellikle bakteri) ve antibiyotik arasında özel bir reaksiyona bağlı olarak gerçekleşen kalitatif veya yarı kantitatif metotlardır. Bu analizlerin avantajları; güvenilir, az maliyetli ve basit olmalarıdır. Mikrobiyolojik testler, immünolojik ve enstrümental analizlere kıyasla, antibakteriyel aktiviteye sahip her bir antibiyotik veya metaboliti belirleme özelliğine sahiptir (Pico ve Barcelo, 2008). Bu testlerin en büyük dezavantajı ise, spesifik olmayışı ve bazı zamanlarda uzun inkübasyon zamanları gerektirmesidir.

2. <u>İmmünolojik Yöntemler</u>

İmmünolojik yöntemler, gıdalardaki kontaminantlar hakkında geniş bilgi verebilen, kimyasal metotlara göre çok daha ucuz, çalışma aşamaları kolay, otomasyon ve organik maddelerin daha az kullanıldığı yarı kantitatif metotlardır. Bu yöntemler, antikor ve antijen arasındaki özel bir reaksiyona bağlı olarak gerçekleşir (Meng ve Xi, 2011). Genelde ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) veya EIA (Enzyme-Immuno Assay) olarak tanımlanan bu testler, fiziksel-kimyasal testlerle karşılaştırıldığı zaman nispeten daha kolay, daha hızlı ve daha çok örnekle çalışılan

testlerdir (Scheinder ve diğer., 1994). ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), hedef moleküle özel geliştirilmiş antikorların kullanılmasından dolayı yüksek spesifiteye sahip ve son derece hassastır. Metodun spesifitesinden dolayı hem analiz sonuçlarının güvenilirliği yüksektir, hem de kolay numune hazırlama yöntemleri içermesinden dolayı kısa zamanda çok sayıda numunenin farklı ilaç kalıntıları için analizi mümkündür (Wang, MacNeil ve Kay, 2012). Tipik bir ELISA kiti, hedef veteriner ilacına karşı geliştirilmiş olan antikorlarla kaplı, 96 kuyucuktan oluşur. Analizin tamamı, belli miktar numune ekstraktı ve bunu takiben bir dizi reaktif eklenerek ve daha sonra yıkama yapılarak, bu kuyucuklar içerisinde gerçekleştirilir. Analiz sonucunda oluşan renk spektrofotometre yardımı ile okunarak miktar tayinine gidilir (Wang ve diğer., 2012).

3. Biyosensörler

Biyosensör, sözlük anlamıyla herhangi bir organizmanın, mikroorganizma, enzim sistemi veya diğer biyolojik yapıların indikatör olarak veya örnek olarak kullanılmasıdır (Lawrence, 1992). Bir biyosensör, biyolojik algılayıcı elementin seçiciliği ve hedef analitin konsantrasyonuyla orantılı olarak sinyal üreten transduserin kombinesinden oluşan bir cihazdır. Bu sinyal, proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak ve oksijen gibi gazların salınması ya da yükseltgenmesi, ışık emisyonu, absorbsiyon, ısı emisyonu, kütle değişimi ve bunun gibi değişimlerden kaynaklanır (Wang ve diğer., 2012). Et ve süt ürünlerinde ilaç kalıntıları, hormonlar, antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi ve gıdaya bulaşan Salmonella, Listeria ve Staphylococus gibi çeşitli mikroorganizmaların belirlenmesi biyosensörler tarafından gerçekleştirilebilmektedir. Kromatografik yöntemlerle karşılaştırıldığında biyosensörlerin iki avantajlı yönü yüksek seçicilik ve hızlı cevap süresidir (Wang ve diğer., 2012).

4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirine karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Kromatografik yöntemlerden ince tabaka kromatografisi (TLC),

kimyasal bileşikleri ayırmada kullanılan, çözücü gücü yüksek ve hızlı sonuç verebilen bir yöntemdir. Bu yöntem; cam, plastik veya alüminyum bir yüzey üzerine ince bir tabaka halinde kaplanmış sabit faz ile onun üzerinde ilerleyen hareketli faz arasında örneğe ait karışımın içindeki bileşenlerin kromatografik olarak ayrımı şeklinde gerçekleşir. TLC'nin, basit ve yalın bir teknik olduğu, maliyetinin ucuz olması nedeniyle gelişmiş tekniklere alternatif olabileceği ortaya çıkmıştır. Optimum çalışma koşulları sürekli olarak sağlanabildiği ölçüde ve adapte edilmiş olan kalıntı metodunun belirli aralıklarla validasyonu yapıldığı sürece, TLC, veteriner ilaç kalıntı analizlerinde güvenilir bir şekilde kullanılabilmektedir (Tiryaki, 2006). İnce tabaka kromatografisi; basit, ucuz, hızlı ve oldukça spesifik bir yöntemdir. Ancak bunun yanında tekrarlanabilirliği ve kararlılığı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kadar iyi değildir.

HPLC yöntemi, antibiyotik kalıntı analiz teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılan kromatografik yöntemlerden biridir. Kantitatif tayinlere kolay uyarlanabilir olması, sıcaklıkla kolayca bozunabilen ve uçucu olmayan türlerin ayrılmasına uygun olması, spesifik bir metot olması yaygın olarak kullanılmasındaki önemli faktörlerdir. En önemli özelliklerinden biri ise; sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun ilgili olduğu örnek maddelere karşı olan uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak; nükleik asitler, karbohidratlar, proteinler, aminoasitler, pestisitler ve antibiyotikler verilebilir.
HPLC'nin diğer tekniklere göre avantajları şöyle sıralanabilir:

* Hızlı analiz sağlaması ve yüksek ayrım gücüne sahip olması,
* Örnek madde gereksiniminin az olması,
* Otomasyona uygunluğu,
* Sürekli akış dedektörleri sayesinde küçük miktar maddelerin tayinine olanak sağlaması,
* Yüksek iç basınç ve kontrollü akış hızının sağlanabilmesi.

Bunun yanında HPLC ile yapılan analizler, sıklıkla kullanılan, çok duyarlı ve seçici olmasına karşın, oldukça zahmetli, yorucu ve pahalı analizlerdir (Wang ve diğer., 2006).

1.9.1 Kalıntı Analizi Öncesi Numune Hazırlama

Kimyasal analizi yapılacak olan serum, idrar, kan, plazma, su, toprak, hava ya da et, süt, yumurta gibi gıda numuneleri, genellikle aranan madde dışında birçok bileşenin de yer aldığı çok kompleks matriksler içerir (Stevenson, 2000). Bu kompleks matrikslerdeki istenen maddelerin ayrılması gereklidir ve HPLC gibi cihazlarla yapılacak olan analizlerden önce gerçekleştirilen örnek hazırlama işlemi bu nedenle oldukça önem taşır. Örnek hazırlama işlemine dayalı birçok kimyasal yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan en sık kullanılanı, sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemidir. Ancak bu yöntemin bazı dezavantajları vardır. Bunlar, fazla miktarda çözücü harcanması, gerekli saflığa sahip olmayan ekstraktların elde edilmesi, ekstraksiyon sırasında emülsiyon fazı oluşması ve çözücülerin yeterince ortamdan uzaklaştırılamaması gibi durumlardır. Örnek hazırlama işleminin basitleştirilmesi, zaman kaybının önlenmesi ve analiz maliyetinin azaltılması amacıyla, klasik metotlara alternatif olarak yeni bir teknik olan katı faz ekstraksiyon metodu (KFE) yaygın şekilde kullanılmaktadır (Pichon, 2000; Poole, Gunatilleka ve Sethuraman, 2000).

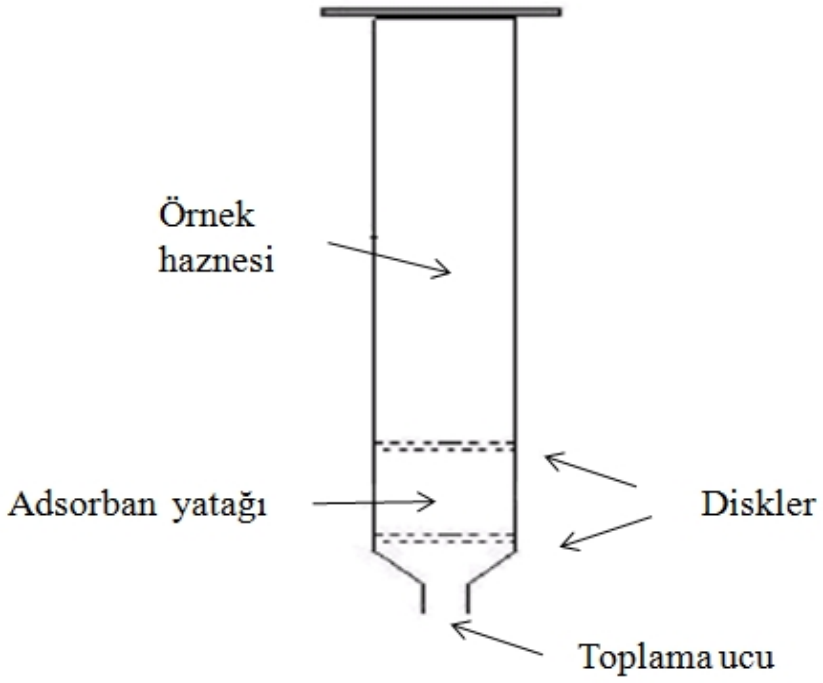
KFE yöntemi, temel olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzemekle beraber fazlardan biri katı diğeri sıvıdır. Bu işlem, sıvı örnek içerisindeki analitlerin, katı sorbentlere tutturulması ve örneğin tamamı katı sorbentten geçirildikten sonra uygun bir çözücü yardımı ile istenen analitlerin geri alınması ile gerçekleştirilen bir adsorpsiyon yöntemidir.

Bu yöntemi dört basamakla özetleyebiliriz.

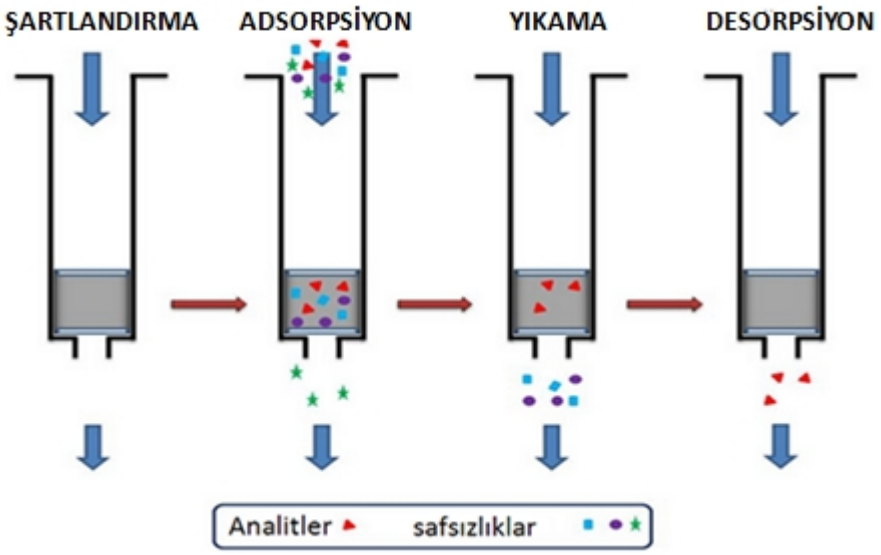
1. Birinci basamakta, katı sorbent uygun bir çözücü ile (hekzan, metanol, kloroform gibi) yıkanır. Bu işlem, istenmeyen safsızlıkların giderilmesini ve kolon dolgu maddesinin ıslanmasını sağlar. Daha sonra, sorbentin fonksiyonel gruplarının etkinleştirilmesi amacıyla uygun çözücü ile şartlandırılır. Polar olmayan tutucu maddeler, suyla karışabilen metanol, izopropanol gibi polar çözücüler ile polar olan tutucu maddeler ise polar olmayan çözücülerle şartlandırılmaktadır (Zief, 2005).
2. İkinci basamakta örneğin, sorbente tutturma işlemi gerçekleştirilir.

3. Üçüncü basamakta, uygun bir çözücü ile yıkama yapılarak, sorbent üzerinde kalabilecek matriks iyonları uzaklaştırılır.
4. Dördüncü basamakta, uygun bir desorpsiyon ajanıyla sorbent yüzeyinde tutunmuş olan örneğin ayrılması sağlanır.

Şekil 1.14 ve şekil 1.15'de kolon tipi adsorpsiyon çalışması örnek olarak verilmiştir.



Şekil 1.14 Adsorpsiyon kolonunun yapısı (Yavuz ve Aksoy, 2006)



Şekil 1.15 Kolon tipi adsorpsiyon yöntemi ile maddelerin ayrılma şekilleri

Katı bir sorbent yüzeyine adsorplama işlemi olan KFE metodunun diğer örnek hazırlama yöntemlerine, özellikle sıvı-sıvı ekstraksiyona kıyasla daha fazla tercih edilmesinin nedenleri ve önemli avantajlı yönleri şu şekilde özetlenebilir:

- Bu metot, klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine göre 2/3 daha hızlı sonuç verir ve örnek hazırlama süresinin oldukça kısalmasını sağlar.
- Çok pratik ve bütün laboratuarlarda kolaylıkla uygulanabilir bir metottur.
- Bu yöntemde daha az çözücü ve ayıraç madde kullanıldığından daha ekonomik bir örnek hazırlama yapılabilir.
- Desorpsiyon oranı yüksektir ve istenilen yoğunlukta örnekler elde edilebilir. En az düzeyde örnek transferi yapıldığından yüksek geri kazanımlar ile yüksek yoğunluk ve saflıkta örnekler elde edilebilmektedir.
- Örnek, adsorban (sorbent) ve çözücüler arasında çapraz bulaşma riski düşük olduğundan yüksek doğrulukta sonuçlar alınabilir.
- Çözücü ve örneklerin az miktarlarda kullanılmasından dolayı zehirli maddelerle temas daha azdır ve ayrıca daha az cam malzeme kullanılması nedeniyle analizi yapanlar için oldukça güvenli bir metottur. Ayrıca çevreyi kirletme riski daha düşüktür (Yavuz ve Aksoy, 2006).

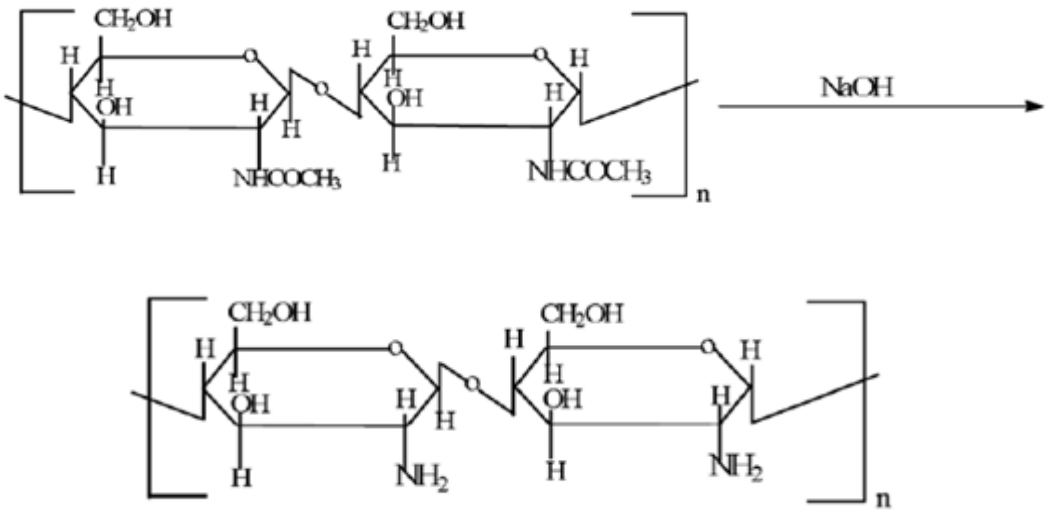
Katı sorbentin seçimi, adsorpsiyon metodunun geliştirilmesinde büyük öneme sahiptir. Genel olarak sorbentlerin sahip olması gereken özellikler;

- Hızlı ve kantitatif adsorpsiyon ve desorpsiyon
- Yüksek kapasite
- Yeniden kullanılabilirlik
- Kolay elde edilebilirlik
- Geniş yüzey alanı
- Örnek matriksine karşı kararlılık

Katı faz olarak kullanılan maddeler inorganik ve organik olmak üzere iki çeşittir. İnorganik sorbentlere örnek olarak, silika (SiO_2), alümina (Al_2O_3), magnezya (MgO), magnezyum silikat ($MgSiO_3$) verilebilir. Organik sorbentler ise, polimerik ve polimerik olmayanlar olmak üzere iki çeşittir. Karbon ve naftalin, polimerik olmayan adsorbanlara örnektir. Doğal ve sentetik olmak üzere iki sınıfa ayrılan polimerik olan adsorbanlar daha fazla tercih nedenidir ve kitosan, agaroz, polimetilmetakrilat, divinilbenzen, vinil piridin bunlardan bazılarıdır (Kinsella ve diğer., 2009).

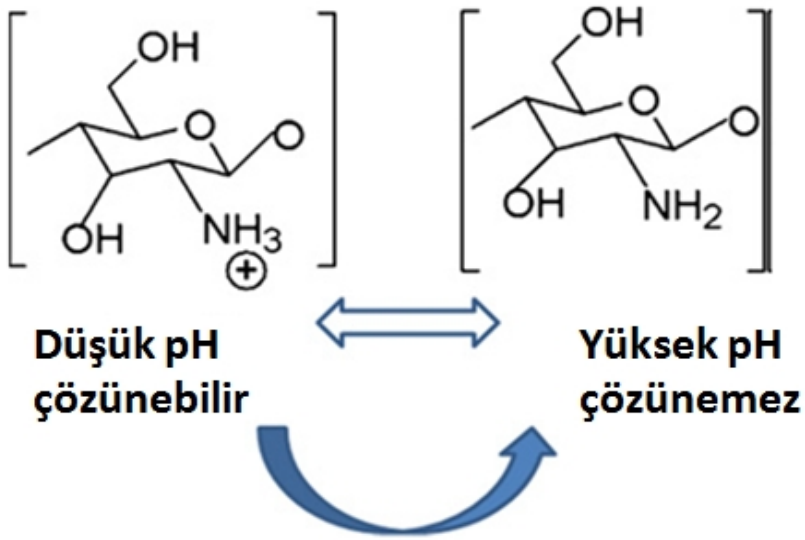
1.10 Kitosan

Kitosan [poli-β-(1-4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz], yengeç ve karides gibi eklembacaklıların kabuklarından izole edilen doğal bir polimer olan kitinin [β-(1-4)-poli-N-asetil- D-glukozamin] deasetillenmiş bir türevi olan ikinci en güçlü doğal biyopolimerdir (Kyzas, Kostoglou, Lazaridis, Lambropoulou ve Bikiaris, 2013). Toksik olmaması, biyouyumluluğu ve biyoparçalanabilirliği yüksek, adsorpsiyon özelliklerinin iyi olması sebebiyle kitosanın, çevre dostu bir adsorbent materyali olduğu kanıtlanmıştır ve yaygın şekilde kullanılmaktadır (Kyzas ve diğer., 2013) . Şekil 1.16'da kitinin deasetilasyonu ile kitosan oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 1.16 Kitinin deasetilasyonu

Kitosan alkali ve nötral pH'da çözünmez, ancak hidroklorik asit, glutamik asit, laktik asit ve asetik asit gibi asitlerle suda çözünebilen formlara dönüşür (Şenel ve McClure, 2004; Dash, Chiellini, Ottenbrite ve Chiellini, 2011), (Şekil 1.17). Asidik ortamda çözünmesiyle birlikte, polimerin amino grupları protonlanır, molekül pozitif yüklenir ve elektrostatik etkileşimlerle inorganik ve organik anyonlar kitosana daha kolay bir şekilde adsorplanabilir (Wei ve diğer., 2013). Kitosan, her glukozamin ünitesinde bir yüke sahip olduğundan yüksek yük yoğunluğuna sahiptir ve negatif yüzeylerle güçlü bir etkileşim gerçekleştirir (Şenel ve McClure, 2004; Dash ve diğer., 2011). Kitosanın etkinliğini arttırmak amaçlı, pH ve iyonik güç gibi özelliklerin ve deasetilasyon derecesinin değiştirilmesi yolu ile kitosan modifiye edilebilir (Şenel ve McClure, 2004; Dash ve diğer., 2011). Kitosanın bu modifikasyonunu sağlamak için değişik yüzey aktif maddeler kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın şekilde kullanılan ve çevre dostu olarak bilinen iyonik sıvılar, bu yüzey aktif maddelere örnek olarak verilebilir (Wei ve diğer., 2013).



Şekil 1.17 Düşük pH'da (pH<6) kitosanın amin gruplarının, kitosanın polikatyonik davranışı ile protonlanması ve yüksek pH'da (pH>6.5) kitosanın amin gruplarının deprotonlanması (Dash ve diğer., 2011).

Kitosanın adsorban olarak kullanıldığı birçok adsorpsiyon çalışması yapılmıştır. Çalışmaların çoğunda daha fazla verim elde etmek amacıyla kitosanın modifiye edilmiş hali kullanılmıştır. Aşağıda bu çalışmalardan bazılarına örnekler verilmiştir:

2012 yılında, Akın ve arkadaşları, doğal bir polimer olan kitosanı çapraz bağlayarak Fe_3O_4-kitosan nanoparçacıkların sentezini gerçekleştirmişler ve sentezlenen bu nanoparçacıkların ilaç adsorplama özelliğini, model ilaç olarak bir boyar maddeyi (Bromtimol mavisi) kullanarak incelemişlerdir. Kitosan nanoparçacıkların model ilaç kullanılarak yapılan adsorpsiyon çalışmalarında, nanoparçacıkların ilaç taşıyıcı amaçla kullanılabilir olduğu görülmüştür (Akın, Yakar ve Gündüz, 2012).

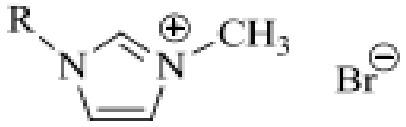
2013 yılında Kyzas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, çapraz bağlama yolu ile modifiye edilmiş yeni kitosan sorbentleri sentezlenmiş ve bu sorbentlerin atık sulardaki farmasötik kalıntıları uzaklaştırmak için etkili birer adsorban olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır (Kyzas, Kostoglou, Lazaridis, Bikiaris ve Lambropoulou, 2013).

2013 yılında yapılan bir diğer çalışmada, Telon Blue AGLF tekstil boyarmaddesinin kitosan üzerine adsorpsiyonu incelenmiştir. Adsorbent ve boyarmadde derişimi, sıcaklık ve pH'ın adsorpsiyon üzerine etkisi incelenerek optimizasyon koşulları sağlanmıştır. Aynı şekilde boya giderimi için de optimum koşullar elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu, kitosanın az maliyetli, temin edilmesi kolay ve yüksek miktarda renk giderici etkiye sahip olmasından dolayı boyarmaddelerin arıtımı için uygun bir adsorbent olarak kullanılabilirliğine karar verilmiştir (Önalan ve Gönen, 2013).

2010 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise, bakır (II); çinko (II); nikel (II); kadmiyum (II); civa (II); kurşun (II) ve krom (II) ağır metallerinin kitosan ve kitosan türevleri üzerine sıvı faz adsorpsiyonu uygulanarak adsorpsiyon kapasiteleri incelenmiştir. Ağır metallerin adsorpsiyon kapasitesi, gücü ve adsorpsiyon mekanizması, yani kitosan zincirindeki amino gruplarından kaç tanesinin ağır metal iyonu ile etkileşebildiği tartışılmış ve veriler değerlendirilmiştir (Wu, Tseng ve Juang, 2010).

1.11 İyonik Sıvılar

İyonik sıvılar, büyük organik katyonların, inorganik veya organik anyonlar ile zayıf etkileşimler sonucu birbirlerine bağlanmalarından meydana gelen tuzlardır (Şekil 1.18). Bu tuzları oluşturan organik katyonlara örnek olarak 1-alkil-3-metil-imidazolyum, anyonlara ise tetrafloroborat (BF_4^-) ve hekzaflorofosfat (PF_6^-) verilebilir (Berthod ve diğer., 2008). İyonik sıvılar oldukça iyi termal özelliklere, kimyasal ve elektrokimyasal kararlılığa sahiptirler. Çevre dostu olmaları nedeniyle "yeşil çözgen" olarak adlandırılırlar ve uzun zamandır geleneksel çözücülerin yerine tercih edilmektedirler (Sornein, Cannes, Naour, Mendes ve Hennig, 2011).



1-Alkil-3-metilimidazoliyum bromür

Şekil 1.18 İyonik sıvı yapısı

İyonik sıvıların oldukça fazla tercih edilmesini ve kullanılmasını sağlayan fiziksel özelliklerini şöyle sıralayabiliriz:

- Düşük buhar basınçlarına sahiplerdir ve uçucu değildirler. Yüksek sıcaklıkta çalışıldıklarında bile ortama zehirli bir etki bırakmazlar. Bu nedenle çevre dostu olarak adlandırılırlar.
- İyonik sıvılar pozitif ve negatif yüklü iyonların zayıf etkileşimlerle bağlanmasından meydana gelirler ve oldukça polar çözücülerdir. Bundan dolayı hem organik hem de inorganik maddeler için oldukça iyi çözücülerdir.
- Örneğin; yüzey aktif madde, yağ, protein, polisakkarit gibi inorganik maddeleri kolaylıkla çözebilirler (Welton, 1999).
- Organik çözücüler ile karışmazlar ve iki fazlı sistemler için susuz, polar alternatif sistemler meydana getirirler (Welton, 1999).
- Yüksek sıcaklıklarda çalışılan reaksiyon ortamlarında bozunmadan kullanılabilirler. Reaksiyon bitiminde kolayca ortamdan uzaklaştırılır ve tekrar tekrar reaksiyonlarda kullanılabilirler.
- Yanıcı değillerdir, güvenli şekilde kullanılabilirler. Hazırlanmaları kolay, maliyetleri düşüktür. Yüksek iyonik iletkenlik gösterirler.

1.12 Çalışmanın Amacı

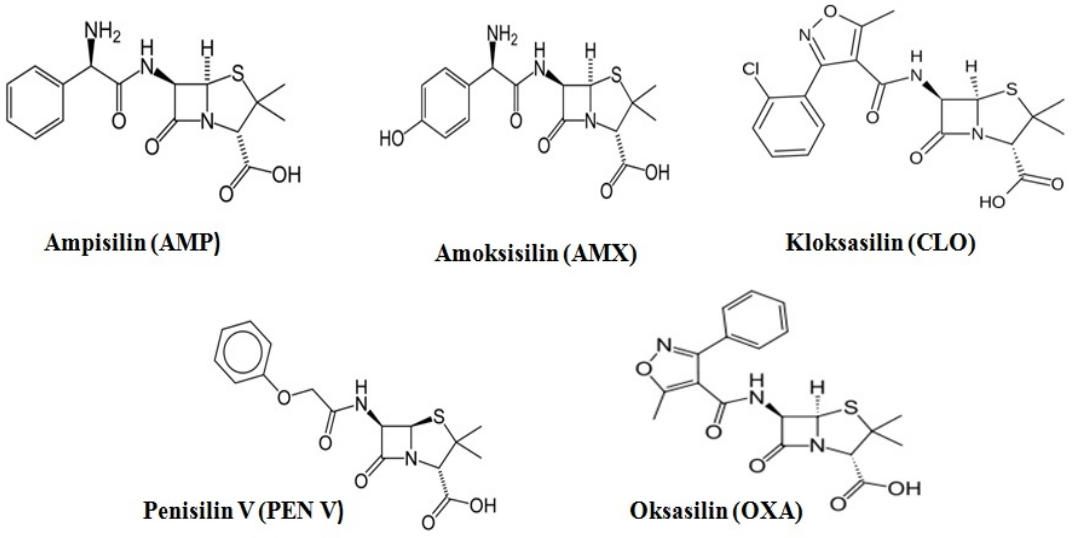
Bu çalışmada, hayvansal gıdalardaki penisilin grubu bazı antibiyotik kalıntılarının tayinine yönelik kitosan bazlı sorbentlerin hazırlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, sırasıyla şu yollar izlenmiştir:

1. Penisilin grubu bazı antibiyotiklerin, (amoksisilin, ampisilin, penisilin V, oksasilin ve kloksasilin) mobil faz; sıcaklık; çalışılan dalga boyu gibi kromatografik koşulları belirlenerek metot oluşturulması sağlanmıştır.
2. Belirlenen metoda göre, penisilinlerin HPLC'de kantitatif analizi gerçekleştirilmiştir.
3. Kitosanın iki farklı tür iyonik sıvı ile modifikasyonu sağlanarak yeni sorbentler hazırlanmıştır.
4. Adsorpsiyon işlemi öncesi optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışılan parametreler, ligand türü ve miktarı; adsorban miktarı; pH etkisi ve akış hızıdır.
5. Adsorplanan penisilinlerin geri kazanımına yönelik desorpsiyon işlemi öncesi uygun desorpsiyon ajanı, miktarı ve akış hızı belirlenmiştir.
6. Metot, hayvansal gıda örneklerine uygulanmıştır.
7. Belli konsantrasyonlardaki penisilin karışımlarının, gıda örneklerine ilave edilmesi sonrası adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri gerçekleştirilip, metodun doğruluğu kontrol edilmiştir.

BÖLÜM İKİ
MATERYAL VE METOT

2.1 Reaktifler

N-metil-imidazol, oktil iyodür, butil bromür, amonyum hegzaflorofosfat (NH_4PF_6), kitosan (deasetilasyon derecesi: %75-85, ortalama molekül ağırlığı: 500000-700000 g mol^{-1}), diklorometan, fosforik asit, toluen ve trifloroasetik asit (TFA) çözücüleri analitik saflıkta olup Merck veya Sigma-Aldrich marka temin edilmiştir. Metanol (MeOH) ve asetonitril (ACN), HPLC saflıkta olup Sigma-Aldrich veya Merck marka satın alınmıştır. Çalışmada kullanılan amoksisilin (AMX), penisilinV potasyum tuzu (PEN V), ampisilin sodyum tuzu (AMP), oksasilin sodyum tuzu (OXA) ve kloksasilin sodyum tuzu (CLO) antibiyotikleri %97-99,7 saflıkta olup Fluka veya Sigma-Aldrich marka satın alınmıştır. Çalışılan beş antibiyotiğin formülleri Şekil 2.1'de, pK_a değerleri Tablo 2.1'de verilmiştir. Ultra saflıkta saf su, Milli-Q su saflaştırma sistemi (Millipore) ile sağlanmıştır.



Şekil 2.1 Çalışılan penisilin grubu antibiyotiklerin açık yapıları

Tablo 2.1 Penisilin grubu antibiyotiklerin pK_a değerleri

Penisilinler	pKa
AMX	2,8; 7,2
AMP	2,7; 7,3
PENV	2,7
OXA	2,7
CLO	2,7

2.2 Kullanılan Cihazlar

Tablo 2.2 Deneyde kullanılan cihazlar

Malzeme / Cihaz	**Markası**
Infrared Spektrometresi (FTIR) Cihazı	Perkin Elmer Spectrum 100 model
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazı	Agilent 1100 Series Dual Loop Autosampler
pH-metre	Selecta pH 2001
Santrifüj Cihazı	Hettich - ZENTRIFUGEN
Vorteks	Heidolph
Peristaltik pompa	Watson Marlow 323i (Falmouth, England)
Vakum pompası	Selecta
Evaporatör	BUCHI (Switzerland)
Saf su cihazı	Milli-Q plus system, Millipore Bedford, MA, USA



Şekil 2.2 Agilent 1100 Serisi HPLC Sistemi

2.3 İyonik Sıvıların Sentezlenmesi

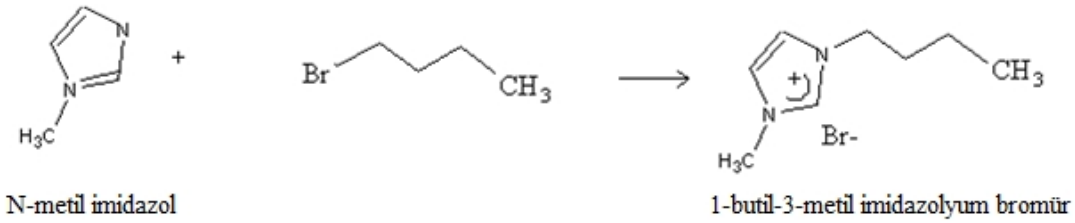
Bu çalışmada iyonik sıvı olarak, 1-butil-3-metil imidazolyum bromür (BMIM-Br); 1-oktil-3-metil imidazolyum iyodür (OMIM-I); 1-butil-3-metil imidazolyum hekzaflorofosfat (BMIM-PF_6) ve 1-oktil-3-metil imidazolyum hekzaflorofosfat (OMIM-PF_6) sentezlenmiştir.

2.3.1 1-Butil-3-Metil İmidazolyum Bromür (BMIM-Br) ve 1-Oktil-3-Metil İmidazolyum İyodür (OMIM-I) Sentezi

- 1-butil-3-metil imidazolyum bromür (BMIM-Br) sentezi:

0,04 mol N-metilimidazol, 0,04 mol butil bromür (1-bromobütan) ve 30 mL toluen yuvarlak dipli bir balona koyularak, geri soğutucu altında yaklaşık 2 saat süre karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 2 ayrı faz oluşmuştur. 1-butil-3-metil imidazolyum

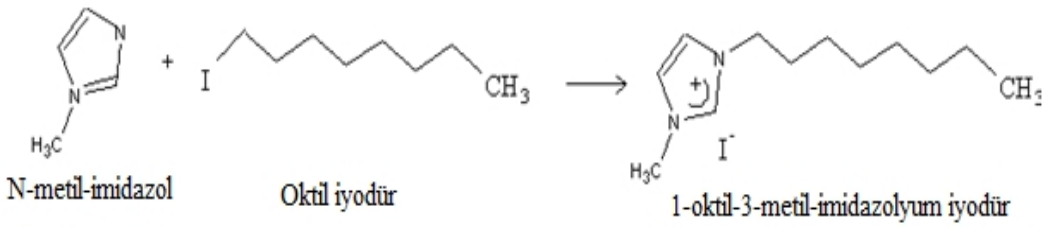
bromür (BMIM-Br) alt fazda biriken kısımdır. Sentez şeması Şekil 2.3'de gösterilmektedir (Zafer ve diğer., 2009; Özdemir ve diğer., 2010).



Şekil 2.3 1-butil-3-metil imidazolyum bromür (BMIM-Br) sentezi

- 1-oktil-3-metil imidazolyum iyodür (OMIM-I) sentezi:

0,04 mol N-metilimidazol, 0,04 mol oktil iyodür (1-iyodooktan) ve 30 mL toluen yuvarlak dipli bir balona koyularak, geri soğutucu altında yaklaşık 2 saat süre karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 2 ayrı faz oluşmuştur. 1-oktil-3-metil imidazolyum iyodür (OMIM-I) alt fazda biriken kısımdır. Sentez şeması Şekil 2.4'te gösterilmektedir (Zafer ve diğer., 2009; Özdemir ve diğer., 2010).

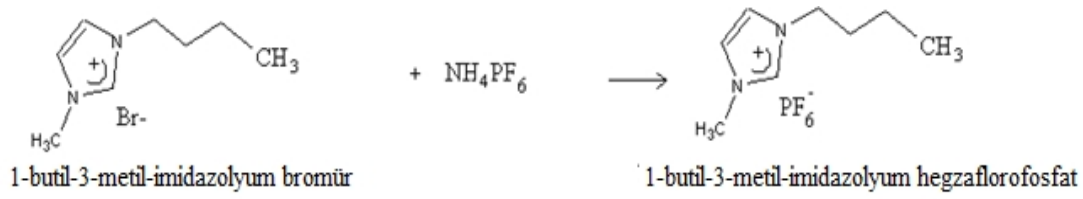


Şekil 2.4 1-oktil-3-metil imidazolyum iyodür (OMIM-I) sentezi

2.3.2 1-Butil-3-Metil İmidazolyum Hekzaflorofosfat (BMIM-PF_6) ve 1-Oktil-3-Metil İmidazolyum Hekzaflorofosfat (OMIM-PF_6) Sentezi

- 1-butil-3-metil imidazolyum hekzaflorofosfat (BMIM-PF_6) sentezi:

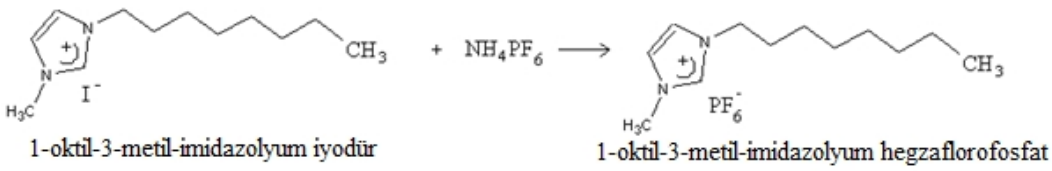
Sentezlenmiş olan 1-butil-3-metil imidazolyum bromür (BMIM-Br)'den 0,02 mol alınarak, 0,02 mol amonyum hekzaflorofosfat (NH_4PF_6) ve 80 mL diklorometan bir erlene koyularak, çözücünün uçmasını engellemek amacı ile ağzı kapatılıp, 24 saat karıştırmaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda, süzme işlemi yapılmış ve ortamda fazla miktarda kalan amonyum hekzaflorofosfat tuzu uzaklaştırılmıştır. En son aşamada diklorometanın fazlasını da ortamdan uzaklaştırmak amaçlı evaporatörde uçurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sentez şeması Şekil 2.5'te gösterilmektedir (Zafer ve diğer., 2009; Özdemir ve diğer., 2010).



Şekil 2.5 1-butil-3-metil imidazolyum hekzaflorofosfat (BMIM-PF_6) sentezi

- 1-oktil-3-metil imidazolyum hekzaflorofosfat (OMIM-PF_6) sentezi:

Sentezlenmiş olan 1-butil-3-metil imidazolyum iyodür (OMIM-I)'den 0,02 mol alınarak, 0,02 mol amonyum hekzaflorofosfat (NH_4PF_6) ve 80 mL diklorometan bir erlene eklenerek, çözücünün uçmasını engellemek amacıyla ağzı kapatılıp, 24 saat karıştırmaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda, süzme işlemi yapılmış ve ortamda fazla miktarda kalan amonyum hekzaflorofosfat tuzu uzaklaştırılmıştır. En son aşamada diklorometanın fazlasını da ortamdan uzaklaştırmak amaçlı evaporatörde uçurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sentez şeması Şekil 2.6'da gösterilmektedir (Zafer ve diğer., 2009; Özdemir ve diğer., 2010).



Şekil 2.6 1-oktil-3-metil imidazolyum hekzaflorofosfat (OMIM-PF_6) sentezi

2.4 Kitosanın İyonik Sıvı ile Modifikasyonu

1 g kitosan üzerine 45 mL su ilave edilmiş, daha sonra 1 M hidroklorik asit (HCI) damla damla eklenerek çözeltinin pH'ı 3'e ayarlanmıştır. Elde edilen karışım iki saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu çözeltiye çalışmada sentezlenen 0,25 g iyonik sıvının 5 mL diklorometan içerisindeki çözeltisi ilave edilerek 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Karışım süzülerek diklorometan ile yıkanmış, etüvde kurutularak sorbentler %65-75 verimle elde edilmiştir. Hazırlanan iyonik sıvı (IL) modifiye edilmiş kitosan (CH) sorbentleri şunlardır:

- CH-OMIM-PF_6
- CH- BMIM-PF_6

2.5 Penisilinlerin Adsorpsiyonunun Optimizasyonu

Adsorpsiyon çalışmaları kolon tipi gerçekleştirilmiştir. Penisilinlerin en yüksek kapasitede adsorpsiyonunu sağlamak amacı ile, adsorban miktarı, pH etkisi ve akış hızı gibi parametrelerin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

2.5.1 pH Etkisi

pH'ın adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere antibiyotiklerin pKa değerleri dikkate alınarak, 1 µg/mL penisilin karışımı içeren 10 mL'lik pH'ı 3,7 ve 9 olan test çözeltileri ile çalışılmıştır. pH ayarlamaları için, fosfat tamponları kullanılmıştır. Kullanılan fosfat tamponları aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

- ✓ pH 3 tamponu: 3,40 g potasyum dihidrojen fosfat 900 mL saf suda çözülüp, üzerine derişik fosforik asit damla damla eklenerek pH 3'e ayarlanmış ve çözelti 1000 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.
- ✓ pH 7 tamponu: 955 mL' lik 0,1 M disodyum fosfat (14,2 g/L) çözeltisine 45 mL 0,1 M HCl eklenerek hazırlanmıştır.
- ✓ pH 9 tamponu: 1,74 g potasyum dihidrojen fosfat 80 mL saf suda çözülüp, 1 M KOH damla damla eklenerek pH 9'a ayarlanmış ve çözelti 1000 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

2.5.2 Adsorban Miktarı

Adsorban miktarının penisilinlerin adsorpsiyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla senezlenen iyonik sıvı modifiye edilmiş kitosan sorbentlerinin, 0,1; 0,2 ve 0,4 g miktarlarında tutunma çalışmaları yapılmıştır.

2.5.3 Akış Hızı

Penisilinleri içeren örnek çözelti ve adsorban arasındaki en iyi etkileşimin gerçekleştiği zamanı belirleyen parametre akış hızıdır. Bu etkileşimin sağlandığı optimum akış hızı değerini belirlemek üzere, 0,5; 1; 1,5 ve 2 mL/dk akış hızlarında çalışılmıştır.

2.6 Desorpsiyon

İyonik sıvı modifiye edilmiş kitosan yüzeyindeki penisilinlerin etkin desorpsiyonunu sağlamak amacıyla, farklı desorpsiyon ajanları ile çalışılmıştır (Tablo 2.3). Belirlenen desorpsiyon ajanı ile farklı hacim ve akış hızlarında desorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.3 Çalışılan desorpsiyon ajanları

DESORPSİYON AJANLARI
Metanol (MeOH)
ACN:MeOH (4:5)
ACN:MeOH (5:5)
%2 NH_3 (8:2 ACN:MeOH)
%20 NH_3 (MeOH)

Belirlenen desorpsiyon ajanının 1 mL'den 5 mL'ye kadar farklı hacimlerinde çalışılmış, penisilinlerin yüksek kapasitede desorplanmasını sağlayan optimum akış hızını belirlemek amacıyla, 0,25; 0,5; 1 ve 1,5 mL/ dk akış hızlarında desorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Adsorpsiyon öncesi ve sonrası penisilin miktarları HPLC analizi ile belirlenip, % tutunma düzeyleri aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

Formül:

Adsorpsiyon öncesi penisilin miktarı **[Ci]**

Adsorbana tutunan penisilin miktarı **[Cf]**

% tutunma : **[Ci-Cf/ Ci]** x **100**

2.7 Penisilinlerin HPLC ile Analizi

Penisilinlerin HPLC cihazındaki analizinde, Pena ve çalışma grubunun yönteminden yararlanılmıştır (Pena, Gonzalez, Rodera ve Bondi, 2006).

Kromatografik koşullar:

- Cihaz: Agilent 1100 serisi
- Kolon: Thermo ODS Hypersyl Gold C_{18} (150 mm x 3 mm x 5 µm i.d) (koruma kolonlu)

- Kolon sıcaklığı: 35°C
- Akış hızı: 1,5 mL/dk
- DAD dedektör dalga boyu: 220 nm
- Enjeksiyon miktarı: 100 µL
- Analiz süresi: 23 dakika
- Mobil faz [%0,01 (v/v) TFA (suda) (A) : %0,01 (v/v) TFA (ACN'de) TFA (B)]:

✓ Mobil Faz A'nın hazırlanması (suda %0,01 (v/v) TFA):

100 µL TFA, son hacim 500 mL olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilmiştir.

✓ Mobil Faz B'nin hazırlanması (ACN'de %0,01(v/v) TFA):

100 µL TFA, son hacim 500 mL olacak şekilde ACN ile seyreltilmiştir.

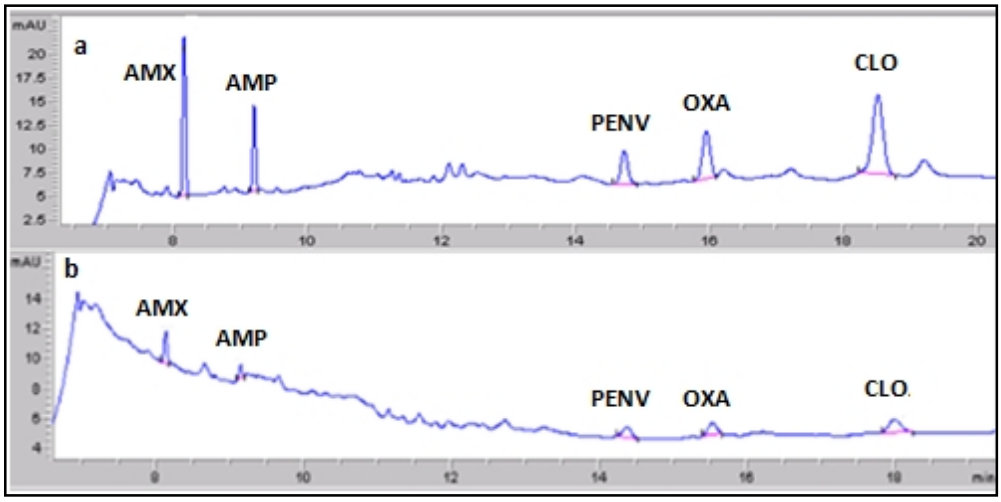
✓ Gradient Mobil Faz değişim programı uygulanmıştır. (Tablo 2.4)

Tablo 2.4 Mobil faz değişim programı

Zaman (Dakika)	**Mobil Faz A (%)**	**Mobil Faz B (%)**
0-3	100	0
3-8	63	37
8-19	63	37
19-21	95	5
21-22	95	5
22-23	100	0

Amoksisilin, ampisilin sodyum tuzu, penisilin V potasyum tuzu, kloksasilin sodyum tuzu ve oksasilin sodyum tuzunın belli miktarları ayrı ayrı tartılarak 50 mL'lik balon jojede ultra saf su ile seyreltilmiş ve 50 µg mL^{-1} (ppm)'lik ana stok çözeltileri

hazırlanmıştır. Bu stok çözelti, -20°C'de buzdolabında ve karanlık koşullarda saklanmıştır. Bu stok çözeltilerinden ayrı ayrı 1/100 seyreltme (0.5 µg mL^{-1}) uygulanarak cihaza enjeksiyon yapılıp standartların alıkonma zamanları belirlenmiştir (Şekil 2.7 a). Penisilinlerin ana stok çözeltilerinin her birinden 50 µL alınarak 10 mL'lik balon jojede ultra saf su ile seyreltilmiş ve penisilinlerin 10 µg mL^{-1} (ppm) karışık ara stok çözeltisi elde edilmiştir. Bu karışık ara stok çözeltisi, -20°C'de buzdolabında ve karanlık koşullarda saklanmıştır. Bu çözeltiden 1/100 seyreltme (0,1 µg mL^{-1}) uygulanarak cihaza enjeksiyon yapılıp standartların alıkonma zamanları belirlenmiştir (Şekil 2.7 b).



Şekil 2.7 a) 0.5 µg mL^{-1} penisilinlerin HPLC kromatogramı b) 0.1 µg mL^{-1} penisilinlerin HPLC kromatogramı

2.8 Hayvansal Gıda Örneklerindeki Penisilinlerin Adsorpsiyonu

Çeşitli markalarda yumurta ve tavuk eti örnekleri, İzmir'deki farklı marketlerden temin edilmiş ve ekstraksiyon öncesi tüm çalışılacak örnekler +4°C'de ve karanlıkta muhafaza edilmiştir.

2.8.1 Yumurta Örnekleri İçin Ekstraksiyon Yöntemi

Penisilin karışım standardı eklenmiş veya eklenmemiş, (0,1 µg mL^{-1} standart AMX, AMP, PENV, OXA, CLO) homojenize edilmiş 2 gram yumurta örneği alınarak karışım 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra 10 mL ACN: su (6:4) karışımı eklenerek 30 dakika çalkalanmıştır. Sonrasında 3600 *g*'de 10^0C'de 10 dakika boyunca santrifüj yapılıp, süpernatant faz alınmıştır (3 mL, pH 7). Alınan süpernatantın pH'ı 0,1 M HCl ile 3'e ayarlanmış ve sonuç çözelti hacmi 10 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır (Peters ve diğer., 2009).

2.8.2 Tavuk Eti Örnekleri İçin Ekstraksiyon Yöntemi

Penisilin karışım standardı eklenmiş veya eklenmemiş, (0,1 µg mL^{-1} standart AMX, AMP, PENV, OXA, CLO) homojenize edilmiş 2 gram tavuk eti örneği alınarak karışım 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra 10 mL ACN: su (6:4) karışımı eklenerek 30 dakika çalkalanmıştır. Sonrasında 3600 *g*'de 10^0C'de 10 dakika boyunca santrifüj yapılıp, süpernatant faz alınmıştır (3 mL, pH 7). Alınan süpernatantın pH'ı 0,1 M HCl ile 3'e ayarlanmış ve sonuç çözelti hacmi 10 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır (Peters ve diğer., 2009).

CH-OMIM-PF_6 sorbenti (0,2 g) içeren ve 10 mL MeOH:su (2:8), 5 mL saf su ve daha sonra 10 mL pH 3 fosfat tamponuyla şartlandırılmış mini kolondan 10 mL'lik pH'sı 3'e ayarlanmış gerçek örnek ekstraktı 1 mL/dk akış hızında geçirilmiştir. Daha sonra 5 mL desorpsiyon çözeltisi [%2 lik (v/v) NH_3 (ACN:MeOH, (8:2)] 0,5 mL/dk hızında geçirilip, penisilin eluenti azot atmosferinde uçurulmuştur ve kalıntı 1 mL hareketli fazda [A: %0,01 (v/v) TFA (suda); B: %0,01 (v/v) TFA (ACN'de)] çözülerek HPLC ye uygulanmıştır.

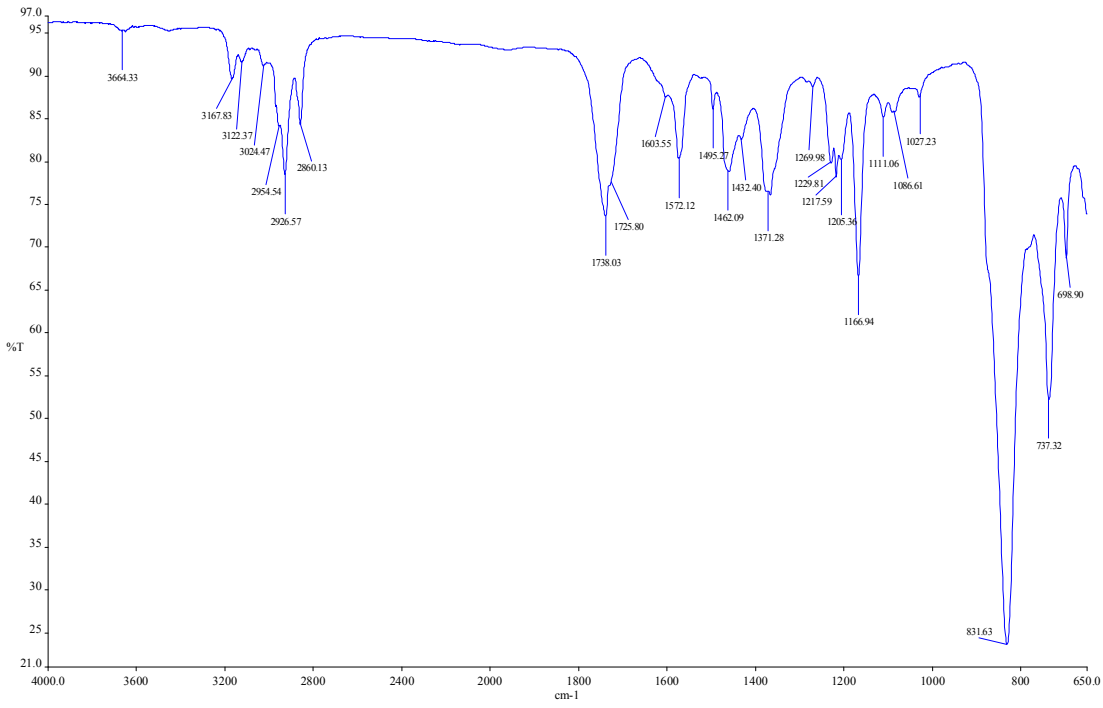
BÖLÜM ÜÇ
BULGULAR VE TARTIŞMALAR

3.1 İyonik Sıvıların Karakterizasyonları

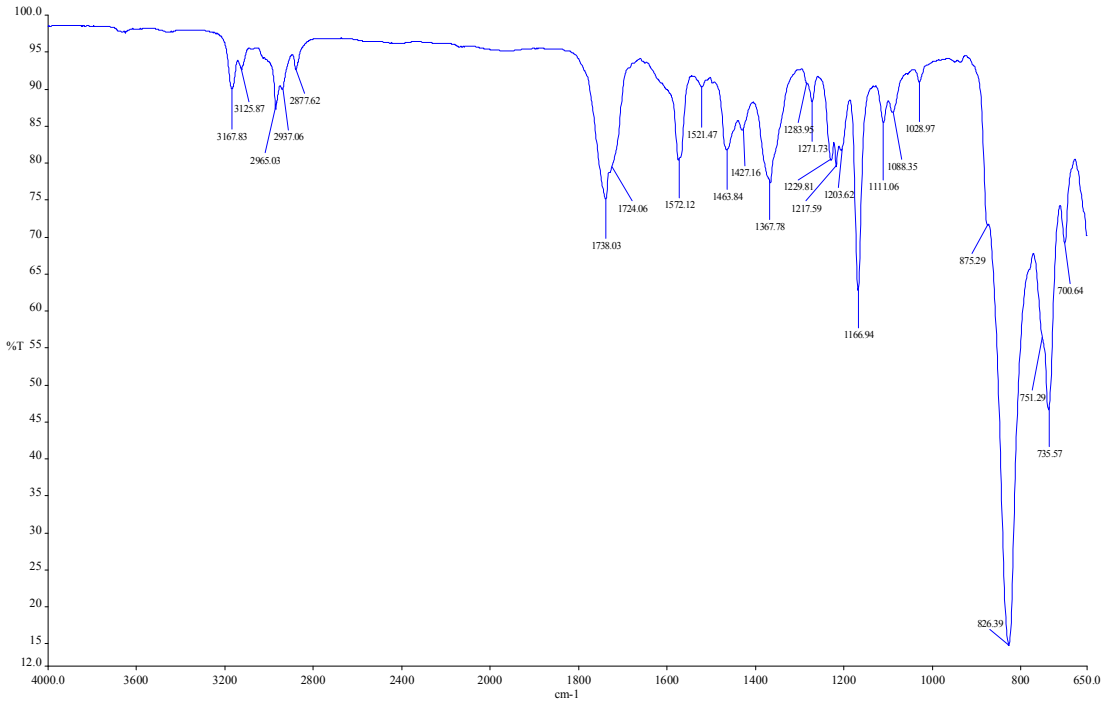
Sentezlenen iyonik sıvıların yapıları; FTIR, ^{1}H-NMR, UV-görünür bölge ve floresans spektrumları ile aydınlatılmıştır. Termal kararlılıkları, TG-DTG eğrileri ile incelenmiştir.

3.1.1 İyonik Sıvıların FTIR Spektrumları

Sentezlenen iyonik sıvıların ve ara ürünlerinin FTIR spektrumları, yaklaşık 0,1 mL örnek kullanılarak ATR probu ile alınmıştır. Şekil 3.1 ve 3.2'de sentezlenen BMIM-PF_6 ve OMIM-PF_6 iyonik sıvılarının FTIR spektrumu görülmektedir. Sentezlenen iyonik sıvıların bazı karakteristik bandları Tablo 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 OMIM-PF_6 iyonik sıvısının FTIR spektrumu



Şekil 3.2 BMIM-PF_6 iyonik sıvısının FTIR spektrumu

Tablo 3.1 İyonik sıvıların FTIR spektrum verileri

İyonik sıvı	Dalga sayısı, cm^{-1}				
	Aromatik =C-H gerilme	Alifatik -C-H gerilme	Aromatik C=N gerilme	Aromatik C=C gerilme	Alifatik C-N gerilme
BMIM-Br	3069	2958-2874	1566	1462	1166
BMIM-PF_6	3167	2965-2877	1572	1463	1166
OMIM-I	3027	2926-2856	1570	1458	1165
OMIM-PF_6	3167	2926-2860	1572	1462	1166

3.1.2 İyonik Sıvıların ^{1}H-NMR Spektrumları

Sentezlenen iyonik sıvılardan bazılarının ^{1}H-NMR spektrum verileri aşağıda verilmiştir. BMIM-Br bileşiğinin ^{1}H NMR spektrum sonucuna bakıldığında; 3,95 ppm'de gözlenen -NCH_2CH$_2$– grubundaki 2 adet protona ait olan triplet yarılma piki, çıkış maddesi olan butil bromürdeki butil grubunun metil imidazol halkasına bağlandığını göstermektedir. Sentezlenen iyonik sıvılarındaki protonların kimyasal kayma değerlerinin ara ürünlerin protonlarının kimyasal kayma değerlerinden farklı olduğu gözlenmektedir.

BMIM-Br: ^{1}HNMR ($CDCl_3$) ppm: 9,60 (s, 1H, NC*H*N), 6,50 (d, 1H, NC*H*CHN), 7,04 (d, 1H, NCHC*H*N), 3,95 (t, 2H, NC*H*$_2$CH$_2$–), 3,66 (s, 3H, –NC*H*$_3$), 1,42 (m, 2H, NCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_3$), 0,99 (h, 2H, NCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_3$), 0,56 (t, 3H, –CH$_2$C*H*$_3$).

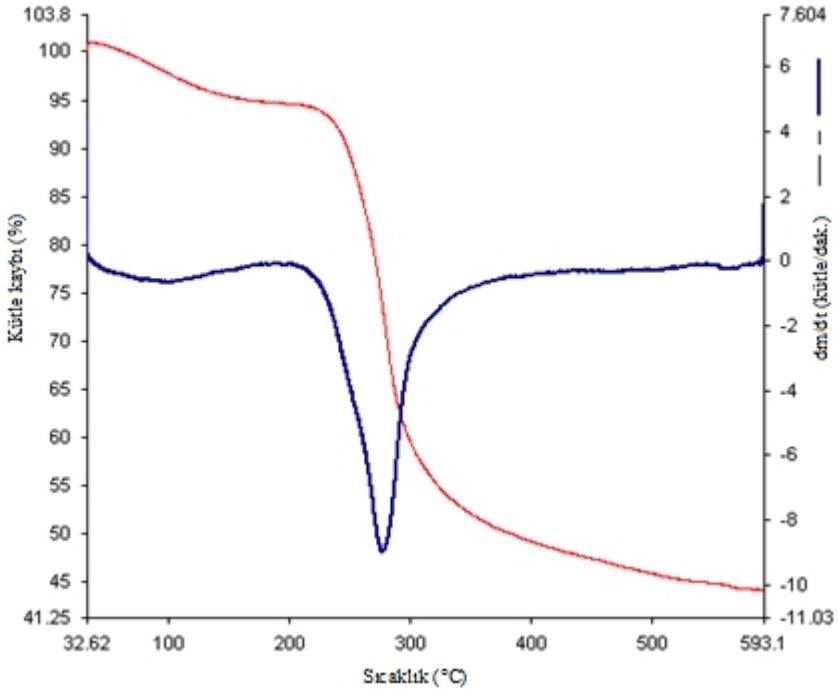
BMIM-PF_6: ^{1}HNMR (DMSO) ppm: 9,10 (s, 1H, NC*H*N), 7,65 (d, 1H, NC*H*CHN), 7,21 (d, 1H, NCHC*H*N), 4,18 (t, 2H, NC*H*$_2$CH$_2$–), 3,82 (s, 3H, –NC*H*$_3$), 1,78 (m, 2H, NCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_3$), 1,21 (h, 2H, NCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_3$), 0,84 (t, 3H, –CH$_2$C*H*$_3$).

OMIM-I: ^{1}HNMR ($CDCl_3$) ppm: 9,81 (s, 1H, NC*H*N), 7,50 (d, 1H, NC*H*CHN), 7,18 (d, 1H, NCHC*H*N), 4,21 (t, 2H, NC***H*****$_2$**CH$_2$–), 4,01 (s, 3H, –NC*H*$_3$), 2,32 (m, 10H,NCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$),1,28(h,2H,NCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$), 0,82 (t, 3H, –CH$_2$C*H*$_3$).

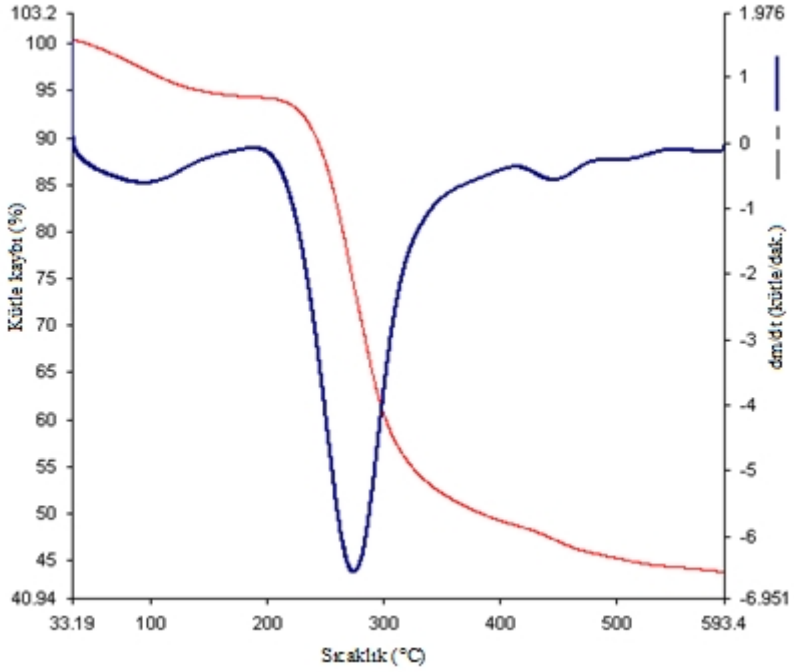
OMIM-PF_6: ^{1}HNMR ($CDCl_3$) ppm: 8,58 (s, 1H, NC*H*N), 7,38 (d, 1H, NC*H*CHN), 7,20 (d, 1H, NCHC*H*N), 4,18 (t, 2H, NC*H*$_2$CH$_2$–), 3,90 (s, 3H, –NC*H*$_3$), 2,38 (m, 10H,NCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$),1,30(h,2H,NCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$), 0,83 (t, 3H, –CH$_2$C*H*$_3$).

3.1.3 İyonik Sıvıların Termal Analizleri

Sentezlenen iyonik sıvıların termal kararlılıklarının incelenmesi amacıyla, örnekler alüminyum kap içerisine alınarak azot atmosferinde 25-600 °C aralığında (sıcaklık artışı 15 °C/dk) analiz edilmiştir. Sentezlenen BMIM-PF_6 ve OMIM-PF_6 iyonik sıvılarının TG/DTG eğrisi Şekil 3.3 ve 3.4'te verilmiştir. Şekil 3.3 ve 3.4'ten görüleceği üzere, ara ürün ve sonuç ürünü iyonik sıvılarının termal bozunmaları iki kademede gerçekleşmektedir. İyonik sıvıların birinci kütle kaybının 90^0C'nin üzerinde olduğu ve bu kaybın ortalama %6 civarında olduğu belirlenmiştir. İkinci kütle kaybı sentezlenen iyonik sıvılarda 280^0C civarında gözlenmiş ve buradaki kayıp %50 olarak belirlenmiştir. Kitosana bağlanacak sonuç ürün olan iyonik sıvıların oda sıcaklığında kararlı olduğu görülmektedir.



Şekil 3.3 BMIM-PF_6 iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi



Şekil.3.4 OMIM-PF_6 iyonik sıvısının TG/DTG eğrisi

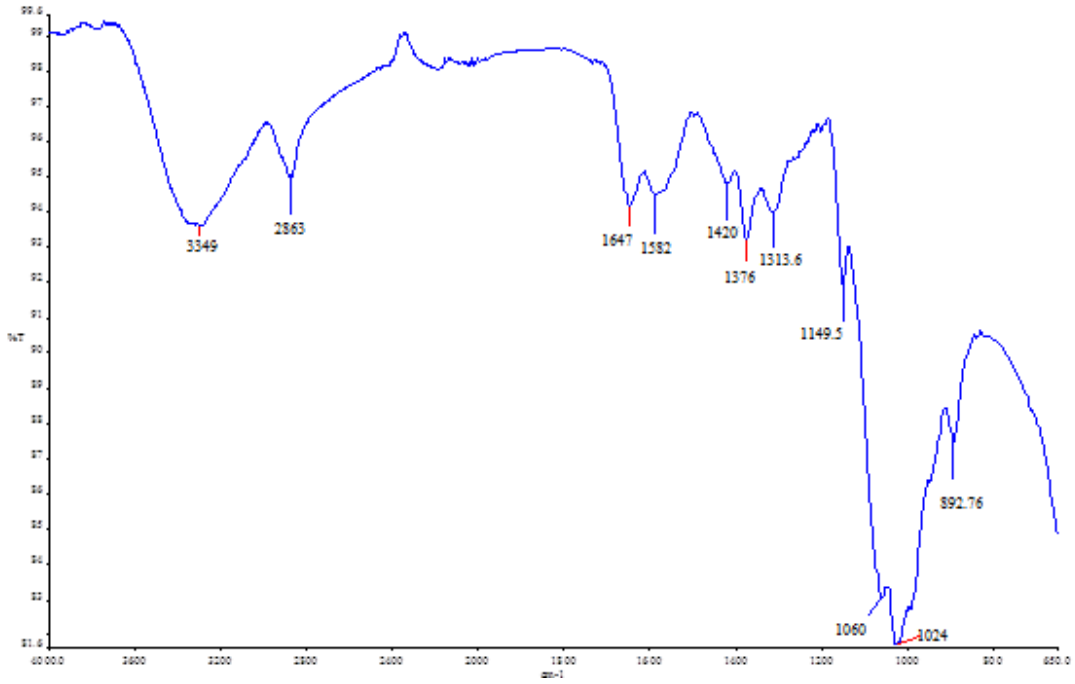
3.2 İyonik Sıvı ile Modifiye Edilmiş Kitosan Sorbentlerinin Karakterizasyonu

Hazırlanan iyonik sıvı ile modifiye edilmiş kitosan sorbentlerinin FTIR, SEM ve termal kararlılıkları incelenmiştir.

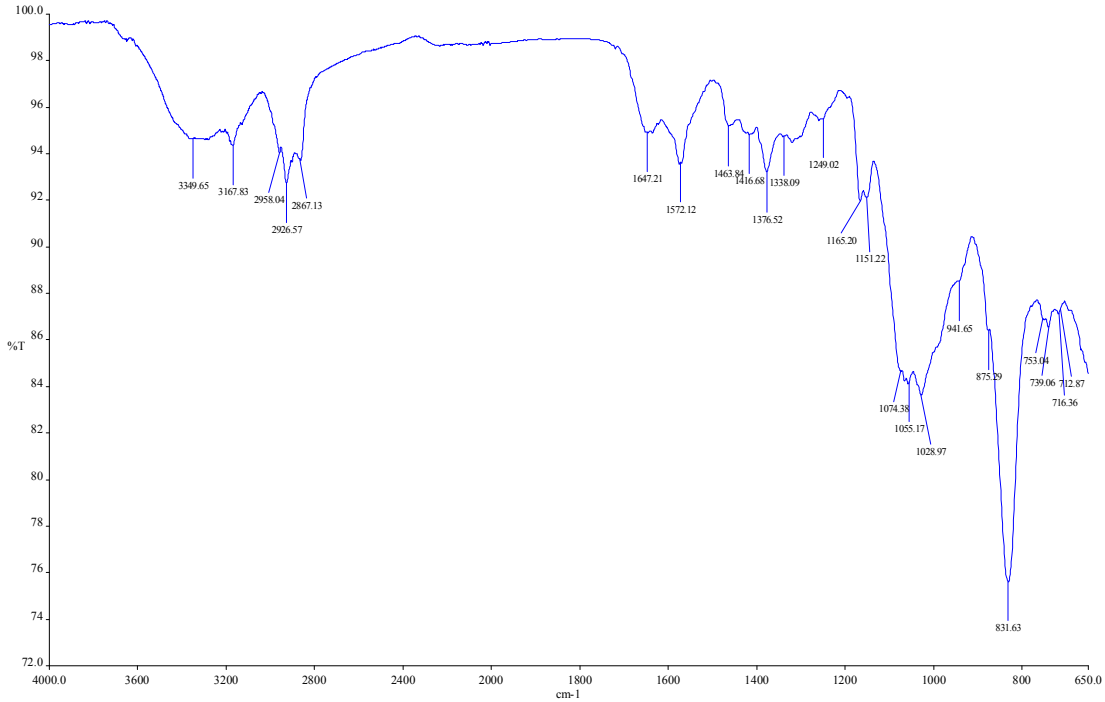
3.2.1 İyonik Sıvı ile Modifiye Edilmiş Kitosan Sorbentlerinin FTIR Spektrumları

Hazırlanan iyonik sıvılar ile modifiye edilmiş kitosan sorbentlerinin FTIR spektrumları KBr ile pellet hazırlanarak alınmıştır. Kitosan ve iyonik sıvı modifiye edilmiş kitosan sorbentlerinin (CH-BMIM-PF_6 ve CH-OMIM-PF_6) FTIR spektrumları Şekil 3.5, 3.6 ve 3.7'de verilmiştir. Hazırlanan sorbentlerin bazı karakteristik bandları Tablo 3.2'de verilmiştir. İyonik sıvı ile modifiye edilmiş kitosanda –OH gerilme bandları belirgindir. Örneğin, kitosanda 3349 cm^{-1}'de görülen –OH piki iyonik sıvı modifiye edilmiş kitosanda (CH-BMIM-PF_6) 3647 cm^{1}'e kaymıştır. Ayrıca iyonik sıvıdaki –C=H gerilme bandının (3041 cm^{-1}) ve iyonik sıvının imidazol halkasına ait =C-H eğilme titreşimine ait bandın (831 cm^{-1})

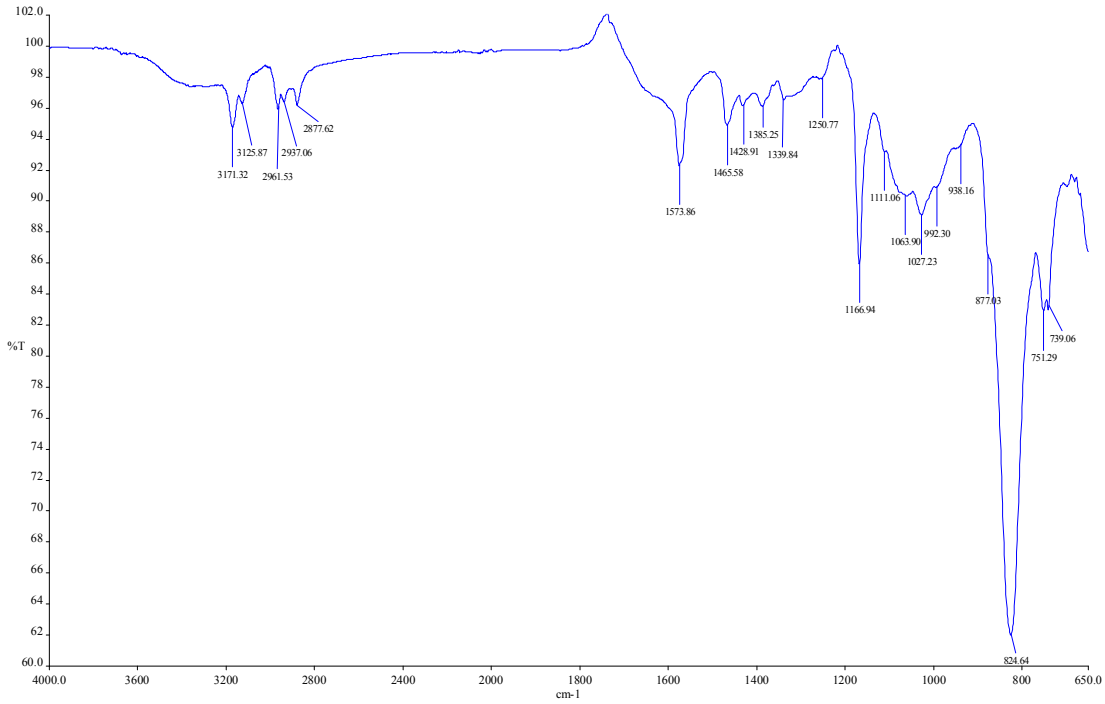
iyonik sıvı ile modifiye edilmiş kitosanın spektrumunda da var olması kitosanın yüzeyinde iyonik sıvının varlığını göstermektedir.



Şekil 3.5 Kitosanın FTIR spektrumu



Şekil 3.6 CH-OMIM-PF_6 sorbentinin FTIR spektrumu



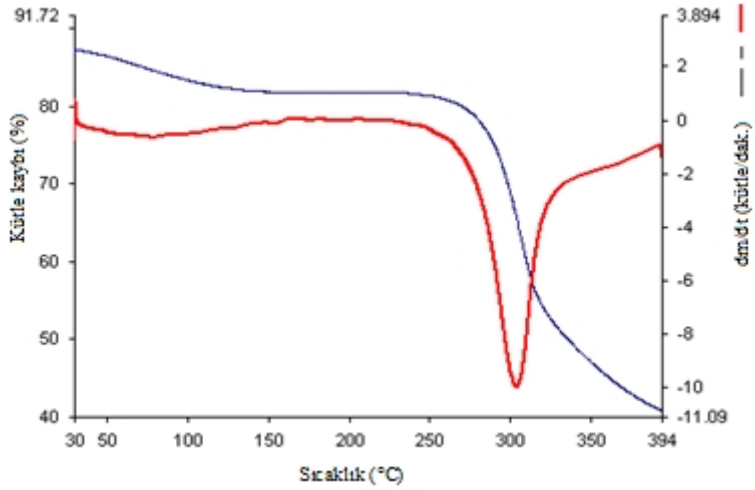
Şekil 3.7 CH-BMIM-PF_6 sorbentinin FTIR spektrumu

Tablo 3.2 İyonik sıvı modifiye edilmiş kitosan sorbentlerinin FTIR spektrum verileri

CH-IL sorbenti	Dalga sayısı, cm^{-1}					
	-OH gerilme	Aromatik =C-H gerilme	Alifatik -C-H gerilme	Aromatik C=N gerilme	Aromatik C=C gerilme	Alifatik C-N gerilme
CH	3349	3283	2863	1582	1420	1060
CH-BMIM-PF_6	3647	3041	2877	1557	1456	1054
CH-OMIM-PF_6	3640	3170	2927	1557	1455	1065

3.2.2 İyonik Sıvı Modifiye Edilmiş Kitosan Sorbentlerinin Termal Analiz Sonuçları

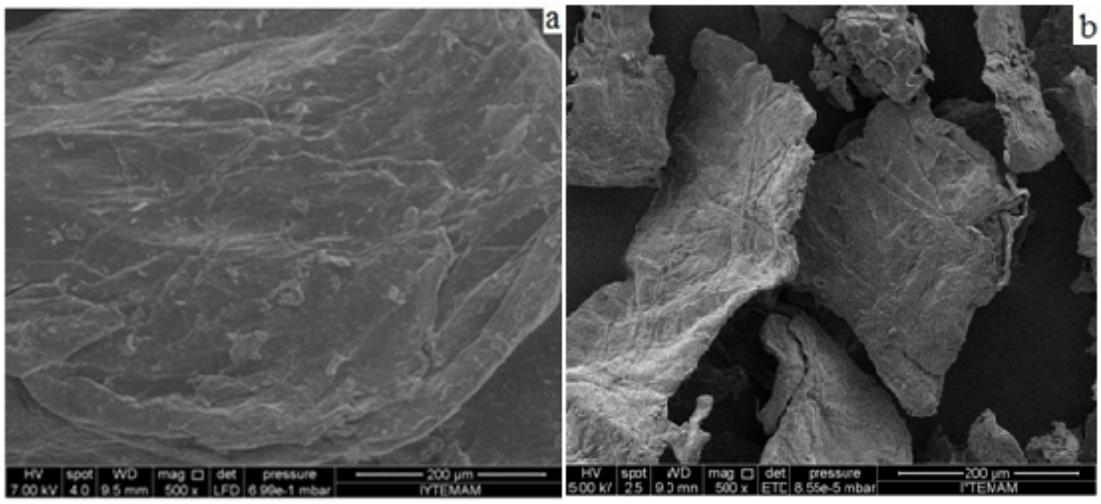
İyonik sıvı bazlı kitosan sorbentlerinin termal analizleri, alüminyum kap kullanılarak azot atmosferinde 25-500°C aralığında (sıcaklık artışı 15°C/dk) gerçekleştirilmiştir. Termal bozunmaların iki kademede gerçekleştiği belirlenmiştir. 50-78^{0}C sıcaklık aralığında gözlenen birinci kütle kaybının ortalama %5-8 civarında, 260-305^{0}C sıcaklık aralığında gözlenen ikinci kütle kaybının ise %5-45 aralığında olduğu gözlenmiştir. Şekil 3.8'de örnek olarak CH-OMIM-PF_6 sorbentinin TG-DTG eğrisi verilmiştir.



Şekil.3.8 CH-OMIM-PF_6 sorbentinin TG-DTG eğrisi

3.2.3 İyonik Sıvı ile Modifiye Edilmiş Kitosan Sorbentlerinin SEM Analizleri

Hazırlanan iyonik sıvı modifiye edilmiş kitosan sorbentlerinin İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilen SEM analizlerinde, örnekler kaplanmadan düşük voltajda 7 kV'da ölçülmüştür. İyonik sıvıların bağlanması ile kitosanın yüzeyinde oluşan morfolojik değişim, kitosan ve iyonik sıvı ile modifiye edilmiş kitosanın (CH-OMIM-PF_6) Şekil 3.9'da verilen SEM fotoğraflarında görülmektedir.

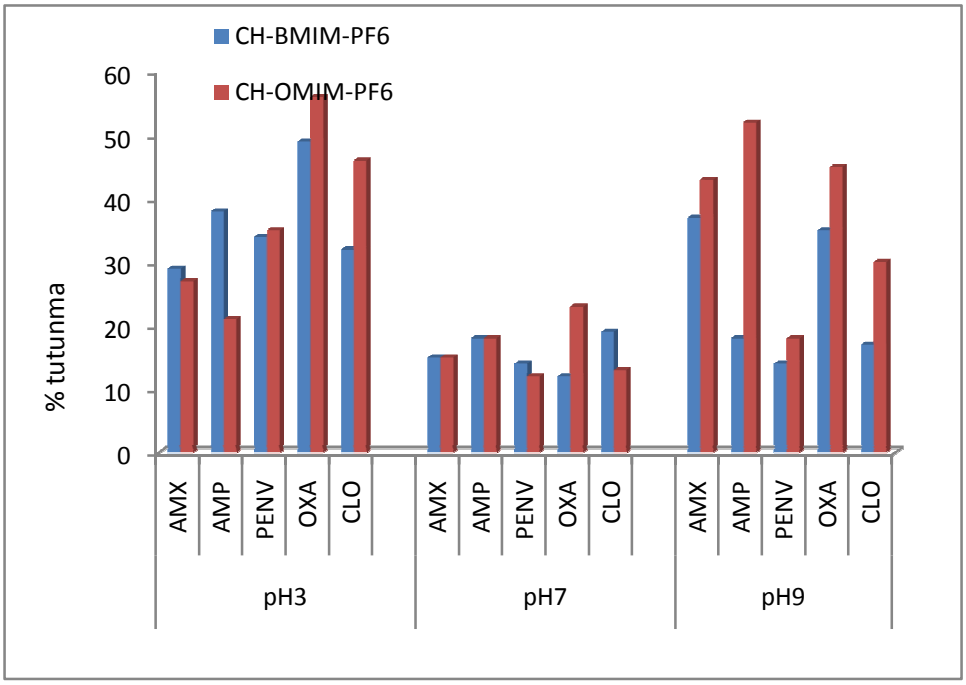


Şekil.3.9 a) Kitosan ve b) iyonik sıvı ile modifiye edilmiş kitosanın (CH-OMIM-PF_6) SEM görüntüleri

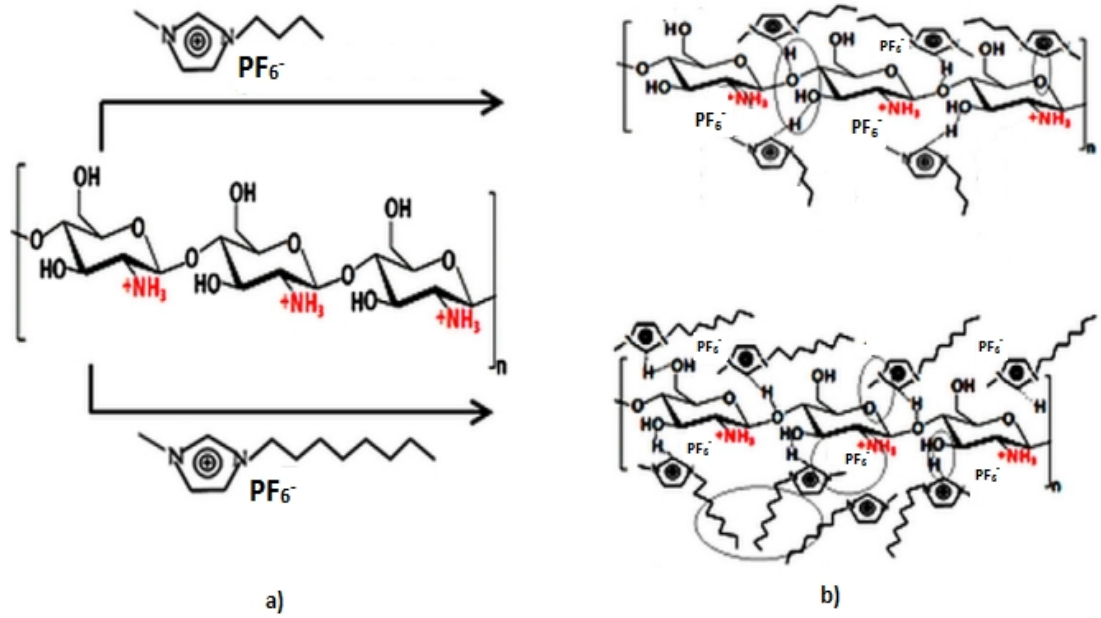
3.3 Penisilinlerin Adsorpsiyon Koşullarının Değerlendirilmesi

3.3.1 pH Optimizasyonu

Çalışılan penisilinler için pK_a değerleri dikkate alınarak adsorpsiyon çalışmaları, pH 3, 7 ve 9'da yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.10'da sunulmuştur. Şekil 3.10'dan görüleceği gibi en iyi tutunma tüm penisilinler için pH 3'de elde edilmiş ve bu nedenle daha sonraki çalışmalar pH 3'de gerçekleştirilmiştir. pH 3'de gerçekleştirilen kitosanın iyonik sıvı ile modifikasyonunun kitosanın yüzeyindeki pozitif yükler ile iyonik sıvının anyonu (PF_6^-) arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu etkileşimler, kitosanın -OH grubu ile iyonik sıvının imidazol halkası arasındaki H bağları ve kitosanın glukopiranoz halkası ile iyonik sıvının imidazol halkası arasındaki hidrofobik etkileşimler üzerinden gerçekleşebilir (Şekil 3.11) (Bharmoria, Singh ve Kumar, 2013). Ayrıca bu pH'da çalışılan antibiyotikler asidik formda bulunur ve bu nedenle sorbentler ile antibiyotikler arasında hidrofobik etkileşimlerin daha baskın olduğu söylenebilir.



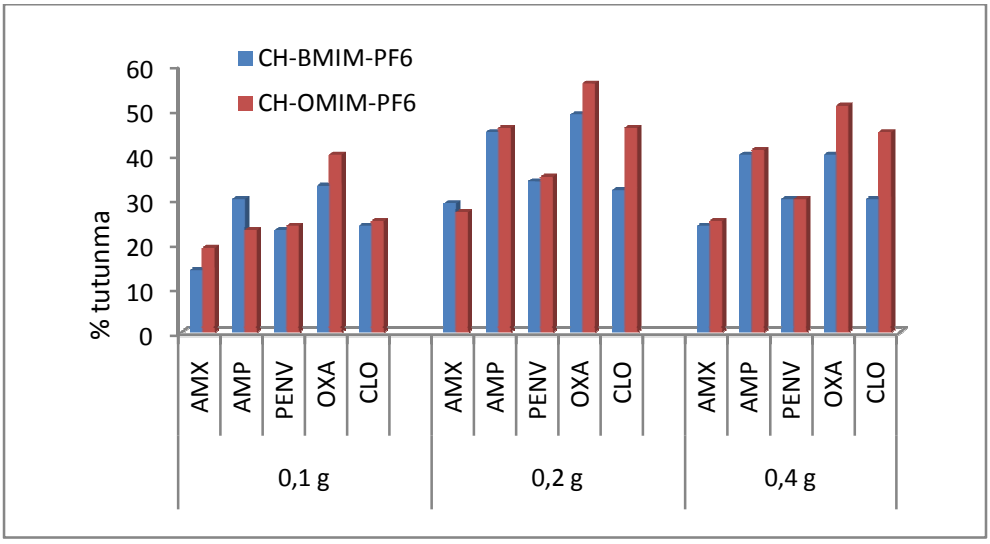
Şekil 3.10 Penisilin grubu antibiyotiklerin farklı pH'lardaki adsorpsiyon sonuçları



Şekil 3.11 a) Kitosan + iyonik sıvı b) Elektrostatik, H bağı ve hidrofobik etkileşimler (Bharmoria, Singh ve Kumar, 2013).

3.3.2 Adsorban Miktarı Optimizasyonu

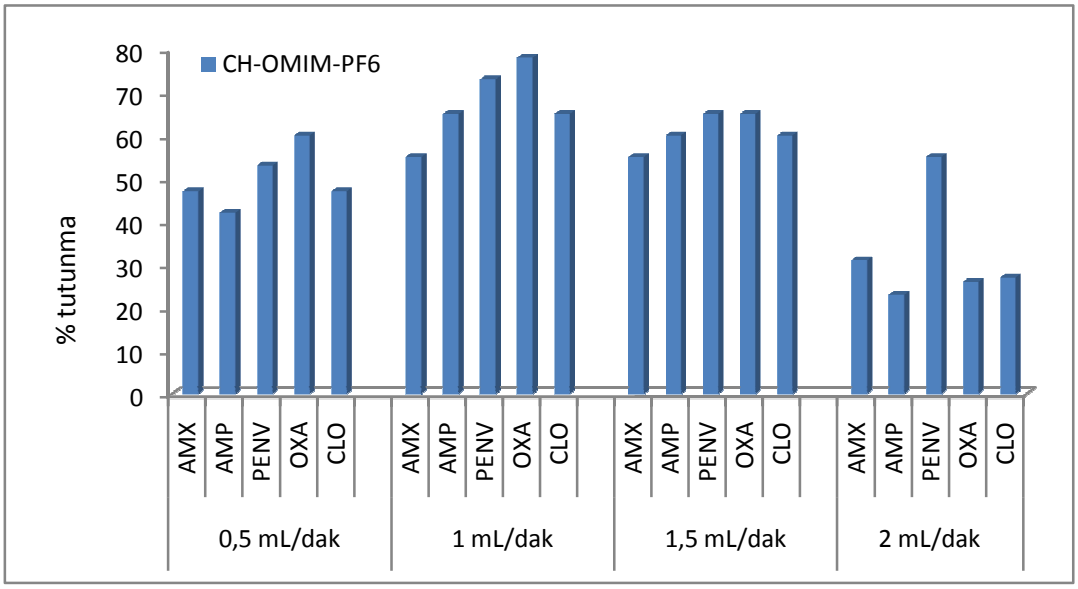
Optimum pH'ın 3 olarak belirlenmesinden sonra adsorpsiyon çalışmaları, sorbentlerin 0,1-0,2 ve 0,4 g miktarları ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.12'de gösterilmektedir. Şekilden de görüleceği üzere en yüksek tutunma 0,2 g sorbent ile elde edilmiştir.



Şekil 3.12 Penisilinlerin farklı sorbent miktarlarındaki adsorpsiyon sonuçları

3.3.3 Akış Hızı Optimizasyonu

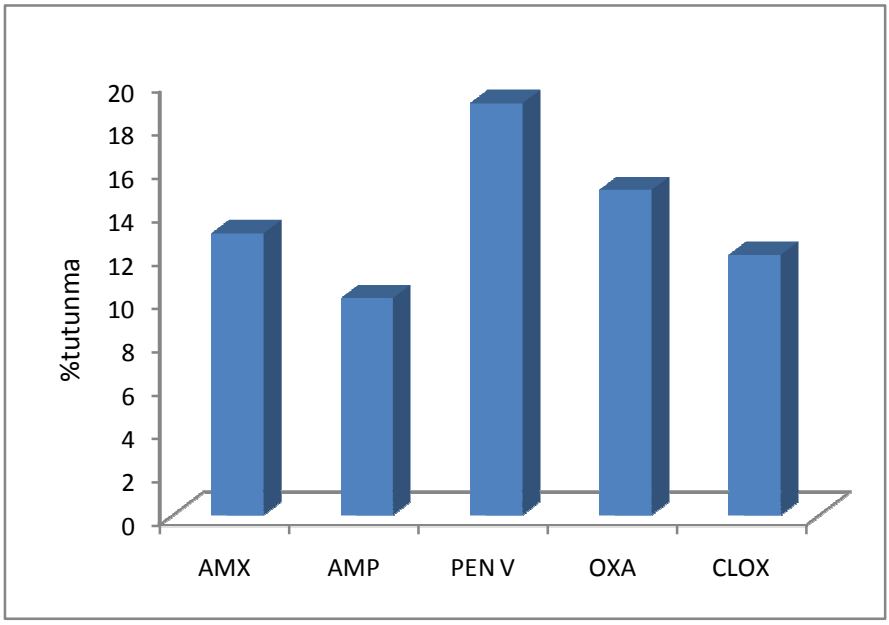
Penisilin grubundan çalışılan antibiyotikler için pH ve sorbent miktarı çalışmalarında en iyi sonuçlar CH-OMIM-PF_6 sorbenti ile elde edilmiştir. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalar bu sorbentle gerçekleştirilmiştir. Penisilin grubu antibiyotiklerin kolonda tutunma hızlarının kontrolü, 0,5; 1; 1,5 ve 2 mL/dk hızları ile gerçekleştirilen akış hızı çalışmaları ile yapılmıştır. En iyi tutunma akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Penisilinlerin tutunma akış hızları sonuçları

3.4 Penisilin Grubu Antibiyotiklerin Kitosana Adsorpsiyonu

İyonik sıvı modifikasyonunun adsorpsiyona etkisini belirlemek amacıyla elde edilen optimum şartlarda sadece kitosana penisilinlerin adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.14). Şekilden de görüldüğü gibi sadece kitosan ile elde edilen adsorpsiyon sonuçları %10-20 civarındadır. İyonik sıvı ile modifikasyon, kitosanın adsorpsiyon kapasitesini arttırmıştır ve böylece %80'nin üzerinde tutunmalar elde edilmiştir.



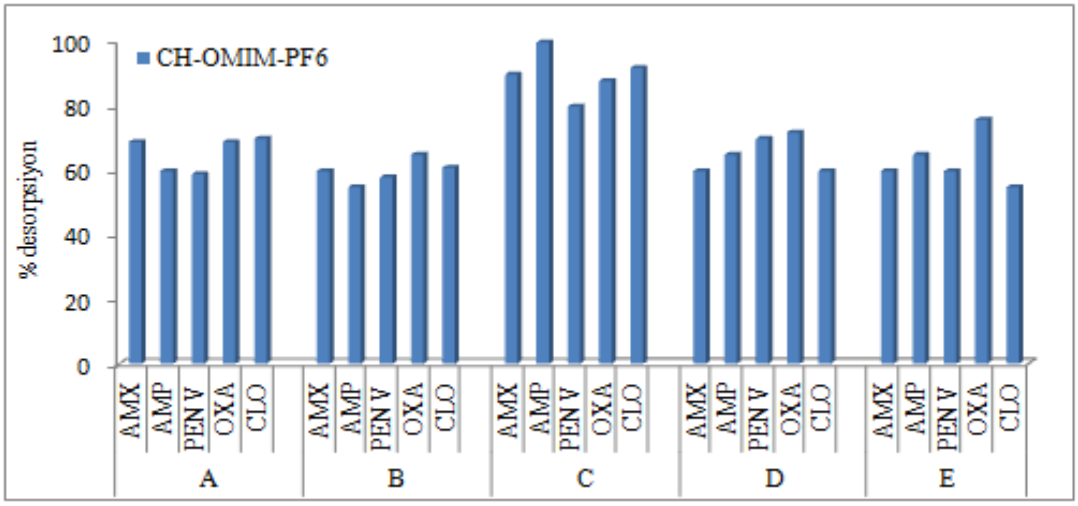
Şekil 3.14 Penisilinlerin kitosana tutunma sonuçları (Deneysel şartlar, pH 3; 0,2 g sorbent; akış hızı:1 mL/dk; 0,1 µg mL^{-1} antibiyotik)

3.5 Desorpsiyon Çalışmaları

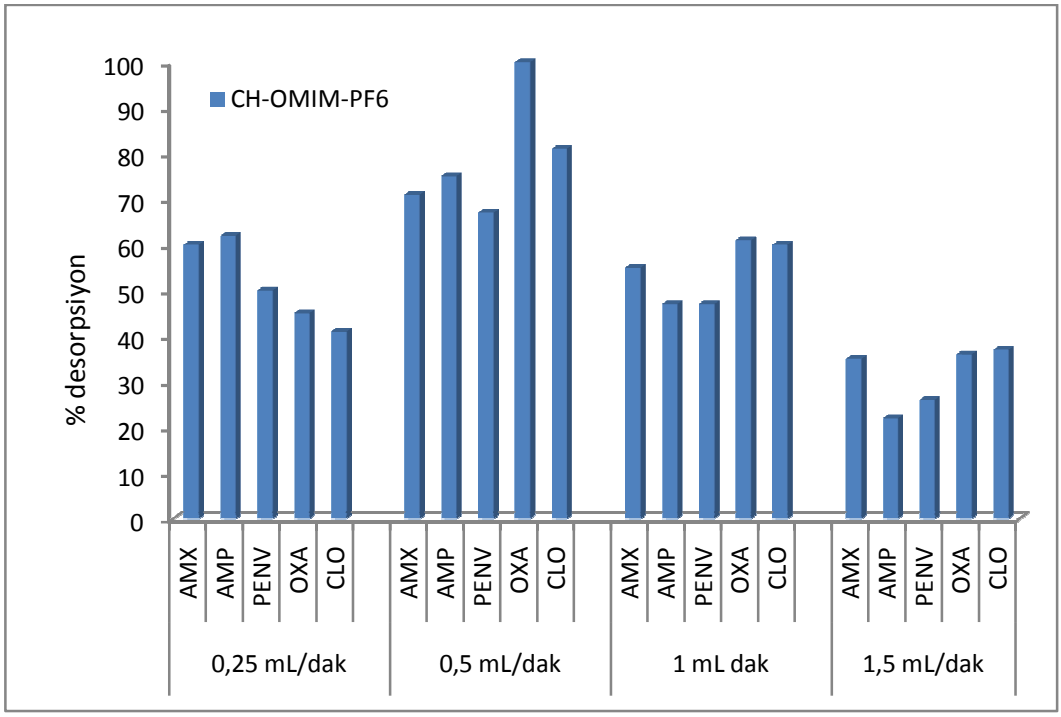
İyonik sıvı ile modifiye edilmiş kitosan yüzeyinde tutunmuş penisilinlerin desorpsiyonu amacıyla farklı desorpsiyon ajanları ile çalışılmıştır. Tüm penisilinler için en iyi desorpsiyon, desorpsiyon ajanı olarak kullanılan % 2'lik NH_3 (8:2, ACN:MeOH) çözeltisi ile elde edilmiş ve desorpsiyon oranları % 80-100 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.15).

Penisilinlerin optimum akış hızını belirlemek amacıyla, 0,25; 0,5; 1 ve 1,5 mL/dk akış hızlarında desorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. En iyi desorpsiyon akış hızı 0,5 mL/dk olarak belirlenmiştir (Şekil 3.16).

Analiz sonucunda penisilinlerin 5 mL desorpsiyon ajanı [%2'lik NH_3 (8:2, ACN: MeOH) çözeltisi] ile desorbe edildiği belirlenmiştir.



Şekil 3.15 Penisilinlerin farklı desorpsiyon ajanlarındaki % geri kazanım sonuçları. A-MeOH, B-ACN:MeOH (4:5), C-%2 (v/v) NH_3 (8:2, ACN:MeOH), D-%20 (v/v) NH_3 (MeOH), E- ACN:MeOH (5:5)



Şekil 3.16 Penisilinlerin geri alma akış hızları sonuçları (Sorbent miktarı: 0,2 g; Desorpsiyon ajanı: %2 (v/v) NH_3 (8:2, ACN:MeOH); Antibiyotik derişimi: 0,1 µg mL^{-1})

3.6 Hayvansal Gıda Örneklerinde Penisilinlerin Tayini

Tavuk eti ve yumurta örnekleri İzmir'deki yerel marketlerden satın alınıp ekstrakte edilmiş ve optimize edilen yönteme göre penisilin grubu beş antibiyotik tayin edilmiştir. Tablo 3.3 ve 3.4'te standart eklemesi yapılan (0,1 µg mL^{-1}'lik standart penisilin karışım çözeltisi) ve yapılmayan yumurta ve tavuk eti örneklerine ait sonuçlar verilmiştir. Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'ten görüleceği üzere çalışılan yumurta örneklerinin tümünde araştırılan beş antibiyotiğin bir kısmına, tavuk eti örneklerinde ise sadece 4 no'lu örnekte AMP'ye rastlanmıştır. Örneklerde bulunan antibiyotik değerlerinin ise Avrupa Birliği'nce izin verilen sınır değerlerin altında olduğu belirlenmiştir (Avrupa Birliği Halk Sağlığı, 2003).

Tablo 3.3 Yumurta örneklerinde penisilinlerin analiz sonuçları

No		AMX	AMP	PENV	OXA	CLO
	Ekl. (µg/mL)	Bulunan (µg/mL) (±s)	Bulunan (µgm/L) (±s)	Bulunan (µg/mL) (±s)	Bulunan (µg/mL) (±s)	Bulunan (µg/mL) (±s)
1	-	-	-	-	$0,03\pm0,00_4$	$0,02\pm0,01$
	0,10	$0,11\pm0,01$	$0,09\pm0,01$	$0,08\pm0,01$	$0,13\pm0,01$	$0,12_4\pm0,02$
2	-	-	$0,02_5\pm0,02_3$	$0,03\pm0,03$	$0,05\pm0,01$	$0,00_9\pm0,00_2$
	0,10	$0,09\pm0,01$	$0,12\pm0,02$	$0,13_5\pm0,03_2$	$0,16\pm0,02$	$0,10\pm0,02$
3	-	$0,01\pm0,004$	-	-	$0,02\pm0,01$	-
	0,10	$0,11\pm0,02$	$0,09\pm0,01$	$0,08\pm0,01$	$0,12\pm0,02$	$0,10\pm0,01$
4	-	$0,01\pm0,01$	-	-	-	-
	0,10	$0,10\pm0,02$	$0,09\pm0,01$	$0,10\pm0,01$	$0,10\pm0,01$	$0,10\pm0,01$
5	-	$0,03\pm0,004$	-	$0,04\pm0,01$	-	$0,02_4\pm0,01_1$
	0,10	$0,12\pm0,01$	$0,09\pm0,01$	$0,13\pm0,02$	$0,10\pm0,01$	$0,11_8\pm0,02_2$

Tablo 3.4 Tavuk eti örneklerinde penisilinlerin analiz sonuçları

No		AMX	AMP	PENV	OXA	CLO
	Ekl. (µg/mL)	Bulunan (µg/mL) (±s)	Bulunan (µgm/L) (±s)	Bulunan (µg/mL) (±s)	Bulunan (µg/mL) (±s)	Bulunan (µg/mL) (±s)
1	-	-	-	-	-	-
	0,10	$0,10_1$±0,02	0,10±0,01	0,11±0,01	0,09±0,01	0,10±0,01
2	-	-	-	-	-	-
	0,10	0,10±0,01	0,09±0,02	0,09±0,01	0,08±0,01	0,09±0,01
3	-	-	-	-	-	-
	0,10	0,08±0,01	0,10±0,02	0,09±0,01	0,08±0,01	0,09±0,01
4	-	-	0,01±0,01	-	-	-
	0,10	$0,09_5$±$0,02_2$	0,11±0,02	0,10±0,01	0,08±0,01	$0,10_5$±$0,02_4$
5	-	-	-	-	-	-
	0,10	0,11±0,02	0,10±0,02	0,09±0,01	0,08±0,01	$0,10_5$±$0,02_1$

BÖLÜM DÖRT
SONUÇLAR

Bu çalışmada, gıdalarda kalıntı oluşturan penisilin grubu bazı antibiyotiklerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayinleri öncesi ekstraksiyon işlemi için hazırlanan iyonik sıvı ile modifiye edilmiş kitosan sorbentlerinin kullanılabileceği gösterilmiştir.

Bu amaçla, alkil grupları butil veya oktil olan 1-alkil-3-metil-imidazolyum katyonu ve hegzaflorofosfat anyonlarından birini içeren iyonik sıvılar sentezlenip, yapıları karakterize edilmiştir. Sentezlenen iyonik sıvılar ile kitosan etkileştirilerek iyonik sıvı ile modifiye edilmiş kitosan sorbentleri hazırlanmış ve aynı şekilde karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Çalışılan penisilin grubu beş antibiyotiğin [amoksisilin (AMX), ampisilin (AMP), penisilin V (PENV), oksasilin (OXA), kloksasilin (CLO)] HPLC' de ayrılmaları ve nicel analizleri için uygun kromatografik şartlar belirlenmiştir.

Antibiyotiklerin ekstraksiyonları için hazırlanan kitosan sorbentleri ile adsorpsiyon yönteminin pH, adsorban miktarı, desorpsiyon çözeltisi ve hacmi, adsorpsiyon ve desorpsiyon akış hızları parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Penisilinler için uygun optimizasyon koşulları sağlanarak geliştirilen yöntemin, hayvansal gıda örneklerindeki (yumurta ve tavuk eti) antibiyotik tayinine uygulanabilirliği test edilmiştir. Çalışılan hayvansal gıda örneklerinde belirlenen antibiyotik kalıntı düzeylerinin, Avrupa Birliği'nce izin verilen sınır değerlerin altında olması nedeniyle bu gıdaları tüketmenin insan sağlığı açısından herhangi bir risk teşkil etmeyeceği sonucuna varılabilir. Önerilen adsorpsiyon ve HPLC yönteminin gıda örneklerine uygulanabilirliği, tekrarlanabilir ve güvenilir olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Akın, D., Yakar, A. ve Gündüz, U. (2012*)*. Nanoparçacıklar ile sulu ortamdan Bromtimol mavisinin adsorpsiyonu. *Onuncu Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi*, 3-6 Eylül 2012, Koç Üniversitesi, İstanbul.

Avrupa Birliği Halk Sağlığı (1990). Volume 8 Maximum residue limits guidelines. *Eudralex*, *2377*.

Avrupa Birliği Halk Sağlığı (2003). EU prohibits antibiotics as growth promoters. *Feed Technology*, *7*.

Berthod, A., Ruiz-Angel, M. J. ve Carda-Broch, S. (2008). Ionic liquids in separation techniques. *Journal of Chromatography A, 1184*, 6-18.

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

Booth, J. M. ve Harding, F. (1986). Testing for antibiotic residues in milk. *Veterinary Record, 119*, 565-569.

Briscoe, E. S., McWhinney, B.C., Lipman, J., Roberts, J.A. ve Ungerer, J.P.J (2012). A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, *907*, 84-178.

Carson, M. C., Righter, R. F. ve Wagner, D. D. (1994). Residues of veterinary drugs and mycotoxins in animal products. *In Proceedings Offorts Electronic Mail Conference*.

Carvalho, E.D., David, G. S. ve Silva, J. R. (2012). Health and Environment in Aquaculture. *InTech 9*, 159-161. Hırvatistan.

Cha, J. M., Yang, S. ve Carlson, K.H. (2006). Trace determination of Beta lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1115*, 46-57.

Chafer-Pericas, C., Maquieira, A. ve Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry, 29*, 1038-1049.

Choi, J. H. ve Ryu, K. S. (1987). Response of broiler chicks to dietary zinc bacitracin at two different planes of nutrition. *British Poultry Science, 28,* 113-8.

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

Cordle, M. K. (1988). USDA regulation of residues in meat and poultry products. Journal of Animal Science, *66*, 413-433.

Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M. ve Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, *36*, 981-1014.

Dafwang, L. L., Cook, M.E. ve Sunde, M. L. (1987). Interaction of dietary antibiotic supplementation and stocking density on broiler chick performance and immune response. *British Poultry Science*, *28*, 47-55.

Di Corcia, A. ve Nazzari, M. (2002). Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *Journal of Chromatography A, 974*, 53-89.

Dzidic, S., Suskovic, J. ve Kos, B. (2008). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology and Biotechnology*, *46*, 11-21.

Evaggelopoulou, N. E. ve Samanidou, V. F. (2013). Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (Sparus Aurata) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Food Chemistry, 136*, 3-4.

Gao, P., Munir, M. ve Xagoraraki, I. (2012). Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment, 421–422,* 173-183.

Gustafson, R.H. ve Bowen, R. E. (1997). Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology, 83*, 531-541.

Joshi, S. (2002). HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *25*, 795-809.

Johnston, A. M. (2000). HACCP and farm production. *Woodhead publishing in Food Science and Technology*. Cambridge.

Karen, L.C. (1999). Sulphonamides: Updates on veterinary medicine. *Veterinery Dermotology, 10*, 205-215.

Kaya, S. ve Şahal, M. (1989) Besinlerimizdeki ilaç kalıntıları, bunlara ilişkin tolerans düzeyleri, ilaç verilmiş hayvanlarda uyulması gereken kesim öncesi bekletme veya sütün kullanılmama süreleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 36*, 390-403.

Kaya, S. ve Ünsal, A. (2007). *Besinlerdeki ilaç kalıntıları, Uygulamalı Farmakoloji* (3. Baskı). Medisan Yayınevi, Ankara.

Kayaalp, O. (1978). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji kitabı* (12. Baskı). Ankara: Pelikan Kitabevi.

Khardori, N. (2006). Antibiotics Past, Present, and Future. *Medical Clinics of North America, 9*, 49-76.

Kümmerer K. ve Henninger, A. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, *9*, 12-14.

Kinsella,B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloneya, M., Cantwella, H., Fureyb, A. ve diğer. (2009). Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drugresidue analysis. *Journal of Chromatography A, 13*, 7977-8015.

Kyzas, G. Z., Kostoglou, M., Lazaridis, N. K., Lambropoulou, D. A. ve Bikiaris, D. N. (2013) . Environmental friendly technology for the removal of pharmaceutical contaminants from wastewaters using modified chitosan adsorbents. *Chemical Engineering Journal*, *222*, 248-258.

Lamar, J. ve Petz, M. (2007). Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices. *Analytica Chimica Acta*, *586*, 296-303.

Lara, F. J., Iruela, M., Blanco, C., Molina, C. ve Campaña, A.G. (2012). Advances in the determination of beta-lactam antibiotics by liquid chromatography. Trends in *Analytical Chemistry, 38*, 52-66.

Lawrence, E. (1992). Henderson's dictionary of biological terms, (10th Edition). *Longman Scientific and Technical*. Singapore.

Mandell, G. L., Bennett J.E. ve Dolin, R. (2000). *Mandell, Douglas and Bennett's principles and pratice of infection diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone.

Meng, M. ve Xi, R. (2011). Current development of immunoassay for analyzing veterinary drug residue in foods and food products. *Analytical Letters, 44 (15),* 2543-2558.

Miranda, C., ve Zemelman, R. (2002). Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *In Aquaculture, 212*, 31-47.

Mussman, H. C. (1975). Drug and chemical residues in domestic animals. Federaiton Proceedings, *34*, 197-201.

Önalan, F. ve Gönen, F. (2013). Telon blue AGLF tekstil boyarmaddesinin kitosana adsorpsiyonunun incelenmesi. *Onuncu Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi*, 3-6 Eylül 2012, Koç Üniversitesi, İstanbul.

Öncül, O. (2002). *Antibiyotikler I*. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinlerde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi No: 31.

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

Pena, B., Gonzalez, M.E.L, Rodera, A. I. ve Bondi, M. (2006). Evolution of mixed mode solid phase extraction cartridges fort the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using luquid chromatography with UV-DAD detection. *Analytica Chimica Acta*, *556*, 415-422.

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

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., ve diğer. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Pico, Y. ve Barcelo, D. (2008). The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants. *Trends in Analytical Chemistry, 27*, 821-835.

Pichon, V. (2000). Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *Journal of Chromatography A, 885*, 195-215.

Poole, C. F., Gunatilleka, A. D. ve Sethuraman, R. (2000). Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A, 885 (1-2)*, 17-39.

Prasad, S. ve Smith, P. (2013). Meeting the threat of antibiotic resistance: Building a new frontline defence. *Office of the Chief Scientist*.

Raynor, B. R. (1997). Penicillin and ampicillin. *Department of Gynecology and Obstetrics*, 147-152.

Samanidou, V. F. ve Evaggelopoulou, E. N. (2007). Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. *Journal of Separation Science, 30*.

Samanidou, F. V., Evaggelopoulou, E. N. ve Papadoyannis, N. I. (2006). Chromatographic analysis of penicillins in pharmaceutical formulations and biological fluids. *Journal of Separation Science*, *12*.

Sawant, A., Sordillo, L. ve Jayaro, B. (2005). Assessment of antibiotics usage in dairy herds in Pennsylvania, *Journal of Dairy Science, 88*.

Schneider H. C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M., ve diğer. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature, 3717*, 68–74.

Soares, G.M., Figueiredo, L.C., Faveri, M., Cortelli, S. C., Duarte, P.M. ve Feres, M. (2012). *Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs*. Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brezilya.

Sornein, M., Cannes, C., Naour, C., Mendes, M. ve Hennig, C. (2011). Electrochemical behavior of $[UO_2Cl_4]^{2-}$ in 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *Science China Chemistry*, *55*.

Stevenson, D. (2000). Immuno-affinity solid phase extraction. *Journal of Chromatography B*, *745,* 39-48.

Şenel, S. ve McClure, S. J. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, *56,* 1467-1480.

Takatsuki, K., Ushizawa, I. ve Shoji, T. (1987). Gas chromatographic -mass spectrometric determination of macrolide antibiotics in beet and park using singlelon monitoring. *Journal of Chromatography A, 391*, 207-217.

Tiryaki, O. (2006). Method validation for the analysis of pesticide residues in grain by thin-layer chromatography. *Accreditation and Quality Assurance, 11*, 506-513.

Walsh, T., Trauger, J. W., Courvalin, P. ve Davies, J. (2011) A poster describing mechanisms of antibiotic action and resistance. *Trends in Microbiology, 65,* 232-260.

Wang, J., Leung, D. ve Lenz, S. P. (2006). Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 2873–2880.

Wang, J., MacNeil, J. D. ve Kay, J. F. (2012). *Chemical analysis of antibiotic residues in food*. Wiley & Sons Inc. Canada.

Welton, T. (1999). Room-temperature ionic liquids. solvents for synthesis and catalysis. *American Chemical Society*, *11*, 2071-2084.

Wei, Y., Huang, W., Zhou, Y., Zhang, S., Hua, D. ve Zhu, X. (2013). Modification of chitosan with carboxyl-functionalized ionic liquid foranion adsorption. *International Journal of Biological Macromolecules*, *62*, 365-369.

World Health Organization (WHO). (1988). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. *The 32nd Report Of The Joint FAO/WHO Expert Committe On Food Additives*, Cambridge University Pres, Cambridge.

World Health Organization (WHO). (2005). *Guidelines on stiation analysis for public health pesticide management*, Genava.

Wu, F., Tseng, R. ve Juang, R. (2010). A review and experimental verification of using chitosan and its derivatives as adsorbents for selected heavy metals. *Journal of Environmental Management*, *91*, 798-806.

Yavuz, O. ve Aksoy, A. (2006). Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu metodu. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 20*, 259-269.

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

Zhang, Y. (2007). *Mechanisms of antibiotic resistance in the microbial world*. Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University. Baltimore.

Zief, M. ve Kiser, Z. (2005). Solid phase extraction for sample preparation. *A Technical Guide to a Theory, Method Development and Use*. Philipsburg.