DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOKRİN BOZUCU KİRLETİCİLERDEN SÜLFONAMİDLERİN GİDERİLMESİNE YÖNELİK AFİNİTE MATRİKSİNİN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

Gözde KILIÇ

Şubat, 2016
İZMİR

ENDOKRİN BOZUCU KİRLETİCİLERDEN SÜLFONAMİDLERİN GİDERİLMESİNE YÖNELİK AFİNİTE MATRİKSİNİN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Gözde KILIÇ

Şubat, 2016
İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

GÖZDE KILIÇ, tarafından **PROF. DR. M. NALAN TÜZMEN** yönetiminde hazırlanan **"ENDOKRİN BOZUCU KİRLETİCİLERDEN SÜLFONAMİDLERİN GİDERİLMESİNE YÖNELİK AFİNİTE MATRİKSİNİN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN

Yönetici

Prof. Dr. Hülya AYAR KAYALI

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Bilgen Osman

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Ayşe OKUR

Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca, tezin hazırlanmasında ve hayatımın her alanında destek ve yardımını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımda bana yardımcı olan sayın Doç. Dr. Bilgen OSMAN'a verdiği destekten ötürü çok teşekkür ederim.

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

Gözde KILIÇ

ENDOKRİN BOZUCU KİRLETİCİLERDEN SÜLFONAMİDLERİN GİDERİLMESİNE YÖNELİK AFİNİTE MATRİKSİNİN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

ÖZ

Antibiyotikler hayvan hastalıklarını engellemek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antibiyotikler, insanlarda alerjik reaksiyonlardan endokrin sisteme ait bozukluklara kadar geniş bir yelpazede sağlık sorunlarına, mikroorganizmalarda da direnç gelişimi gibi etkilerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Yoğun kullanımlarının sonucu olarak antibiyotik kalıntıları, çevresel örneklerin yanı sıra hayvansal ürünlerde de belirlenebilmektedir ve uzun bir süredir gıda ve çevresel örneklerdeki antibiyotik kalıntılarının varlığına bağlı potansiyel sağlık sorunları tartışılmaktadır. Öte yandan, son derece karmaşık yapıdaki gıda örneklerinde eser düzeyde bulunan antibiyotik kalıntılarının doğru tayini oldukça zordur. Bu yüzden, eser miktarda bulunan bileşiklerin analiz öncesi zenginleştirilmesi gerekli bir zorunluluktur. Bu amaçla, etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve N-metakriloil-L-triptofan metil ester (MATrp) monomerleri kullanılarak hayvansal gıda örneklerindeki sülfonamid grubu antibiyotiklerin tayini ve uzaklaştırılmasına yönelik yeni bir afinite sorbenti [poli (etilen glikol dimetakrilat-N-metakriloil-L-triptofan metil ester) (p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri] geliştirildi. Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve şişme deneyleri ile karakterize edilen p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin, sülfonamid grubu sülfomerazinin zenginleştirilmesinde kullanılmak amacıyla adsorpsiyon parametreleri (süre, pH, başlangıç derişimi gibi) optimize edildi. Geliştirilen sorbentin hayvansal gıda (yumurta ve süt) örneklerindeki antibiyotik kalıntı miktarlarının yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini ve uzaklaştırılmasında uygulanabilirliği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik, sülfomerazin, afinite sorbenti, HPLC

PREPARATION AND APPLICATION OF AFFINITY MATRIX TO REMOVE SULFONAMIDES AS ENDOCRINE DISRUPTER POLLUTANTS

ABSTRACT

Antibiotics have been widely used for the prevention of animal diseases. Antibiotics cause a wide range of health problems from allergic reactions to endocrine disorders in humans and resistance development in microorganisms. As a result of their extensive use, antibiotic residues are detected in animal products as well as in the environment. Potential health risks due to the presence of antibiotic residues in food and the environment have been discussed for a long time. On the other hand, accurate determination of trace amount of the antibiotic residues is very difficult because of the complexity of the food. Therefore, preconcentration of these compounds which are in trace levels is necessary before analysis. For this purpose, a new affinity sorbent [poly (ethylene glycol dimethacrylate-N-methacryloyl-L-tryptophane methyl ester) (p(EGDMA-MATrp) microspheres], were developed by using ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and N-methacryloyl-L-tryptophane methyl ester (MATrp) monomers for the extraction of sulfonamide group of antibiotics in food samples of animal origin before analysis. P(EGDMA-MATrp) microspheres were characterized with fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscobe (SEM), and swelling tests. Adsorption parameters (contact time, pH, initial concentration etc.) were optimized for the preconcentration of sulfamerazine in sulfonamide group. Applicability of the developed sorbent for the analysis and removal of antibiotic residues in the food samples of animal origin such as egg and milk with high performance liquid chromatography was also determined.

Keywords: Antibiotic, sulfamerazine, affinity sorbent, HPLC

İÇİNDEKİLER

Sayfa

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

BÖLÜM BİR-GİRİŞ 1

1.1 Antibiyotikler 2
1.1.1 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması 2
1.2 Sülfonamidler 8
1.2.1 Sülfonamidlerin Sınıflandırılması 12
1.3 Sülfomerazin 13
1.3.1 Antibiyotiklerin Metabolizması ve Endokrin Sistem Üzerine Etkileri 14
1.4 Veteriner İlaç Olarak Kullanılan Antibiyotikler 15
1.5 Kalıntı Kaynakları ve Kalıntıların İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi 17
1.6 Maksimum Kalıntı Limitleri (MRL) 18
1.7 Kalıntı Tayinin Önemi 18
1.8 Antibiyotik Kalıntılarının Analizinde Kullanılan Yöntemler 19
1.8.1 Kalıntı Analizi Öncesi Numune Hazırlama 21
1.9 Afinite Sorbentleri 25
1.10 Çalışmanın Amacı 28

BÖLÜM İKİ- MATERYAL VE METOT 29

2.1 Reaktifler 29

2.2 Kullanılan Cihazlar 30
2.3 p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Sentezlenmesi 30
2.3.1 p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Karakterizasyonu 31
2.4 Sülfomerazinin Adsorpsiyonunun Optimizasyanu 32
2.4.1 SMR Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi 32
2.4.2 SMR Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi 33
2.4.3 SMR Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisi 33
2.4.4 SMR Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi 33
2.4.5 SMR Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi 33
2.4.5 SMR Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi 34
2.5 Desorpsiyon 34
2.6 Sülfomerazinin HPLC ile Analizi 35
2.7 Hayvansal Gıda Örneklerindeki Sülfomerazinin Adsorpsiyonu 36
2.7.1 Yumurta Örneklerinin Hazırlanması 36
2.7.2 Süt Örneklerinin Hazırlanması 36

BÖLÜM ÜÇ- BULGULAR VE TARTIŞMALAR 37

3.1 p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Karakterizasyonu 37
3.1.1 p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin SEM Analizleri 37
3.1.2 p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin FTIR Analizleri 38
3.2 p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelere Sülfomerazin Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu 40
3.2.1 SMR Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi 40
3.2.2 SMR Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi 40
3.2.3 SMR Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisi 41
3.2.4 SMR Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi 42
3.2.5 SMR Adsorpsiyonuna pH Etkisi 43
3.2.6 SMR Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi 44
3.3 Desorpsiyon Çalışmaları.. 45
3.4 Hayvansal Gıda Örneklerinde Sülfomerazin Tayini 46

BÖLÜM DÖRT- SONUÇLAR 48

KAYNAKLAR 50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Antibiyotiklerin etki derecelerine göre sınıflandırılması 4
Şekil 1.2 Bakteri hücre duvarı yapısı 5
Şekil 1.3 Antibiyotik etki mekanizmaları 7
Şekil 1.4 Para-amino benzen sülfonamid (sülfanilamid) 8
Şekil 1.5 14 sülfonamid türevinin kimyasal yapısı 10
Şekil 1.6 Sülfonamid ve PABA (para-amino benzoik asit) arasındaki yapı benzerliği ……11
Şekil 1.7 Sülfonamid etki mekanizması 11
Şekil 1.8 Sülfonamidlerin sınıflandırılması 12
Şekil 1.9 Sülfomerazinin yapısı 13
Şekil 1.10 Adsorpsiyon kolonunun yapısı 23
Şekil 1.11 Kolon tipi adsorpsiyon yöntemi ile maddelerin ayrılma şekilleri 23
Şekil 1.12 Afinite sistemin şematik gösterimi 26
Şekil 2.1 Sülfomerazinin (SMR) açık yapısı 29
Şekil 2.2 p(EDGMA-MATrp) mikroküresinin sentezine ait reaksiyon şeması 31
Şekil 3.1 p(EGDMA-MATrp) mikroküresinin SEM görüntüleri a) küresel form b) büyütülmüş yapı 37
Şekil 3.2 FTIR spektrumları (a) MATrp (b)p(EGDMA-MATrp) 39
Şekil 3.3 SMR adsorpsiyonuna süre etkisi 40
Şekil 3.4 SMR adsorpsiyonuna sorbent miktarının etkisi 41
Şekil 3.5 SMR adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi 42
Şekil 3.6 SMR adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi 43
Şekil 3.7 SMR adsorpsiyonuna ph etkisi 44
Şekil 3.8 SMR adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisi 45
Şekil 3.9 Sülfomerazinin farklı desorpsiyon ajanlarındaki % desorpsiyon sonuçları 45
Şekil 3.10 p(EGDMA-MATrp) mikroküresinin tekrar kullanılabilirliği 46

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması 7
Tablo 2.1 Sülfomerazinin pKa değerleri 29
Tablo 2.2 Deneyde kullanılan cihazlar.....30
Tablo 2.3 Çalışılan desorpsiyon ajanları 35
Tablo 3.1 Süt ve yumurta örneklerinde sülfomerazinin analiz sonuçları.....47

BÖLÜM BİR
GİRİŞ

Endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunu değiştiren ekzojen madde ya da madde karışımları olarak tanımlanan endokrin bozucular, hormonların üretim, salınım, bağlanma, taşınma, aktivite, biyotransformasyon ve vücuttan atılımlarını etkilemektedir. Doğada doğal olarak bulunan endokrin bozucuların, yarı ömürleri kısa olduğundan dokularda birikmeden kolayca vücuttan atılırlar. Bu nedenle, yoğun ve çok miktarlarda alınmadıkları sürece önemli bir yan etkiye neden olmazlar. Öte yandan, endüstride, tarımda, ev ve günlük kullanımda yer alan sentetik endokrin bozucular, yağ dokuda birikebildiklerinden ve vücuttan atılımları yavaş olduğundan ciddi sağlık sorunlarına neden olurlar. Endokrin bozucular, özellikle üreme sistemi ve tiroit fonksiyonlarını etkilemekle birlikte meme, prostat, testis gibi çeşitli kanser oluşumları, trombosit agregasyon bozuklukları ve kemik mineral yoğunluğunun bozulması gibi çok çeşitli sağlık problemlerine yol açabilir. Daidzein ve enterolakton gibi fitoöstrojenler, dioksin ve furanlar gibi organohalojenler, atrazin ve lindan gibi pestisidler, fitalatlar, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metaller, bisfenol A gibi ksenobiyotikler ile doğum kontrol hapları ve antibiyotikler gibi farmasötikler başlıca endokrin bozucular dır.

Antibiyotikler, östrojenler, ilaç etken maddeleri gibi çok çeşitli farmasötikler, oldukça düşük derişimlerde gıdalarda, sediment ve toprak gibi çevresel örneklerde bulunmaktadır. Eser düzeyde (ppb seviyesinde) bulunmaları nedeniyle kirletici olarak farmasötiklerin gıda ve çevresel örneklerdeki varlığı gözden kaçmaktadır. Ancak son yıllardaki çalışmalar, farmasötiklerin düşük derişimlerinin bile çevre ve insan sağlığını olumsuz etkileyeceğini göstermektedir (Desbrow ve diğer, 1998; Routledge ve diğer, 1998). Çeşitli farmasotikler arasında da antibiyotikler, kullanımları tüm dünyada hızla arttığından yoğun ilgi çekmektedir (Kasprzyk-Hordern, Dinsdale ve Guwy, 2009).

1.1 Antibiyotikler

Bakteriyel enfeksiyonları önlemek için terapötik amaçla insan ve hayvanlarda yaygın olarak kullanılan antibiyotikler, mikrobiyolojik sentez yöntemiyle oluşturulan biyoaktif ve kemoterapötik gruplar arasındaki en önemli üyelerdendir (Joshi, 2002). Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilebilen antibiyotikler, diğer mikroorganizmaların büyümesini önleyen ya da ölümüne neden olan kimyasal maddelerdir (Evaggelopoulou ve Samanidou, 2013).

Antibiyotik kullanımı ile geçmiş yıllarda çok sayıda ölüm ve ekonomik kayba neden olan birçok hastalık, günümüzde henüz ortaya dahi çıkmadan önlenebilmektedir. Fakat bunun yanı sıra antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı bazı olumsuz durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Antibiyotiklerin olumsuz etkileri arasında şiddetli ürtiker, hemolitik anemi ve anafilaksi yelpazesinde alerjik reaksiyonlar, gastrointestinal bozukluklar, hepatotoksisite, nefrotoksisite, nörotoksisite, kemik ve kıkırdak yapı bozuklukları, infertilite gibi endokrin sisteme ait bozukluklar gibi ciddi sağlık problemleri yer almaktadır (Shapiro, Goldberg, Brunton, Lazo ve Parker, 2006). Bununla birlikte, antibiyotiklerin çiftlik ve kümes hayvanlarında büyüme ve gelişmeyi teşvik edici amaçla yem katkı maddesi olarak kullanılmaları, hayvansal gıdalarda kalıntılara, bu gıdaları tüketen kişilerde alerjik reaksiyonlara, hayvan ve insanlarda hastalığa sebep olan mikroorganizma türleri arasında dirençli suşların oluşmasına sebep olmaktadır (Carson, Righter ve Wagner, 1994; Di Corcia ve Nazzari, 2002; Evaggeloupulou ve Samanidou, 2013; Philips ve diğer., 2004; Wang, Leung ve Lenz, 2006). Bu suşlar, hayvandan hayvana ve hayvandan insana geçen hastalıkların yaygınlaşmasına neden olmakla beraber aynı zamanda kendisine daha önceden verilmiş olan antibiyotiğin etkinliğini de azaltmaktadır (Karen, 1999).

1.1.1 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler, kimyasal yapılarına göre, etki mekanizmalarına göre ya da mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre çeşitli kategorilerde

sınıflandırılabilirler. Antibiyotikler, birbirlerinden farklı kimyasal yapılara sahiptirler ve bakteri mekanizmasının farklı kısımlarında etkinlik gösterirler.

Genel olarak antibiyotikler bakteri mekanizmasındaki etkinliklerine göre iki gruba ayrılır (Prasad ve Smith, 2013) :

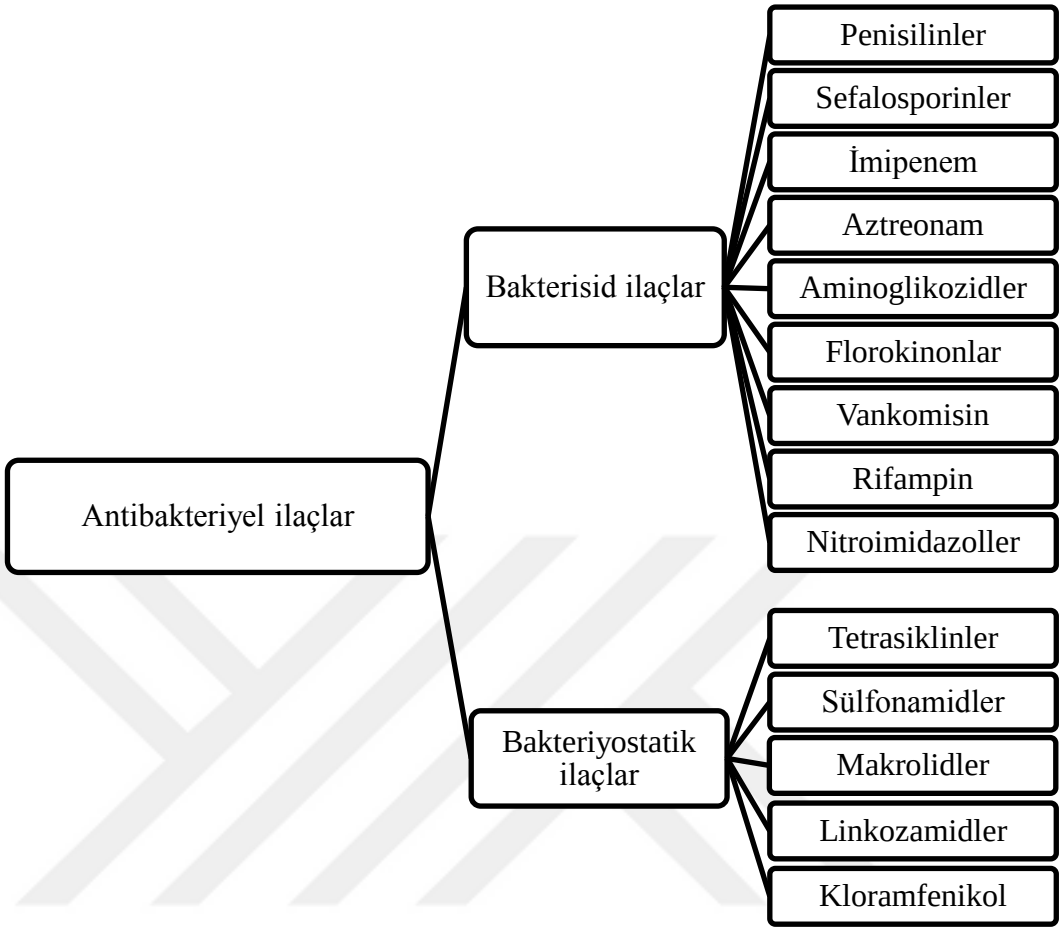
Bakterisid olanlar

Bu tür antibiyotikler, bakterinin hücre duvarına ya da hücre içerisine etki ederler ve böylece doğrudan bakteri hücresini yok ederler. Florokinolonlar, vankomisinler ve penisilinler bu gruba örnek verilebilir (Carvalho, David ve Silva, 2012; Zhang ve Yew, 2009).

Bakteriyostatik olanlar

Bu türdeki antibiyotikler, bakteriyi doğrudan öldüremezler; bakteri hücrelerinin büyümesini, gelişmesini ve üremesini önlerler. Tetrasiklinler, kloramfenikoller ve sülfonamidler bu gruba örnek gösterilebilir (Carvalho ve diğer., 2012; Zhang ve Yew, 2009).

Bakterisid ve bakteriyostatik ilaç örneklerinden bazıları Şekil 1.1’ de verilmiştir.



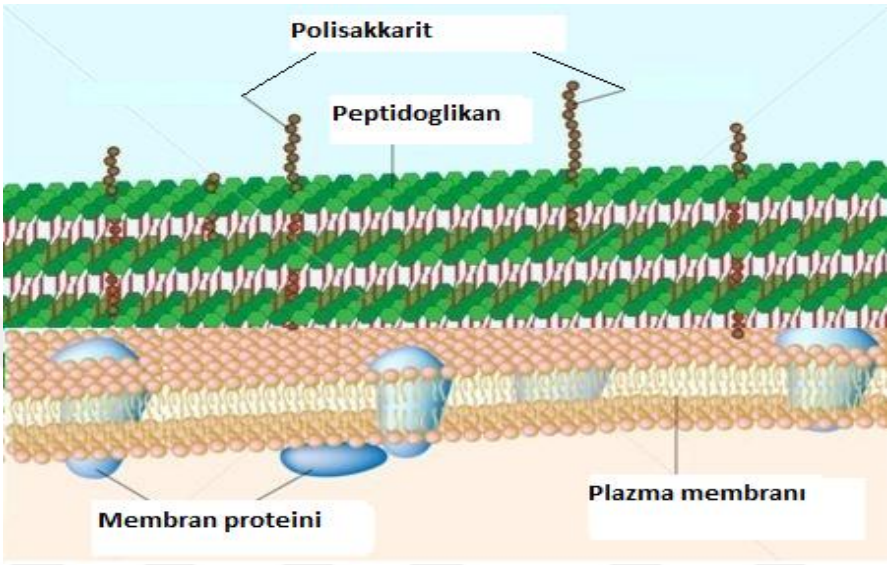
Şekil 1.1 Antibiyotiklerin etki derecelerine göre sınıflandırılması

Antibiyotikler, etki mekanizmalarına göre beş grupta toplanırlar (Zhang ve Yew, 2009):

1.Bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive edenler:

Bakteri hücresi, diğer hücrelerden farklı olarak lipoprotein yapısındaki sitoplazma membranın yanı sıra bir de bu membranın dış yüzeyini çevreleyen, bakterinin bütünlüğünü koruyan, bölünme ve çoğalmasını sağlayan kısmı olan sert bir hücre duvarına sahiptir (Şekil 1.2). Hücre duvarı murein denilen bir polimer bileşikten oluşmaktadır. Bu madde, bir mukopolisakkarit olan lineer peptidoglikan zincirlerinin yan dallarla birbirine bağlanması ile meydana gelir. Bakteri hücre duvarı peptidoglikan yapısı sayesinde etkinliğini gösterir. Antibiyotiklerden bazıları, bakteri hücre duvarının sentezinde rol alan biyokimyasal tepkimeleri bozarlar ve bu sayede

hücre duvarı oluşamadığından dolayı bakteri hücresi ölür. Bu sınıfta bulunan antibiyotiklerin, gelişmesini tamamlamış olan bakteriler üzerinde etkisi yoktur; çünkü bu bakteriler hücre duvar oluşumlarını tamamlamışlardır. Bu nedenle bu tür ilaçlar, özellikle gelişmekte ve üremekte olan bakteriler üzerinde bakterisid etki gösterirler (Carvalho ve diğer., 2012; Kayaalp, 2002).



Şekil 1.2 Bakteri hücre duvarı yapısı

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

Bazı yüzey aktif antibiyotikler, mikroorganizma için gerekli maddelerin dış ortamdan pasif difüzyon veya aktif transportla alındığı osmotik bir engel olan sitoplazma membranının geçirgenliğini arttırmak suretiyle sitoplazma içinde önemli etkiye sahip küçük moleküllü bileşiklerin (aminoasitler, nükleotidler, potasyum gibi) hücreden dışarı çıkmasına neden olarak bakterisid etki oluştururlar ve mikroorganizmanın ölümüne neden olurlar. Bu türdeki antibiyotikler, hücre duvarı sentezini bozan antibiyotiklerin aksine, büyümesi, gelişmesi ve üremesi tamamlanmış olan mikroorganizmaları da öldürür (Kayaalp, 2002).

3. Ribozomlarda protein sentezini bozanlar:

Antibakteriyel spektrumları oldukça geniş olan bu türdeki antibiyotikler, gerek Gram-pozitif gerekse Gram-negatif mikroorganizmaların gelişimini inhibe ederler. Birçoğu bakteriyostatik etki yaparken aminoglikozidler gibi bazı türleri ise bakterisid etki yaparlar. Bu türdeki antibiyotikler, bakterilerin 30S ve 50S ribozomal alt birimlerine bağlanır ve burada RNA tarafından kontrol edilen protein sentezini bozmak suretiyle etki gösterirler (Carvalho ve diğer., 2012; Kayaalp, 2002).

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

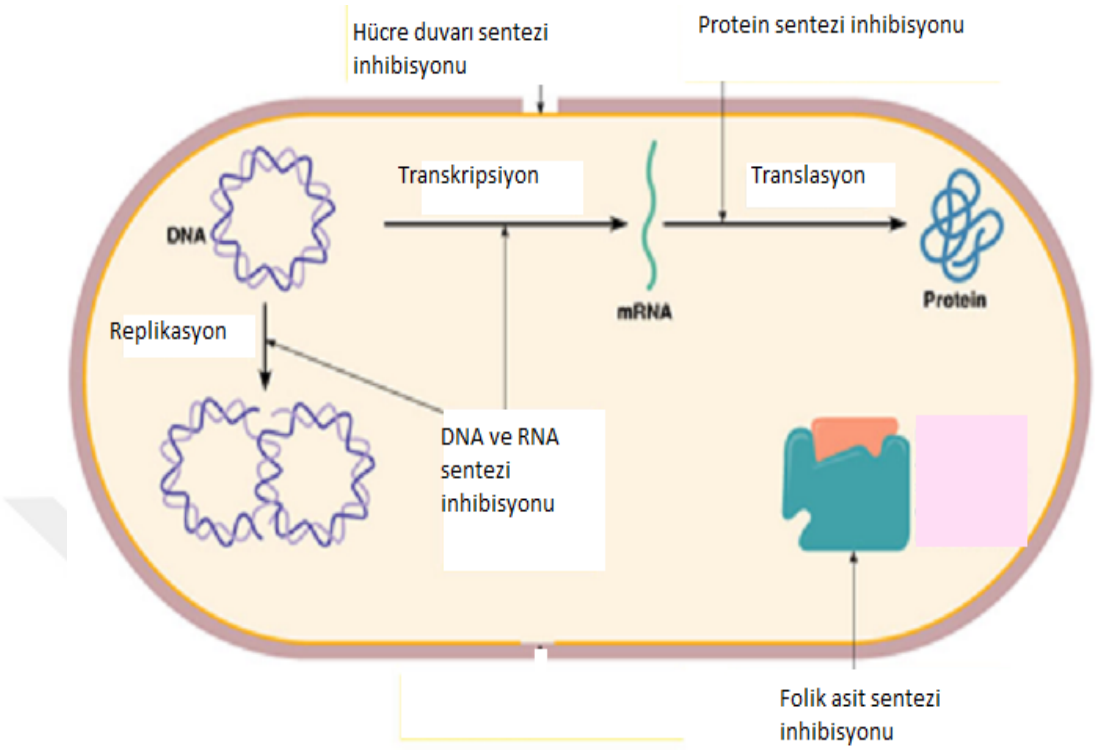
Bu grupta bulunan antibiyotikler, DNA sentezini veya mRNA sentezini bozarak etki gösterirler. Bu grupta memeli hücresinin çekirdeğini de etkileyen sitotoksik ilaçlar da vardır ve bir kısmı tümör tedavisinde kullanılır. Aktinomisinler, rifamisinler, kinolonlar, mitomisinler bu şekilde etkinlik gösteren antibiyotiklere örnektir.

Aktinomisinler ve rifamisinler, DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi yardımıyla genetik materyalde yapılan transkripsiyonu yani mRNA sentezini inhibe ederler. Kinolonlar, bakteri DNA'sını süper sarmal halde tutan ve DNA'nın transkripsiyonunda rol oynayan DNA giraz enzimini inhibe ederek etkili olur. Süper sarmal DNA yapısının bozulmasıyla DNA fonksiyonları bozulur ve bakteri ölür. Mitomisin ve diğer benzer antibiyotikler ise, dialkilleme yolu ile DNA çift zincirindeki DNA moleküllerinin çapraz bağlanmasını sağlamak suretiyle birbirinden ayrılmalarını önleyerek DNA replikasyonunu engeller (Kayaalp, 2002).

5. Folik asit sentezini inhibe ederek etki edenler:

Bir bakteri hücresi, DNA sentezi için gerekli olan folik asidi kendisi sentezler. Sülfonamid ve trimetoprim gibi antibiyotikler, folik asit sentezi için gerekli olan bazı enzimlerin sentezini engelleyerek antimikrobiyal etki gösterir (Chung, Lee, Chung ve Lee, 2009; Džidić, Šušković ve Kos, 2008).

Antibiyotiklerin etki mekanizması Şekil 1.3'te özetlenmiştir.



Şekil 1.3 Antibiyotik etki mekanizmaları

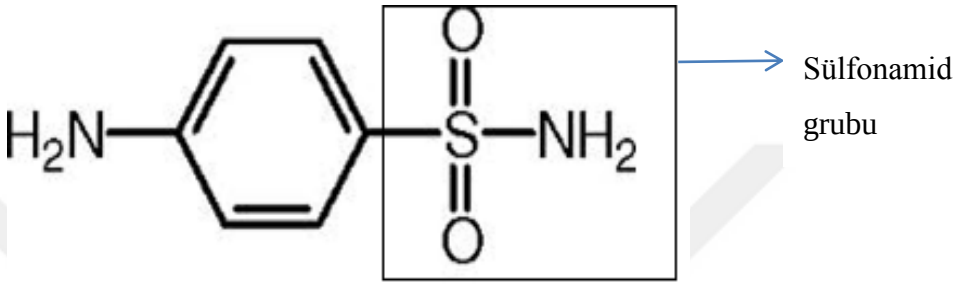
Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması Tablo 1.1'deki gibidir. Genellikle benzer toksisite ve alerjik etkinliğe sahip antibiyotikler, aynı zamanda benzer kimyasal yapıya sahiptir.

Tablo 1.1 Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması

Aminoglikozitler	İmidazoller
Fenikoller	Beta-laktam antibiyotikler
''Sülfonamidler''	Nitrofuranlar
Tetrasiklinler	Polipeptidler
Linkozamidler	Rifamisinler
Makrolidler	Florokinolonlar

1.2 Sülfonamidler

Bakteriyel enfeksiyonların tedavi ve önlenmesinde sistematik olarak yer alan ilk etkin kemoterapötikler olan sülfonamidler, ucuz olmaları nedeniyle özellikle veterinerlikte yaygın olarak kullanılmaktadır (Kayaalp,2002). Sülfonamidler (Şekil 1.4), genel yapı olarak benzen halkasına bağlı bir amin ve bu amine para konumunda bağlı bir sülfonamid grubu içerir (Won ve diğer., 2011).

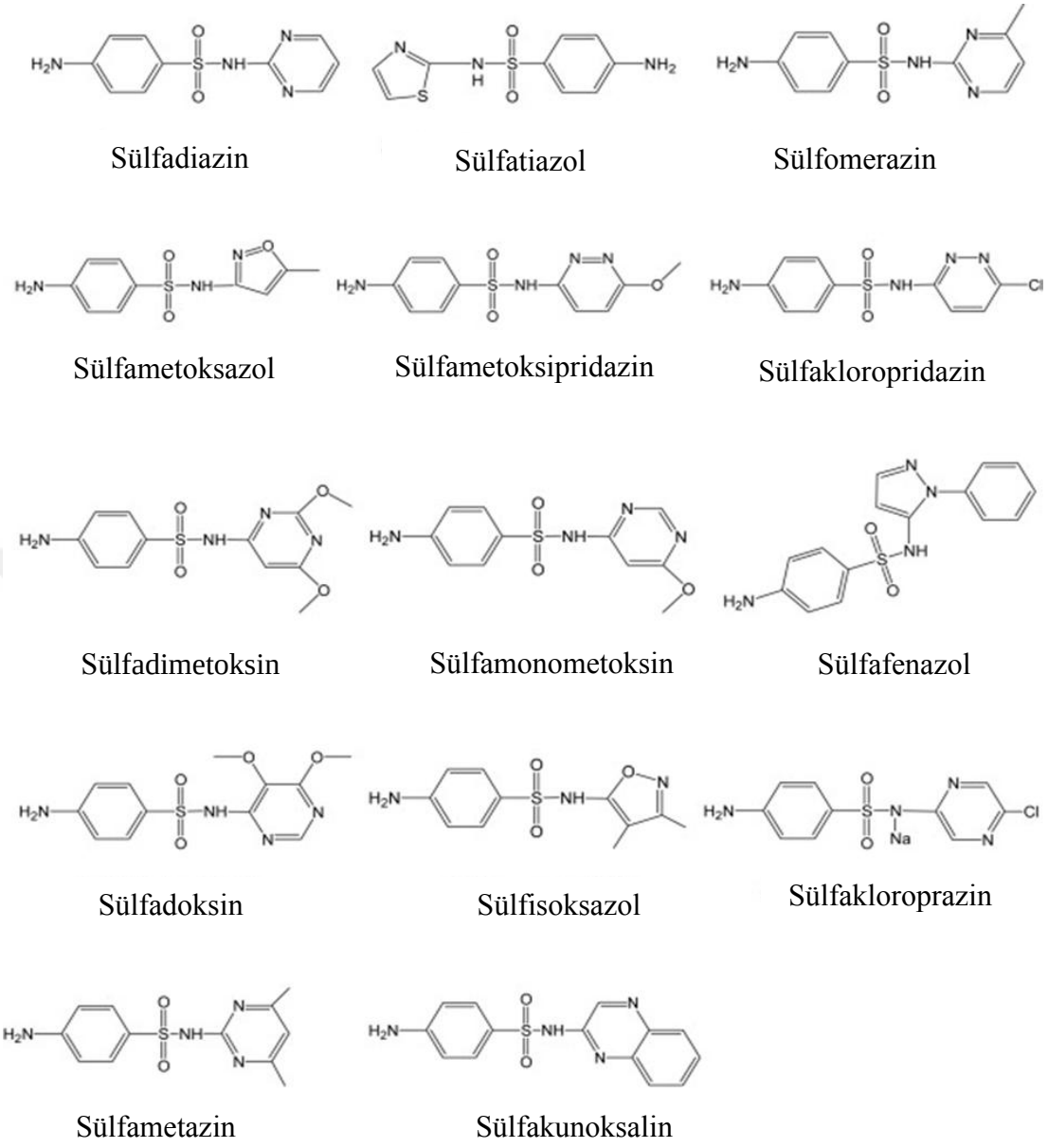


Şekil 1.4 Para-amino benzen sülfonamid (sülfanilamid)

İlk kez 1908'de Gelmo tarafından sentezlenen sülfanilamid veya diğer adıyla para-amino benzen sülfonamid, sülfonamidlerin en basit yapılı üyesidir. 1913'de Einsenberg, bazı azo bileşiklerinin in vitro antibakteriyel etkili olduklarını ortaya koymuştur. 1919'da da Heildelbergen ve Jacobs, yapısında p-amino benzen sülfonamid içeren kimyasal bileşiklerin hidrokuprein ile birleşerek in vitro bakterisid etki oluşturduklarını belirlemiştir (Şanlı ve Kaya, 1988). Sülfonamidler keşfedilmelerinin ardından geniş bir kullanım alanı bulmuş ve bir süre sonra etkili oldukları bakterilerin yol açtıkları hastalıklarda önemli azalma olmuştur (Booth ve McDonald, 1988). Penisilinler uygulamaya girinceye kadar, bulaşıcı hastalıkların tedavisinde geniş ölçüde kullanılmışlar, ancak daha sonra penisilinler ve diğer antibiyotiklerin bulunması ve tedavi işlerimde kullanılmaları ile önemleri zaman içinde giderek azalmıştır. Özellikle trimetoprim, ormetoprin gibi 2,4-diaminoprimidin (DAP) türevleriyle birlikte hazırlananları başta olmak üzere, bazıları günümüzde dahi birçok bakteriyel ve protozoal hastalığın kontrolünde halen geniş şekilde kullanılmaktadır (Kafalı, 2008; Kaya, Pirinçci ve Bilgili, 2007).

Tüm sülfonamidler aynı yapıya sahiptir (Hişmioğulları, 2004; Sweetman, 2009). Sülfonamidler, esas itibariyle sülfanilamid (para-amino benzen sülfonamid) maddesinin türevidir (Altıntaş, 2006; Kafalı, 2008). Yapısındaki azot atomlarından birinin yerine çeşitli gruplar bağlanarak, etki gücü ve süreleri birbirinden farklı çok sayıda sülfonamid bileşiği türetilebilir (Altıntaş, 2006). Günümüzde çok sayıda sülfonamid türevi sentezlenmiş olup, bunlardan sadece 25-30 kadarı uygulama alanı bulmuştur (Şahindokuyucu, 2003)(Şekil 1.5).

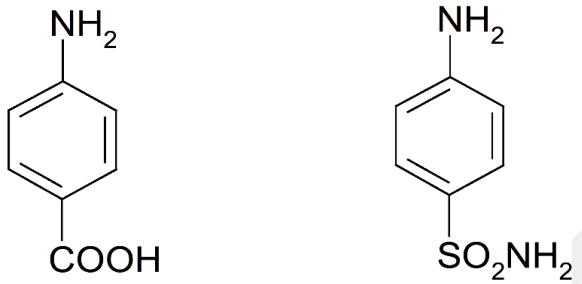
Bakteriler üzerindeki etkinliği açısından bakıldığında sülfonamid grubunun pek önemi yoktur; fakat taşıdığı gruplar yönünden bakıldığında molekülün en önemli kısmını oluşturur. Amid azotuna (N1) bağlanan gruplar bileşiğin farmakokinetiğini ve etki gücünü değiştirir; aynı zamanda bakteriler üzerindeki etkinliğin sağlanabilmesi için molekülde para amino grubunun serbest olarak bulunması gerekir (Riviere ve Papich, 2013). Buraya heterosiklik aromatik bir grubun bağlanmasıyla en etkili sülfonamid türevleri sentezlenmiş olur; fakat benzen halkasına bağlanması genellikle etki kaybıyla sonuçlanır (Kaya ve ark., 2007).



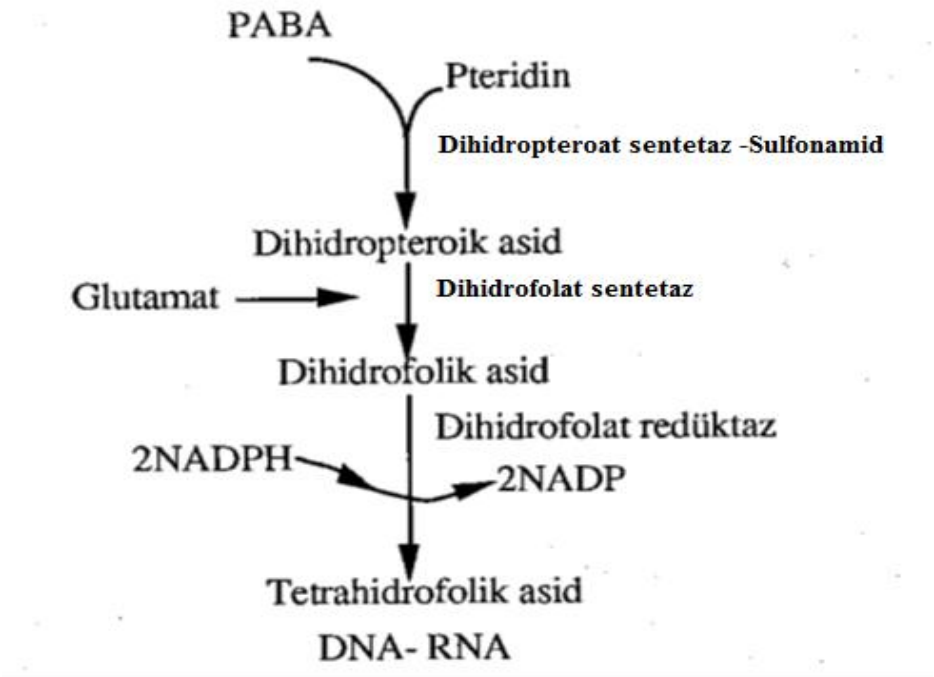
Şekil 1.5 14 Sülfonamid türevinin kimyasal yapısı (Won ve diğer, 2011)

Sülfonamidler, DNA yapısına katılan purin bazlarının sentezini inhibe ederek bakterilerde etki gösterir. Bakterilerin hücre duvarı, bu sentezde gerekli olan folik asit için geçirgen olmadığından bakteri, sentezlediği veya ortamdan aldığı para-amino benzoik asidi (PABA), dihidropteroat sentetaz enzimi ile dihidropteroik asite, onu dihidrofolat sentetaz enzimi ile dihidrofolik asite, onu da dihidrofolat redüktaz enzimi ile tetrahidrofolik asite çevirerek purin sentezini sağlar. Sülfonamidler bu sentez yolunda, PABA'ya benzerliği dolayısıyla (Şekil 1.6), dihidropteroat sentetaz enzimini inhibe ederek sentezin devamını engeller (Töreci, 2003)(Şekil 1.7). Sonuçta

pürin bazları ve timidin yapımını sağlayan enzimlerin kofaktörü olan tetrahidrofolat türevleri yapılamaz ve bakterilerde DNA ve RNA sentezi bozulur; metionin ve glisin sentezi de azalır. İnsanlar, folik asidi besinleri aracılığıyla alır ve ayrıca insan hücresi folik aside geçirgendir. Bu nedenle sülfonamidler memeli hücrelerinde yukarıda belirtilen öğelerin sentezini bozmaz (Kayaalp, 2002).



Şekil 1.6 Sülfonamid ve PABA (Para-amino benzoik asit) arasındaki yapı benzerliği



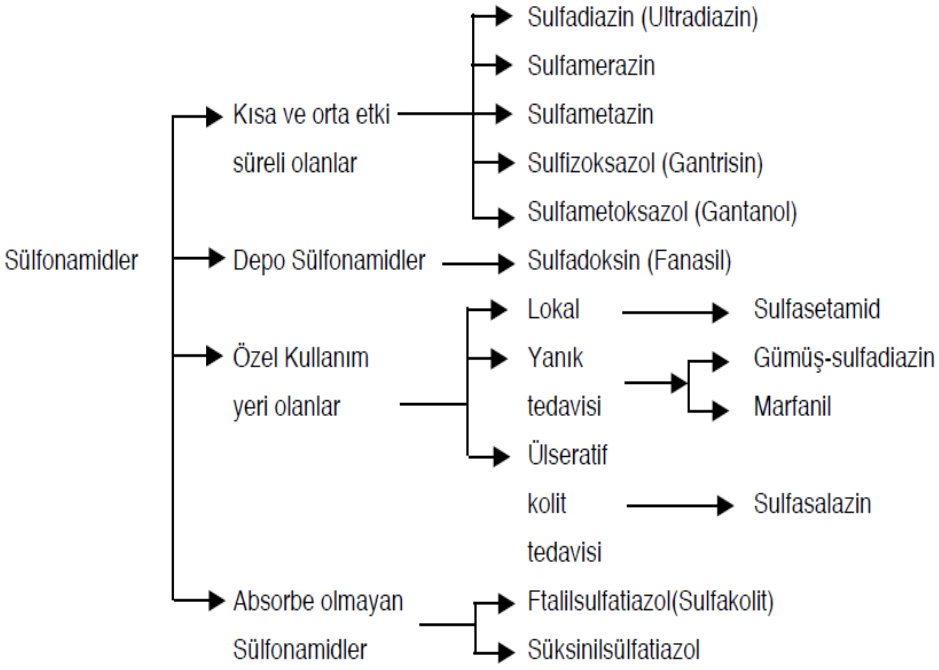
Şekil 1.7 Sülfonamid etki mekanizması

1.2.1 Sülfonamidlerin Sınıflandırılması

Sülfonamidler, uygulama yerlerinden emilme ve vücuttan atılma durumlarına göre;

- Hızla emilen ve atılanlar (Sülfanilamid, Sülfadiyazin, Sülfatiyazol, Sülfomerazin, Sülfametazin gibi)
- Hızla emilen ve yavaş atılanlar (Sülfadimetoksin gibi)
- Sindirim kanalında etkili olanlar
- Özel-yerel etkili olanlar şeklinde 4 grupta incelenir (Reiner, 1982).

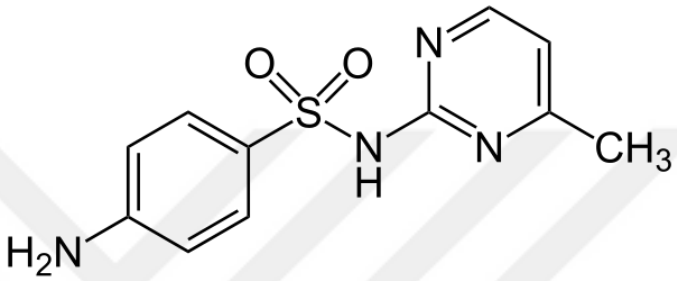
Ayrıca, etki ve eylemine göre sülfonamidler sistemik ve yerel etkililer olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Sistemik etkililer kısa, orta ve uzun etkililer diye kendi içinde tekrar sınıflandırılabilir. Yerel etkililer ise dışarıdan kullanılanlar ve ağızdan kullanılanlar olarak ayrılabilir (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 Sülfonamidlerin sınıflandırılması

1.3 Sülfomerazin

$C_{11}H_{12}N_4O_2S$ (4-amino-N-(4-metil primidin-2-il)benzen sülfonamid) kapalı formülüne sahip olan sülfomerazin, hızlı olarak emilen ve atılan, metil primidin türevi olan bir ilaçtır (Şekil 1.9). Beyaz veya beyazımsı krem renkte, kokusuz, tadı acı olan, suda az çözünen fakat seyreltik asitler, alkali hidroksitler ve karbonatlarının sulu çözeltilerinde iyi çözünen bir tozdur (Kaya ve diğer., 2007).



Şekil 1. 9 Sülfomerazinin yapısı

Sülfomerazinin patojen mikroorganizmalar üzerindeki etki mekanizmaları tam olarak tespit edilmiş olup bakterilerin üreme veya gelişmesini engellediği kanıtlanmıştır. Üremesi duran bakteriler vücudun savunma sistemleri tarafından yok edilir. Sülfomerazin, bakterilerin özellikle gelişme dönemlerinde daha etkindir (Kayaalp, 2002; Kaya ve diğer., 2007).

Birçok mikroorganizmada nükleik asitlerin sentezinde rol oynayan bazı enzimlerin faaliyeti folik aside bağlıdır. Bakteriler, folik asidi memeliler gibi dışarıdan almayıp kendileri sentezler ve folik asidin sentezlenebilmesi için de para-amino benzoik aside (PABA) ihtiyaç duyarlar. PABA'nın kimyasal yapısı sülfonamidler ile büyük benzerlik gösterdiğinden ortamda yeteri kadar sülfomerazin varsa PABA'nın yerini alır ve de bunun sonucunda folik asit sentezlenemez. Böylece hücrenin üremesi durur ve sülfomerazin bakteriyostatik etki göstermiş olur. Vücudun savunma mekanizmasının etkili olabilmesi için sülfomerazinle yapılan tedavinin yeteri kadar uzun süre devam etmesi gerekir (Arda, 1997; Droy, Goodrich, Lech ve

Kleinow, 1990; Kılıçturgay, 1996; Kleinow, Beilfuss, Jarboe, Droy ve Lech, 1992; Samuelsen ve Ervik, 1997).

1.3.1 Antibiyotiklerin Metabolizması ve Endokrin Sistem Üzerine Etkileri

Antibiyotikler, vücuda uygulandıkları andan itibaren çeşitli enzimlerin etkisine maruz kalır ve birtakım kimyasal değişikliklere uğrar. Bu olaya ilaç metabolizması (biyotransformasyon) denir. Antibiyotiklerin insan ve hayvanlar tarafından kullanılmaları sonucunda yaklaşık olarak %30 civarında metabolize edilebildiği görülmüştür (Gao, Munir ve Xagoraraki, 2012; Kümmerer ve Henninger, 2003). Biyotrasformasyon sonucu antibiyotiklerin uğradığı değişiklikle oluşan daha etkili ya da daha etkisiz bileşiklere o ilacın metaboliti denir. Antibiyotiklerin çoğu vücutta birden fazla kimyasal reaksiyona maruz kalır ve bunun sonucunda birkaç çeşit metabolit oluşur (Kayaalp, 2009).

Antibiyotikleri metabolize eden enzimlerin vücutta bulunduğu organa göre miktarları değişir. Karaciğer, gerek çeşit ve gerekse miktar bakımından en fazla enzim içeren organdır. Karaciğerde bulunan ve biyotransformasyon açısından en önemli enzimler, mikrozomal enzimlerdir. Ayrıca karaciğerin yanında, akciğerler, mide-barsak kanalı mukozası ve böbreklerde de antibiyotiklerin biyotransformasyonu gerçekleşir (Kayaalp, 2009).

Memelilerde sülfonamidlerin esas metabolik yolu, hidroksimetabolitin glukuronidasyonunu takip eden hidroksilasyon ve asetilasyon tepkimeleridir. Bu iki tepkimenin gidiş yolu birbirinden bağımsızdır. Gidilen yol prensip olarak sülfonamidin moleküler yapısına ve mevcut olan enzime bağlıdır. Bunun dışında ilacın dozu, yaş, cinsiyet ve sağlık durumu da gidiş yolunu etkileyen faktörlerdir. Her sülfonamid bileşiği değişik derecelerde de olsa, asetilasyon tepkimesine uğrar. N4'deki asetillenme olayı canlı türüne göre de değişir. Kedi ve köpeklerde tepkimeyi gerçekleştiren N-asetil transferazın etkinliği zayıf olduğundan, bu tepkimenin önemi azdır. Bunun haricinde N4-asetilli metabolitlerin etkinliği yoktur ve sudaki çözünürlükleri de zayıftır. Bu nedenle böbrek tübüllerinde çökerek hasara yol

açabilir. Sülfonamidler ve metabolitleri, genellikle glukuronik asit ve sülfürik asitle birleştirildikten sonra böbrekler yoluyla vücuttan atılır (Nizamlıoğlu, 1992).

Endokrin sistemin karakteristiği, kimyasal mediyatörün spesifik bir hücreden sistemik dolaşıma salınmasıdır. Sistemik dolaşıma salındıktan sonra hormon ya da kimyasal mediyatör farklı metabolik yollara girebilir. Kandaki hormonların biyolojik yarı-ömrü, birkaç dakikadan birkaç güne kadar değişebilir. Hormonal biyolojik yarı-ömür, hormonların biyotransformasyon ve atılım hızları gibi bazı faktörlerden etkilenir. Biyolojik yarı ömürlerini etkileyen bir diğer faktör, kandaki daha büyük moleküllerle bağlanmaları ya da kompleks oluşturmalarıdır. Hormonların kompleks oluşturdukları taşıyıcı proteinleri, onların sentezlendikleri bölgeden taşınımını veya hedef organa salınımını sağlar.

Çeşitli fizyolojik ve patolojik faktörler, hormonların transportunu değiştirebilir. Antibiyotikler gibi farmakolojik ajanlar, özellikle troid hormon transportunda değişikliklere neden olarak troid fonksiyonunu bozabilir. Örneğin, protein–bağlı iyot ve T_3 alımı gibi bazı troid fonksiyon testleri, çeşitli farmakolojik ajanlar (ilaçlar) ve steroid hormonlardan etkilenir. Kolestiramin gibi ilaçlar T_4 absorpsiyonunu bozar. Sülfonamidler ve aminosalisilik asit gibi ilaçlar plazma bağlı iyot düzeyini düşürür ve troid bezinin anyonik pompasıyla iyot (^{131}I) alımını azaltarak guatr ve miksödem koması gibi patolojik durumlara neden olabilir. Ayrıca bazı antibiyotiklerin steroidojenezin hız sınırlayıcı adımında rol oynayan enzimlerin aktivitesi üzerine etkili regülatör proteinlerin steroidojenezini bloke ettiği de bilinmektedir.

1.4 Veteriner İlaç Olarak Kullanılan Antibiyotikler

Başta antibiyotikler olmak üzere veteriner ilaçları, ülkemiz ve dünyada hayvansal gıda üretiminin en gerekli ve etkili unsurlarındandır. Halen gıda üretiminde kullanılan hayvanların yaklaşık % 80'ine, yaşamlarının belli bir kısmında veya birçok kez ilaçla tedavi uygulanmaktadır (Pavlov, Lashev, Vachin ve Rusev, 2008). Antibiyotikler ve diğer veteriner ilaçları, ilk olarak 1950'lerde hastalıkları önlemek ve kontrol altına almak, çevresel değişimlerin, aşılamanın ve diğer uygulamaların yol

açtığı stres etkilerini ortadan kaldırmak ve büyümeyi arttırmak için hayvanların yemlerine ve içme sularına katılarak yem katkısı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Blasco, Picó ve Torres, 2007; Choi ve Ryu, 1987; Dafwang, Cook ve Sande, 1987; Di Corcia ve Nazzari, 2002; Kabir , Umoh, Audu-Okoh, Umoh ve Kwaga, 2004; Kaya ve diğer., 2007; Şanlı ve Kaya 2007; Filazi ve Gündinç, 2009). Antibiyotiklerin yaklaşık %90'ı çiftlik hayvanlarında kullanılır; kümes hayvanlarında ise subterapötik derişimlerde verilir. Kullanım amacı çoğunlukla hastalıktan korumadır, bir kısmı da büyümeyi destekler (Sawant, Sordillo ve Jayaro, 2005). Veteriner hekimlikte en sık kullanılan antibiyotikler; beta-laktam grubu antibiyotikler (sefalosporinler ve penisilinler), tetrasiklinler, sülfonamidler, makrolidler, kloramfenikol, spektinomisin, linkozamid, nitrofuran, nitroimidazol, polimiksin, trimethoprim, kinolonlardır (Cháfer-Pericás, Maquieira ve Puchades, 2010). Antibiyotikler, hayvanlarda özellikle böbrek ve karaciğer gibi yenilebilen iç organlar ile diğer organ ve kaslarda birikim yapmakta (Takatsuki, Ushizawa ve Shoji, 1987; Cordle, 1988), süt, yumurta ve bal gibi hayvansal ürünlere de geçebilmektedir (Bertini, Fierrero ve Berny, 2003; Cordle, 1988; Parks, 1988; Sunay, 2006). Bu kalıntılar, hayvanlara yüksek dozda ilaç verilmesi, aynı zamanda yem ve suyla ilaç kullanılması ve geri çekme sürelerine uyulmaması sonucu oluşmaktadır. Yanlış ilaç (yöntem, süre, ruhsat durumu vb.) uygulanan hayvanların uygulamanın bitiminden sonra belli bir süre bekletilmeden kasaplık hayvan olarak kesilmesi ya da bu kontrolsüz uygulamalara maruz kalan hayvanlardan elde edilen süt, yumurta ve bal gibi besinlerin tüketilmesi ile halk sağlığı olumsuz etkilenmektedir (Demir, 2004; Pavlov ve diğer., 2008; Tajick ve Shohreh, 2006).

Sülfonamidler, ucuz olmaları nedeniyle özellikle veterinerlikte bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan önemli bir antibiyotik sınıfıdır ve insan tüketimine sunulan yenilebilen ürünlerdeki kalıntıları tüketicilerde ciddi sağlık sorunlarının yaşanmasına neden olur. Antibakteriyel kalıntı düzeyinin bir yıl içinde %0,20'den %0,30'a yükseldiği belirlenmiştir. Bu kalıntıların özellikle et (sığır, domuz, koyun, tavsan, tavuk), süt ve bal için temel problem olduğu belirtilmektedir (Azofra, Sarabia ve Ortiz, 2010).

1.5 Kalıntı Kaynakları ve Kalıntıların İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi

Hayvanlarda hastalıkların tedavisi, önlenmesi ve kontrolü ile büyüme, gelişmenin hızlandırılması amacıyla doğrudan enjeksiyon yoluyla veya oral yolla çeşitli ilaçlar uygulanır. Uygulanan bu ilaç ve diğer kimyasal maddelerin bir kısmı hayvanın doku ve organlarında birikir. Biriken veya depolanan değişmemiş metabolitler, parçalanma ürünleri, serbest ya da bağlı haldeki ilaç veya kimyasal madde miktarı kalıntı olarak adlandırılır (Kaya ve Ünsal, 2007). Doku ve organlardaki tolerans düzeyinin üzerindeki tüm kalıntılar toksikolojik önem taşırlar ve tehlikeli kabul edilirler (Kaya, Pirinçci ve Bilgili, 2002).

Antibiyotiklerin yarı-ömürleri farklıdır ve bazıları oldukça kalıcıdır (Daughton ve Ternes, 1999); bundan dolayı kontaminasyon düzeyleri de giderek artmaktadır. Bu nedenle, antibiyotikler gibi farmasotik kimyasallar inatçı biyoakumulatif bileşikler olarak sınıflandırılmaktadır (Chen ve Zhou, 2014), Son yıllarda ise antibiyotikler toksik ve tehlikeli kimyasallar olarak kabul edilmektedir (Hartmann, Alder, Koller ve Widmer, 1998; Lee, Lee ve Ryu, 2001; Wollenberger Halling-Sørensen ve Kusk, 2000). Antibiyotiklerin tamamen metabolize olamaması ve vücuttan tamamen atılamamasına bağlı olarak hayvanların doku ve organları ile hayvanlardan elde edilen gıdalarda antibiyotik kalıntısı bulunabilmektedir (Kaya ve Şahal, 1989; Mussman, 1975). İlaç kalıntıları insanlarda doku ve organlarda hasara ve anafilaktik şoktan ölüme kadar değişen şiddette etkilere yol açarken en sık meydana gelen reaksiyonlar ise alerjik reaksiyonlardır. (Gustafson ve Bowen, 1997). Antibiyotik kalıntılarının insanlar üzerinde yaptığı olumsuz etkilere penisilinlerin kızarıklık, ürtiker ve ileri düzeyde anaflaktik şok oluşturması, kloramfenikolün geri dönüşümsüz kan anomalilerine yol açması, sülfametazinin tiroid hiperplazisi şekillendirmesi ve dirençli suşların oluşumuna yol açmaları gibi etkileri örnek verilebilir (Erol, 2007). Bunun yanı sıra, çevredeki toprak ve su kaynaklarına ulaşan bir kısım antibakteriyel ilaç da algler, toprak omurgasızları, balıklar ve bitkiler üzerinde değişik toksik etkiler oluşturabilmektedir (Chander, Kumar, Goyal ve Gupta, 2005; Thiele-Bruhn ve Beck, 2005).

1.6 Maksimum Kalıntı Limitleri (MRL)

İnsan ve hayvan yiyeceği olarak kullanılan ürünler üzerinde bulunmasına izin verilen kalıntı miktarına *maksimum kalıntı limiti* (MRL) denir. Bu terim, gıdalarla birlikte alınabilecek ilaç kalıntıları ve onların metabolitlerinin sağlık açısından herhangi bir riske neden olup olmadığının izlenmesi için kullanılmaktadır (Yıbar ve Soyutemiz, 2013). Eğer bir veteriner ilaç için belirlenmiş bir MRL yok ise bu durumda bu ilacın kalıntısının söz konusu gıda maddesinde hiç bulunmaması gerekir (Sunay, 2006). Avrupa Birliği'nce (AB) sığır etlerinde bulunmasına izin verilen maksimum sülfonamid kalıntı limiti Türkiye, Kanada, ABD ve Çin'de 100 µg/kg ve Japonya'da 20 µg/kg'dır (Oruç, Cengiz, Bağdaş ve Uzunoğlu, 2007).

Her bir antibiyotik sınıfı için farklı MRL gereksinimleri vardır, bu da onların tayinini daha karmaşık hale getirir. Bu nedenle gıdalarda antibiyotiklerin doğru ve hızlı bir şekilde kalitatif ve kantitatif tayinine acil gereksinim vardır.

1.7 Kalıntı Tayinin Önemi

Besinlerdeki veteriner ilaç kalıntılarından kaynaklanabilecek zararlı etkilere karşı insan sağlığının korunabilmesi için en önce yapılması gereken, bilimsel bir kalıntı izleme ve değerlendirme modelinin geliştirilerek etkili bir biçimde uygulanmasıdır. Böylece hem halk sağlığı korunur hem de besin endüstrisi ve tüketiciler için hayati öneme sahip bilgilere ulaşılır. Ayrıca böyle bir izleme ve kontrol programına sahip olan ülkelerin ihraç ettikleri besinlerin güvenli olduklarına inanılır ve bu da o ülkeye uluslararası ticaret yönünden önemli kazançlar sağlar. Besin değeri olan hayvanlarda mutlaka ulusal otoritelerce tescil edilmiş, ruhsatlı, kullanım ve depolama şekilleri belirlenmiş veteriner ilaçları ve yetiştiricilik ürünleri kullanılmalıdır. Veteriner ilaçlarının hayvanlarda bilinçli ve kontrollü kullanımı sağlanarak, hayvansal kaynaklı besin maddelerinin ilaç kalıntılarıyla kirlenme tehlikesi en aza indirilebilir. Bu nedenle bilimsel ve yasal denetime esas oluşturacak şekilde, kalıntıların ve zararının azaltılması için alınması gereken önlemler tam olarak uygulanmalıdır (Baydan, 1989). Hayvanlara uygulanacak en yüksek ilaç dozları, tedavi süreleri, son ilaç

uygulamasını takiben kesilmeme süresi veya bu hayvansal besinlerin tüketilmeme süreleri bilinmelidir. Ayrıca hayvansal besinlerde bulunmasına izin verilen kalıntı miktarları, kabul edilebilir günlük alım miktarları, çoğu deney sistemlerindeki etkisiz miktarlarının belirlenmesi ve bilinmesi gerekmektedir (Kaya ve diğer., 2002).

1.8 Antibiyotik Kalıntılarının Analizinde Kullanılan Yöntemler

Hayvansal ürünlerde bulunan antibiyotik kalıntılarının, insan sağlığı üzerindeki istenmeyen etkilerinden dolayı, hayvansal dokularda analizlerinin yapılması giderek önem kazanmaktadır (Temamoğulları ve Kaya, 2010). Hayvansal besinlerin antibiyotik kalıntılarından arındırılabilmesi için uygulanması gereken ‘’yasal bekletme süresi’’, ilaçla tedavinin durdurulması ve besinlerde bulunmasına izin verilen kalıntı miktarı sınırlarının belirlenmesi amacıyla yapılan analizler, gıda güvenliği ve toplum sağlığı yönünden yapılan çalışmalara önemli katkı sağlamaktadır (Booth ve Harding, 1986). Kalıntı analizlerinde kullanılan çeşitli metotlar aşağıda verilmiştir.

1. Mikrobiyal İnhibisyon Analizleri

Güvenilir, az maliyetli ve basit olmaları gibi avantajları bulunan mikrobiyal inhibisyon analizleri, numunedeki duyarlı bir organizma (örneğin; bakteri) ve antibiyotik arasında özel bir reaksiyona bağlı olarak gerçekleşen kalitatif veya yarı kalitatif metotlardır. İmmünolojik ve enstrümental analizlere kıyasla mikrobiyolojik testler, antibakteriyel aktiviteye sahip her bir antibiyotik veya metaboliti belirleme özelliğine sahiptir (Picó ve Barceló, 2008). Bu testlerin en büyük dezavantajı ise, spesifik olmayışı ve bazı zamanlarda uzun inkübasyon zamanları gerektirmesidir.

2. İmmünolojik Yöntemler

Kimyasal metotlara göre çok daha ucuz, çalışma aşamaları kolay, otomasyon ve organik maddelerin daha az kullanılması gibi avantajları bulunan immünolojik yöntemler, gıdalardaki kontaminantlar hakkında geniş bilgi verebilen yarı kalitatif

metotlardır ve antikor ve antijen arasındaki özel bir reaksiyona bağlı olarak gerçekleştirilir (Meng ve Xi, 2011). Genelde enzim bağlı immünosorbent yöntemi (ELİSA) veya enzim-immünolojik test (EIA) olarak tanımlanan bu testler, fiziksel ve kimyasal testlerle karşılaştırıldığı zaman nispeten daha kolay, daha hızlı ve daha çok örnekle çalışılan testlerdir (Schneider ve diğer., 1994). Hedef moleküle özel geliştirilmiş antikorların kullanılmasından dolayı yüksek spesifiteye sahip ve son derece hassas bir metod olan ELISA analiz sonuçlarının güvenilirliği yüksektir, ayrıca kolay numune hazırlama yöntemleri içermesinden dolayı bu metodla kısa zamanda çok sayıda numunenin farklı ilaç kalıntıları için analizi mümkündür; ancak maliyeti yüksek analizlerdir (Wang, MacNeil ve Kay, 2011).

3. Biyosensörler

Bir biyosensör, biyolojik algılayıcı (biyoajan) elementin seçiciliği ve hedef analitin konsantrasyonuyla orantılı olarak sinyal üreten dönüştürücünün kombinasyonundan oluşan bir cihazdır. Herhangi bir mikroorganizma, organizma, enzim ya da diğer biyolojik yapılar indikatör veya örnek olarak kullanılabilir. Biyoajanın analit ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyal, proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak ve oksijen gibi gazların salınmasından, ışık emisyonu, absorbsiyon, ısı emisyonu, kütle değişimi ve bunun gibi değişimlerden kaynaklanır (Wang ve diğer., 2011). Biyosensörler, et ve süt ürünlerinde ilaç kalıntıları, hormonlar, antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi ve gıdaya bulaşan çeşitli mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılabilmektedir. Yüksek seçicilik ve hızlı cevap süresi kromotografik yöntemlerle karşılaştırıldığında biyosensörlerin iki avantajlı yönü olarak ifade edilebilir (Wang ve diğer., 2011).

4. Kromotografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirine karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi, kantitatif tayinlere kolay uyarlanabilir olması, sıcaklıkla kolayca bozunabilen ve uçucu

olmayan türlerin ayrılmasına uygun olması, gibi avantajları nedeniyle antibiyotik kalıntı analiz teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılan kromatografik yöntemlerden biridir. Sanayinin, birçok bilim dalının ve toplumun ilgili olduğu nükleik asitler, karbohidratlar, proteinler, aminoasitler, pestisitler ve antibiyotikler gibi bileşiklere karşı olan uyarlanabilirliği ise en önemli özelliklerinden birisidir. HPLC'nin diğer tekniklere göre avantajları, hızlı analiz sağlaması ve yüksek ayrım gücüne sahip olması, örnek madde gereksiniminin az olması, otomasyona uygun olması, sürekli akış dedektörleri sayesinde küçük miktar maddelerin tayinine olanak sağlaması ve yüksek iç basınç ve kontrollü akış hızının sağlanabilmesi olarak sıralanabilir. Bunun yanı sıra çok duyarlı ve seçici olması nedeniyle sıklıkla kullanılan HPLC analizleri, aynı zamanda oldukça zahmetli, yorucu ve pahalı analizlerdir (Wang ve diğer., 2006).

1.8.1 Kalıntı Analizi Öncesi Numune Hazırlama

Kimyasal analizi yapılacak plazma, serum, idrar gibi biyolojik; su, toprak, hava gibi çevresel örnekler ile gıda ve farmasotik ürünler gibi diğer numuneler, genellikle aranan madde dışında birçok bileşenin yer aldığı karmaşık bir matriks içerir. Bu nedenle örnek hazırlama; özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC), gaz kromatografi (GC) gibi cihazlar yardımıyla yapılan analizler öncesinde uygulanması gereken çok önemli bir basamaktır. Analiz öncesi yapılması gereken örnek hazırlama, çoğu zaman zor, pahalı ve uzun süren bir işlemdir. Yıllardan beri en sık kullanılan örnek hazırlama yöntemi olan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi, fazla miktarda çözücü harcanması, ekstraksiyon sırasında emülsiyon faz oluşması, gerekli saflığa sahip olmayan ekstraktlar elde edilmesi, çözücülerin yeterince uzaklaştırılamaması ve duyarlı kantitatif sonuçlar elde edilememesi gibi istenmeyen durumlara da neden olabilmektedir (Rosenfeld, 1999). Bu konuda, özellikle kromatografik sistemlerle çalışan 152 araştırıcı ve uygulayıcı ile yapılan bir anket çalışmasında, örnek hazırlama yönteminin seçiminde numunenin özelliği başlıca etken olmakla birlikte, kolay uygulanabilir ve ucuz olmasının da önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Aynı anket çalışmasında araştırmacıların 39 farklı örnek hazırlama yöntemini (diyaliz, ultrafiltrasyon, liyofilizasyon..vb.) kullandıkları tespit edilmiştir.

Ancak kromatografik analizler öncesinde genellikle tek bir örnek hazırlama tekniği yeterli olmamakta, bu yöntemlerden birden fazlasının kullanılması gerekmektedir. Klasik olarak analizden önce, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, bunu takiben uçurma ve uygun çözücünün eklenerek tekrar seyreltilmesi işlemleri bir arada uygulanmaktadır (Majors, 2001). Örnek hazırlama işleminin basitleştirilmesi, zaman kaybının önlenmesi ve analiz maliyetinin azaltılması amacıyla, 1970'li yılların ortalarında klasik metotlara alternatif olarak yeni bir teknik olan katı faz ekstraksiyon metodu (KFE) kullanılmaya başlanmıştır (Pichon, 2000; Poole, Gunatilleka ve Sethuraman, 2000). Günümüzde en etkili örnek hazırlama yöntemlerinden olan KFE, özellikle ilaç ve diğer farmasotik maddelerin analizinde en fazla kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir (Hennion, 1999; Stevenson, 2000; Liljegren, Pettersson, Markides ve Nyholm, 2002).

KFE yöntemi, sıvı-sıvı ekstraksiyonundaki gibi birbirine karışmayan iki sıvı faz yerine, analitin bir sıvı (örnek ortamı) ve bir katı (adsorban) faz arasındaki dağılmasını içermektedir. Bu teknik, analitlerin çözeltiden adsorpsiyon ile bir katı adsorban üzerinde zenginleştirilmesine ve saflaştırılmasına olanak sağlar. Temelde bu yöntem, sıvı örneğin kartuş, reçine ya da bir disk gibi analitleri tutan bir kolondan geçirilmesi ve daha sonra tutunan analitlerin uygun bir çözücü ile geri kazanılmasını içermektedir. Bu yöntemi dört basamakla özetleyebiliriz.

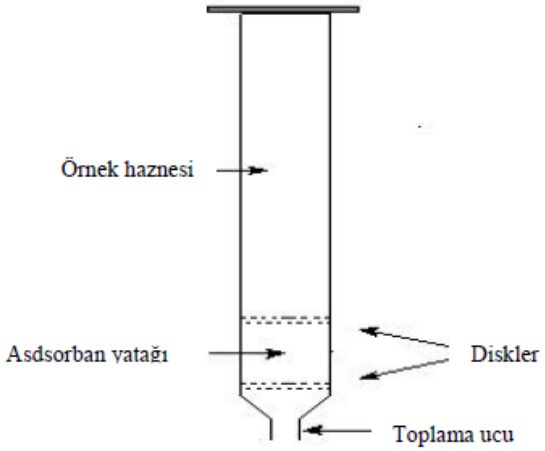
1. Birinci basamak, katı adsorbanın uygun bir çözücü (hekzan, kloroform, metanol gibi) kullanılarak yıkanmasıdır. Bu basamak, dolgu maddesinin ıslanmasını ve katı adsorban üzerinde bulunabilecek kirliliklerin uzaklaştırılmasını sağlar. Daha sonra adsorban fonksiyonel gruplarının etkinleştirilmesi için uygun çözücü ile şartlandırılır. Polar tutucu maddeler apolar çözücülerle apolar tutucu maddeler ise polar çözücülerle şartlandırılmaktadır.

2. İkinci basamak, katı adsorban ile örneğin etkileştirilmesidir.

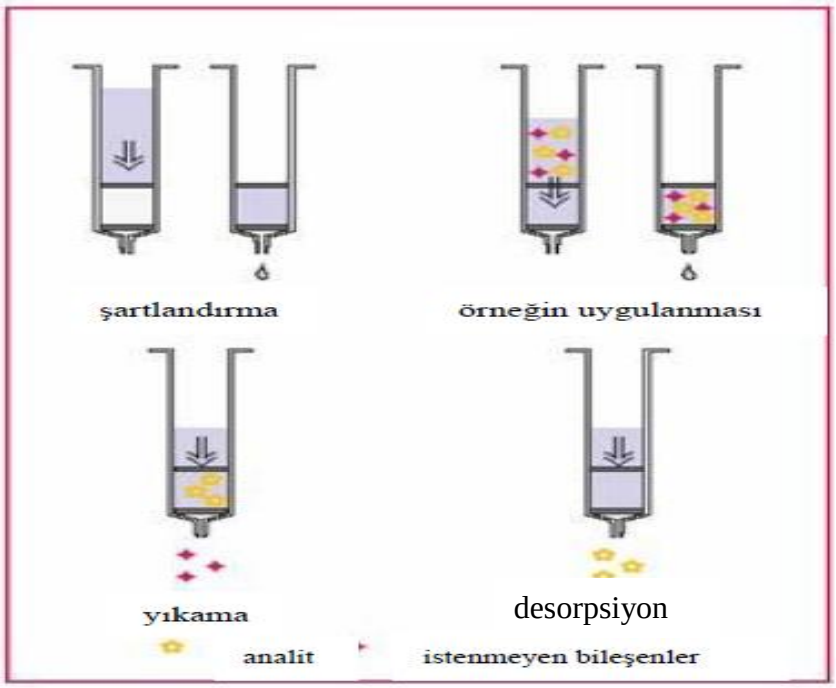
3. Üçüncü basamakta, adsorban ile etkileşime girmeyen matriks bileşenlerini uzaklaştırmak amacıyla uygun bir çözücü ile yıkama yapılır.

4. Dördüncü basamakta ise uygun bir desorpsiyon ajanı ile adsorban yüzeyinde tutunan örneğin ayrılması sağlanır.

Şekil 1.10 ve 1.11'de kolon tipi adsorpsiyon çalışması örnek olarak verilmiştir.



Şekil 1.10 Adsorpsiyon kolonunun yapısı (Yavuz ve Aksoy, 2006)



Şekil 1.11 Kolon tipi adsorpsiyon yöntemi ile maddelerin ayrılma şekilleri

KFE metodunun diğer örnek hazırlama yöntemlerine, özellikle sıvı-sıvı ekstraksiyonuna kıyasla daha fazla tercih edilmesinin nedenleri ve önemli avantajlı yönleri şu şekilde özetlenebilir:

- KFE metodu klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine göre 2-3 kat daha hızlı sonuç verir ve böylece örnek hazırlama süresinin oldukça kısalmasını sağlar.

- KFE, çok pratik ve tüm laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir bir metottur (Majors, 2002; Yavuz ve Aksoy, 2006).

- Daha az çözücü ve ayıraç madde kullanılmasından dolayı daha ekonomik bir örnek hazırlama yöntemidir.

- Geri kazanım oranı yüksektir ve istenilen yoğunlukta örnekler elde edilebilir. En az düzeyde örnek transferi yapıldığından yüksek desorpsiyon ile yüksek yoğunluk ve saflıkta örnekler elde edilebilmektedir (Majors, 2002; Yavuz ve Aksoy, 2006).

- Örnek, adsorban ve çözücüler arasında çapraz bulaşma riski düşük olduğundan yüksek doğrulukta sonuçlar alınabilir (Yavuz ve Aksoy, 2006).

- 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 (LeBlanc, 2001).

- Çok sayıda örneğin aynı anda ve tekrarlanabilir şekilde işlenebilmesine olanak sağlayacak şekilde çok kolay otomasyon sağlanabilir (LeBlanc, 2001).

Adsorpsiyon metodunun geliştirilmesinde katı sorbent seçimi büyük önem taşımaktadır. Sorbentlerde bulunması gereken başlıca özellikler şu şekilde özetlenebilir:

- Örnek matriksine karşı duyarlı
- Tekrar kullanılabilir
- Kolay elde edilebilir
- Geniş yüzey alanı
- Yüksek kapasite
- Hızlı ve kantitatif adsorpsiyon ve desorpsiyon

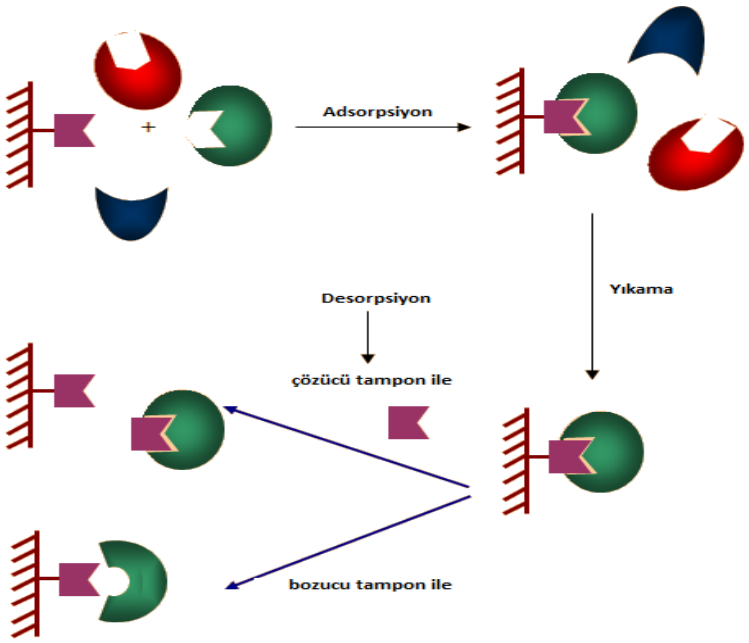
Katı faz olarak kullanılan maddeler organik ve inorganik olmak üzere ikiye ayrılır. Silika (SiO_2), alümina (Al_2O_3), magnezya (MgO), magnezyum silikat ($MgSiO_3$) inorganik adsorbanlara örnek olarak verilebilir. Organik adsorbanlar polimerik ve polimerik olmayan olarak ikiye ayrılır. Polimerik olmayan adsorbanlara karbon ve naftalin örnek olarak verilebilir. Doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılan polimerik adsorbanlara kitosan, agaroz, polimetilmetakrilat, divinilbenzen, vinil piridin örnek olarak verilebilir. Polimerik adsorbanlar daha çok tercih edilir. (Kinsella ve diğer., 2009).

1.9 Afinite Sorbentleri

Afinite kromatografisi, destek materyali üzerine tutuklanmış ve yüksek tanıma kapasitesine sahip bir ligand molekülü ile biyolojik molekül arasında ortaya çıkan ve kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanır (Ginsburg ve McCarty, 2001).

Ligand olarak isimlendirilen moleküler tanıma kapasitesine sahip bir molekül, uygun çözünmeyen genellikle polimerik bir küre ya da membran yapıda olan bir destek materyali üzerine immobilize edilir (Zhang ve Yew, 2009) . Ligand, hedef moleküle spesifik ve tersinir olarak bağlanmalı ve destek materyaline bağlanmaya izin verecek fonksiyonel gruplar (örneğin, $-NH_2$, - COOH, -CHO, -SH ve –OH gibi) içermelidir. İzole edilmek istenen molekül, matriks üzerine immobilize edilmiş ligand tarafından kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanan adsorpsiyon işlemi ile ayrıştırılır. Daha sonra, pH, iyonik şiddet veya sıcaklık ayarlanarak, uygun eluentlerin kullanıldığı desorpsiyon koşulları altında ligand ile hedef molekül

arasındaki kovalent olmayan etkileşimin bozulması sonucu hedef molekül saf olarak elde edilir (Turkova, 1993)(Şekil 1.12).



Şekil 1.12 Afinite sistemin şematik gösterimi

Boyalar (Yılmaz, Bayramoğlu ve Arıca, 2005), metal şelatlar (Porath, Carlsson, Olsson ve Belfrage, 1975) ve aminoasitler (Guo, Shang, Yu ve Zhou, 1997) afinite kromatografi yönteminde pseudobiyospesifik ligand olarak kullanılmaktadır. Pseudobiyospesifik ligandlar, güçlü kimyasal şartlara ve yüksek sıcaklıklara karşı kararlıdır. Bu ligandlar, düşük maliyete ve bağlanma sabitlerine (10^{-4}-10^{-6} M^{-1}) sahip olmalarına rağmen elektrostatik, hidrojen bağı ve Van der Walls etkileşimlerinin toplam etkisi sonucu olarak yüksek seçicilik gösterirler (Finger, Thommes, Kinzeld ve Kula, 1995; Pitiot, Legallais, Darnige ve Vijayalakshmi, 2000).

Bu teknikte, en önemli parametre kullanılacak destek materyalinin seçimidir. Bu nedenle destek materyali, kullanıldığı ortamda çözünmez yapıda, yüksek yüzey alanına sahip uygun ve sağlam bir partikül formunda, mekanik ve kimyasal olarak kararlı, ligandın bağlanabilmesi için hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplara sahip, mikrobiyal ve enzimatik bozulmaya karşı dayanıklı ve hidrofilik karakter sergileyebilmelidir. Ayrıca, kromatografik yürütme esnasında yapısında

hiçbir büzülme veya şişme olmamalıdır (Wu, Suen, Chen ve Tzeng, 2003). Bir kromatografik destek materyali tasarlandığı zaman, farklı gereksinimler düşünülmelidir. Kromatografik ayrım, ayırma ortamının kimyasal yapısı ile kontrol edilir, bununla birlikte gözeneklilik, sertlik gibi diğer özellikler de iyi bir kromatografik ayrımın sağlanması için büyük öneme sahiptir (Paredes, González, Rendueles, Villa-García ve Díaz, 2003).

Sentetik polimerik destek materyalleri yüksek kimyasal ve mekaniksel kararlılığa sahip olmaları ve hazırlanmaları esnasında kontrol edilebilen yapısal özellikler sergilemeleri nedeniyle kromatografik çalışmaların ilgi odağı olmuştur (Křácálíkova, Tishchenko ve Bleha, 2006). Sentetik polimerler arasında yer alan metakrilat temelli destek materyalleri hem asidik hem de bazik koşullar altında kararlıdır ve bir dizi basit reaksiyon ile kolaylıkla fonksiyonlandırılarak yüksek kapasitede amin ve karboksil grupları taşıyan sabit fazlar hazırlanmasına olanak sunarlar (Paredes ve diğer., 2003). Bu materyaller, mikrobiyal degredasyona karşı dayanıklı uzun ömürlü polimerlerdir. Afinite kromatografisinde kullanılan destek materyalleri küre, çubuk veya membran yapıda hazırlanabilir. Kromatografik yöntemlerle proteinlerin saflaştırılması için küre geometrisine sahip adsorbentler sıklıkla kullanılmaktadır (Arıca, Akyol ve Bayramoğlu, 2008; Bayramoğlu, Ekici, Besirli ve Arıca, 2007). Bunun yanı sıra, kolay geri kazanım, kararlılık ve güçlü fiziksel ve kimyasal özellikler, düşük maliyet, üstün biyolojik uyumluluk ve aktif fonksiyonel grup çeşitliliği afinite sorbentlerine biyoteknolojik uygulamalarda avantajlar sunar (Frenzel, Bergenmann, Kohl ve Reinard, 2003). Organik kökenli doğal ya da sentetik polimerik materyaller hedef uygulamalara göre hazırlanabilmeleri, fonksiyonel grup çeşitliliği ve gözenekli ya da gözeneksiz olarak hazırlanabilmeleri nedeniyle destek materyali olarak kullanımları tercih edilmektedir (Bayramoğlu ve Arıca, 2008; Guo, Bai ve Sun, 2003).

1.10 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, hayvansal gıdalardaki sülfomerazin kalıntısının uzaklaştırılmasına ve tayinine yönelik afinite sorbentinin hazirlanmasi ve uygulanmasi amaçlanmıştır. Bu amaçla sırasıyla şu yollar izlenmiştir:

1. Antibiyotik uzaklaştırma ve tayini amacıyla kullanılmak üzere p(EGDMA-MATrp) afinite sorbenti sentezlenmiştir. Sentezlenen materyal, fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve şişme deneyleri ile karakterize edilmiştir.

2. Sülfomerazin sentezlenen afinite sorbenti ile zenginleştirilerek HPLC'de kantitatif analizi gerçekleştirilmiştir

3. P(EGDMA-MATrp) afinite sorbenti üzerine sülfomerazinin adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu amacıyla süre, derişim, sıcaklık, sorbent miktarı, pH ve iyon şiddeti gibi parametrelerin adsorpsiyona etkisi incelenmiştir.

4. Adsorplanan sülfomerazinin geri kazanımına yönelik desorpsiyon işlemi için uygun desorpsiyon ajanı belirlenmiş ve sorbentin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

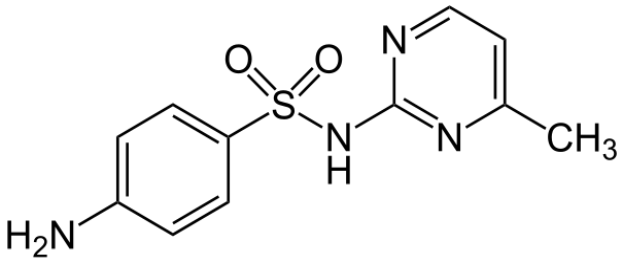
5. Hazırlanan p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri, süt ve yumurta gibi hayvansal gıda örneklerindeki sülfomerazinin adsorpsiyonuna uygulanmıştır.

6. Belli konsantrasyonlardaki sülfomerazin, gıda örneklerine ilave edilmiş, ardından adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri gerçekleşirilip yöntemin doğruluğu kontrol edilmiştir.

BÖLÜM İKİ
MATERYAL VE METOT

2.1 Reaktifler

Etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) Merck'ten (Darmstadt, Germany) temin edilmistir. Metanol (MeOH) ve asetonitril (ACN), HPLC saflıkta olup Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan sulfamerazin (SMR) %97-99,7 saflıkta olup Fluka (Buchs, Switzerland) firmasından temin edilmiştir. Çalışılan antibiyotiğin formülü Şekil 2.1'de, pKa değerleri Tablo 2.1'de verilmiştir. Potasyum persulfat (KPS) Sigma-Aldrich'ten (Buchs,Switzerland); polivinil alkol (PVAL; Mw:100.000, 98% hidrolize) Aldrich'ten (Aldrich Chem. Co.(USA) temin edilmiştir. N-metakriloil-L-triptofan metilester (MATrp) monomeri, Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi Doc. Dr. Bilgen Osman'dan temin edilmistir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Denemelerde kullanılan su, Millipore ultra saf su cihazı [Millipore Corporation (France) Elix 5® reverse osmos ünitesi, elektrodeiyonizasyon (E.D.I) modülü (Elix ® 5 Water Purification System), organik/kolloid uzaklaştırıcı iyon değişim sistemi] ile üretilmiştir.



Şekil 2.1 Sülfomerazinin (SMR) açık yapısı

Tablo 2.1 Sülfomerazinin pKa değerleri

Antibiyotik	pKa
SMR	2,01; 6,99

2.2 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 2.2'de verilmiştir.

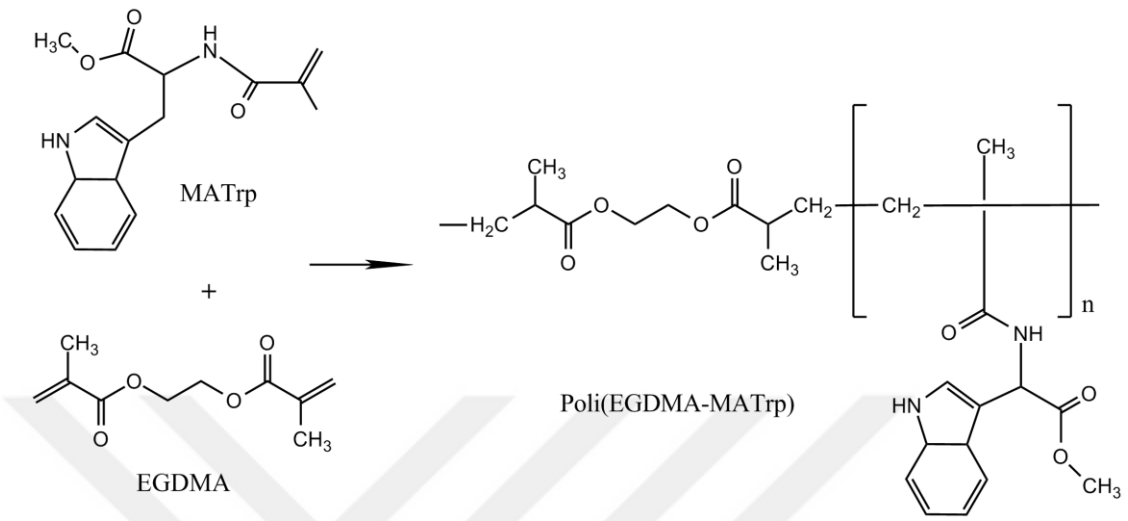
Tablo 2.2 Deneyde kullanılan cihazlar

Malzeme / Cihaz	**Marka**
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazı	Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 LC sistem (diode array dedektör, oto-örnekleyici, kolon fırını)
pH-metre	Selecta pH 2001
Santrifüj Cihazı	Hettich- ZENTRIFUGEN
Vorteks	Heidolph
Saf su cihazı	Milli-Q plus system, Millipore Bedford, MA, USA

2.3 P(EGDMA-MATrp) Mikroküreleri Sentezlenmesi

P(EGDMA-MATrp) mikroküreleri, Osman ve grubunun çalışmasına göre aşağıda belirtildiği gibi süspansiyon polimerizasyonuyla hazırlanmıştır (Osman ve diger., 2013). Etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) ve N-metakriloil-L-triptofan metilesterin (MATrp), süspansiyon içinde sırasıyla AIBN ve polivinil alkolün başlatıcı ve

sabitleyici olarak kullanılmasıyla polimerleştirilmiştir. Poli(EDGMA MATrp) mikrokurelerin reaksiyon şeması aşağıda verilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Poli(EDGMA MATrp) sentezine ait reaksiyon şeması

0,01 mmol polivinil alkol 50 ml saf su içinde çözülerek sabit faz hazırlanmıştır. Dağılım fazının hazırlanması için de 26,5 mmol EGDMA, 10 mL toluen ile oda sıcaklığında 15 dakika karıştırılmıştır. Toluen polimerizasyon reaksiyonuna seyreltici ve gözenek biçimlendirici olarak eklenmiştir. Sonra, komonomer (MATrp; 4 ml) ve yaklaşık 0,40 mmol AIBN ilave edilmiş ve karışımın kapalı bir silindirik polimerizasyon reaktöründe manyetik olarak (400 rpm) karıştırılmasıyla organik faz sulu ortamda dağıtılmıştır. Reaktörde bulunan içerik 65 °C'de 4 saat sureyle ısıtılmış ve polimerizasyon, 85°C'de 8 saat boyunca 600 rpm hızla karıştırmak suretiyle tamamlanmıştır. Elde edilen mikroküreler, tepkimeye katılmayan monomer ve çözücüleri uzaklaştırmak için su ve etanol ile yıkanmış ve daha sonra etüvde 50°C'de kurutulmuştur.

2.3.1 p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Karakterizasyonu

MATrp monomeri ve p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin FTIR analizleri, ATR örnekleme probuna sahip FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer spectrum 100 FT-IR spectrometer) ile gerçekleştirilmiştir.

P(EGDMA-MATrp) mikroküreleri su alım oranı şişme testleriyle saptanmıştır. Deney aşağıda belirtildiği gibi uygulanmıştır. İlk olarak, kuru mikroküreler vial içinde 50 mL saf suya yerleştirilmeden önce dikkatlice tartılmıştır. Vial, 2 saatlik süreyle sabitlenmiş sıcaklıktaki (25 ± 0,5°C) izotermal su banyosuna konmuştur. Mikroküre örneği sudan alınmış, filtre kağıdıyla kurulanmış ve tartılmıştır. Kuru ve ıslak mikroküre örneklerinin ağırlık oranları kaydedilmiştir.

Mikrokürelerin yüzey morfolojisi ve iç yapısı taramalı elektron mikroskobuyla (SEM) (JEOL, JEM 1200EX, Tokyo, Japonya) gözlemlenmiştir.

2.4 Sülfomerazinin Adsorpsiyonunun Optimizasyonu

Sülfomerazinin en yüksek kapasitede adsorpsiyonunu sağlamak amacı ile süre, derişim, sıcaklık, sorbent miktarı, pH etkisi ve iyon şiddeti gibi parametrelerin optimizasyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir.

2.4.1 SMR Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi

SMR adsorpsiyonu üzerine sürenin etkisini belirlemek amacıyla 10 ml 50 ppm sülfomerazin çözeltisi ve 0,1 g p(EGDMA-MATrp) mikrokureleri içeren 6 adet deney tüpü sırasıyla 30-45-60-90-120-180 dk süreyle 25ºC sıcaklıkta 225 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve süre sonunda örnekler 5 dk 5000 rpm hızla santrifüjlenerek SMR derişimleri belirlenmiştir. Adsorplanan SMR miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q = \frac{C_{başlangıç} - C_{son}}{m} xV$$

Bu eşitlikte, Q, gram sorbent başına adsorplanan SMR miktarını (mg/g); $C_{başlangıç}$, başlangıç SMR derişimini (mg/L); C_{son}, adsorpsiyon sonrası belirlene SMR

derişimini (mg/L); m, kuru sorbent ağırlığını (g); V ise adsorpsiyon hacmini (L) ifade eder.

2.4.2 SMR Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi

Sorbent miktarının adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere sentezlenen p(EGDMA-MATrp) afinite sorbentinin; 0,05; 0,1 ve 0,2 g miktarları üzerine 10 mL 50 ppm sülfomerazin çözeltileri eklenerek 90 dk süre ile 25ºC sıcaklıkta 225 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 5 dk 5000 rpm hızla santrifüjlenerek SMR miktarları belirlenmiştir.

2.4.3 SMR Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisi

Derişimin adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere 0,5-300 ppm derişim aralığındaki sülfomerazin çözeltileri hazırlanmış ve her birine 0,1 g p(EGDMA-MATrp) mikrokureleri eklenmiştir. Her bir tüp 90 dk süre ile 25ºC sıcaklıkta 225 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 5 dk 5000 rpm hızla santrifüjlenerek SMR miktarları belirlenmiştir.

2.4.4 SMR **Adsorpsiyonuna** *Sıcaklık Etkisi*

Sıcaklığın adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere 10 ml 50 ppm sülfomerazin çözeltisi ve 0,1 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri içeren 5 deney tüpü ayrı ayrı sırasıyla 5-45ºC sıcaklık aralığında 90 dk 225 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 5 dk 5000 rpm hızla santrifüjlenerek SMR miktarları belirlenmiştir.

2.4.5 SMR **Adsorpsiyonuna** *pH'ın Etkisi*

pH'ın adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere sülfomerazinin pKa değeri dikkate alınarak, 50 ppm sülfomerazin çözeltileri oluşturulacak şekilde 10 mL'lik pH'ı 3,0; 5,0; 7,0; 8,0 ve 9,0 olan test çözeltileri ile çalışılmıştır. Her birine

0,1 g p(EGDMA-MATrp) mikrokureleri eklenerek 90 dk süre ile 25ºC sıcaklıkta 225 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 5 dk 5000 rpm hızla santrifüjlenerek SMR miktarları belirlenmiştir. Kullanılan tamponlar aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

- ✓ 0,1 M Sitrat Tamponu (pH 3,0): 0,3129 g sodyum sitrat ve 0,30176 g sitrik asit saf suda çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlanmıştır.

- ✓ 0,1 M Asetat Tamponu (pH 5,0): 15 mL 0,1 M asetik asit ve 10 mL 0,1 M sodyum hidroksit karıştırılmıştır.

- ✓ 0,1 M Fosfat Tamponu (pH 7,0; 8,0): 0,1681 g potasyum bifosfat ve 0,2089 g potasyum fosfat saf suda çözülmüş ve hacmi 25 mL'ye tamamlanmıştır.

- ✓ 0,1 M Borat Tamponu (pH 9,0): 0,1545 g borik asit saf suda çözülmüş 0,1 M NaOH ile pH 9'a ayarlanmış ve hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.

2.4.5 SMR Adsorpsiyonuna *İyon Şiddetinin Etkisi*

İyon şiddetinin adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere 50 ppm sülfomerazin çözeltisi oluşturacak şekilde 10 mL'lik 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 ve 1,0 M NaCl çözeltileri hazırlanmıştır. Her birine 0,1 g p(EGDMA-MATrp) mikrokureleri eklenerek 90 dk süre ile 25ºC sıcaklıkta 225 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 5 dk 5000 rpm hızla santrifüjlenerek SMR miktarları belirlenmiştir.

2.5 Desorpsiyon

P(EGDMA-MATrp) afinite sorbenti üzerinde adsorplanmış olarak bulunan sülfomerazinin etkin desorpsiyonunu sağlamak amacıyla, farklı desorpsiyon ajanlarıyla çalışılmıştır (Tablo 2.3). Belirlenen desorpsiyon ajanı ile farklı sürelerde desorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. 3 Çalışılan desorpsiyon ajanları

DESORPSİYON AJANLARI
ACN : MeOH : Su (3:3:4)
ACN : MeOH (5:5)

Belirlenen desorpsiyon ajanıyla 60 ve 120 dk olmak üzere farklı süreler çalışılmış, sülfomerazinin yüksek kapasitede desorbe edilmesini sağlayan optimum süre belirlenmiştir.

2.6 Sülfomerazinin HPLC ile Analizi

Sülfomerazinin HPLC ile analizinde, Zou ve çalışma grubunun yönteminden yararlanılmıştır (Zou ve diğer., 2007). Kromatografik koşullar aşağıdaki gibidir:

- Cihaz: Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 LC sistem (diode array dedektör, oto-örnekleyici, kolon fırını)
- Kolon: Thermo ODS Hypersyl Gold C_{18} (250 mm x 4 mm x 5 µm)
- Kolon sıcaklığı: 30ºC
- Akış hızı: 1 mL/dk
- DAD dedektör dalga boyu: 272 nm
- Enjeksiyon miktarı: 20 µL
- Analiz süresi: 5 dakika
- Çalışma şekli: İzokritik
- Mobil faz: 0,05 M Formik asit-ACN-MeOH (65:25:10)

2.7 Hayvansal Gıda Örneklerindeki Sülfomerazinin Adsorpsiyonu

Çeşitli markalarda yumurta ve süt örnekleri, İzmir'deki farklı marketlerden temin edilmiş ve örnek hazırlama öncesi tüm çalışılacak örnekler +4ºC'de ve karanlıkta muhafaza edilmiştir.

2.7.1 Yumurta Örneklerinin Hazırlanması

Sülfomerazin standardı eklenmiş (1 µg/mL standart SMR) ya da eklenmemiş, homojenize edilmiş 2 g yumurta örneği alınarak karışım 24 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra 10 mL ACN: Su (6:4) karışımı eklenerek 3 dakika daha karıştırılmaya devam edilmiştir. Sonrasında 10000 rpm hızla 10 ºC'de 10 dakika boyunca santrifüjlenip süpernatant faz alınmıştır (3 mL). Alınan süpernatantın pH'sı 0,1 M HCl ile 5,0'a ayarlanmış ve sonuç hacmi 10 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır (Peters, Bolck, Rutgers, Stolker ve Nielen, 2009).

2.7.2 Süt Örneklerinin Hazırlanması

Sülfomerazin standardı eklenmiş (1 pg/mL standart SMR) ya da eklenmemiş, homojenize edilmiş 1 g süt örneği alınarak karışım 30 saniye vortekslenmiş ve ardından 30 dakika boyunca buzdolabında +4 ºC'de bekletilmiştir. Sonrasında 0,5 mL %20'lik TCA (MeOH'de hazırlanan) eklenerek 30 saniye vortekslenmiş ve ardından da 10000 rpm hızla 10 ºC'de 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant faz alınarak pH'sı 0,1 M NaOH ile 5,0'a ayarlanmış ardından 10000 rpm hızla 10ºC'de 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant faz alınarak sonuç hacmi 10 mL' ye saf su ile tamamlanmıştır (Junza, Amatya, Barrón ve Barbosa, 2011).

Hazırlanan 10 mL'lik örnek çözeltilerinin her birine 0,1 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri eklenerek 90 dk süre ile 25ºC sıcaklıkta 225 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 5 dk 5000 rpm hızla santrifüjlenmiştir. Süpernatant faz alınarak HPLC'ye uygulanmıştır.

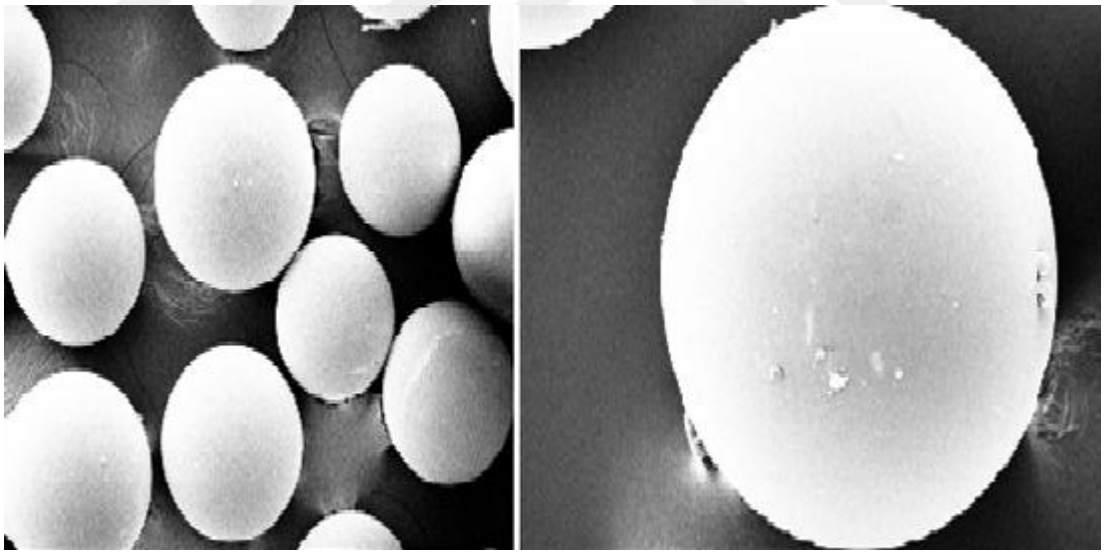
BÖLÜM ÜÇ
BULGULAR VE TARTIŞMALAR

3.1 p(EGDMA-MATrp) Mikroküreleri Karakterizasyonu

Hazırlanan p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri karakterizasyonu FTIR, SEM ve şişme analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 p(EGDMA-MATrp) Mikroküreleri SEM Analizleri

Küresel şekilli p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri, süspansiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Mikrokurelerin SEM görüntüsü Şekil 3.1'de gösterilmiştir. SEM görüntülerinden görüldüğü üzere p(EGDMA-MATrp) milroküreleri mükemmele yakın küresel iskelete sahiptir.

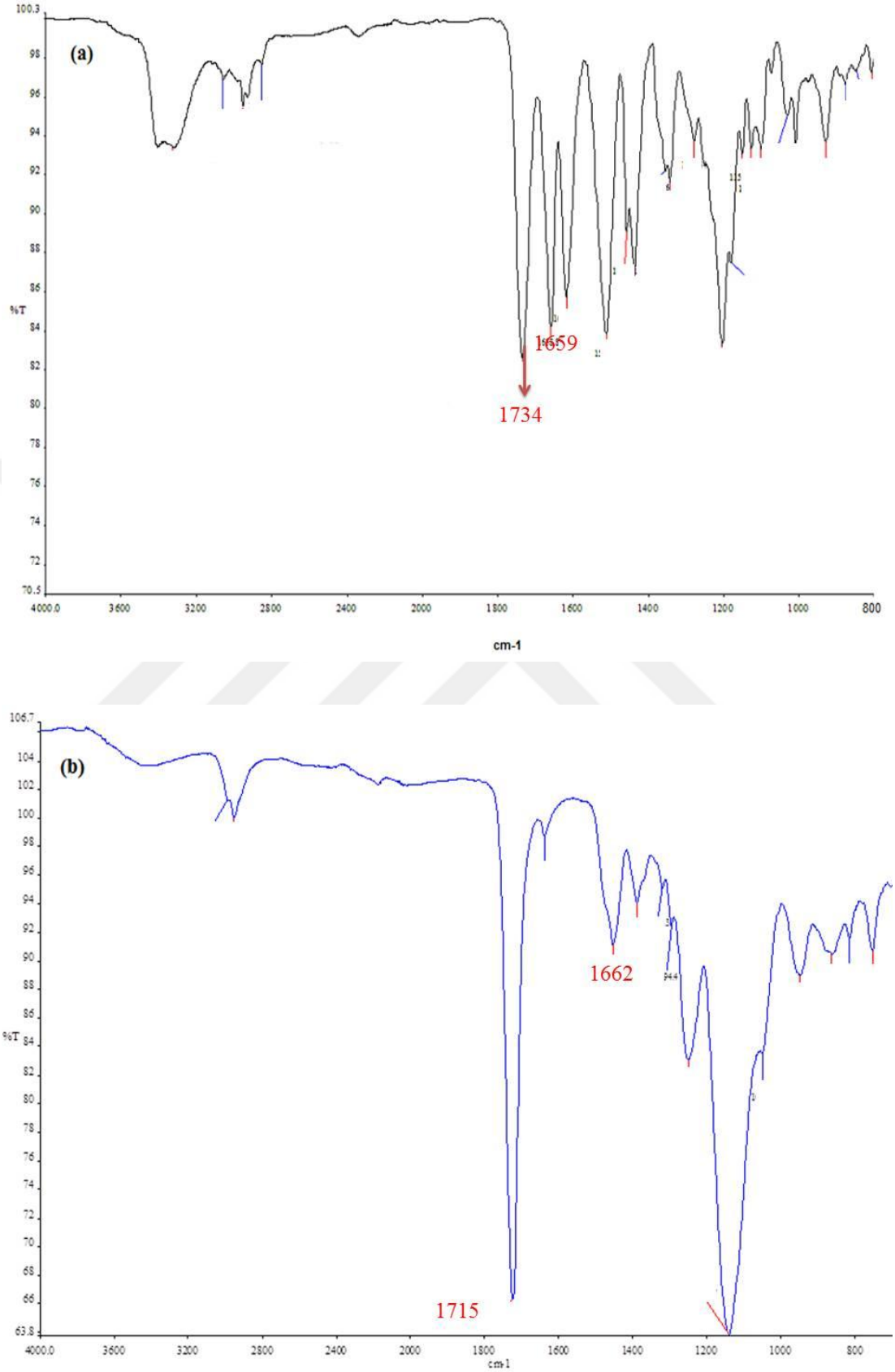


Şekil 3.1 Poli(EGDMA-MATrp) mikroküreleri SEM görüntüleri a) küresel form b) büyütülmüş yapı

p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri denge şişme oranı %269' dur. Yüksek şişme oranı mikroküreleri; sulu ortamda çözünmeyen fakat çapraz bağlanma derecesine bağlı olarak şişen çapraz bağlı hidrojeller olduğunu göstermektedir.

3.1.2 p(EGDMA-MATrp) Mikroküreleri̇n FTIR Analizleri

MATrp monomeri ve p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri̇n FTIR spektrumları, yapılarını nitelemek için değerlendirilmiştir (Şekil 3.2). MATrp monomerinin FTIR spektrumunda 1734 cm^{-1} ve 1659 cm^{-1}'deki gerilme titreşimleri, sırasıyla ester ve amid karbonil gruplarından kaynaklanmıştır. P(EGDMA-MATrp) mikrokurelerin FTIR spektrumu, ester karbonil grubunun 1715 cm^{-1}'de karakteristik gerilme titreşimini göstermektedir. Ek olarak, amid karbonilin gerilme titreşimine ait 1662 cm^{-1} de gözlenen band MATrp monomerinin polimerik yapıya katıldığını göstermektedir.

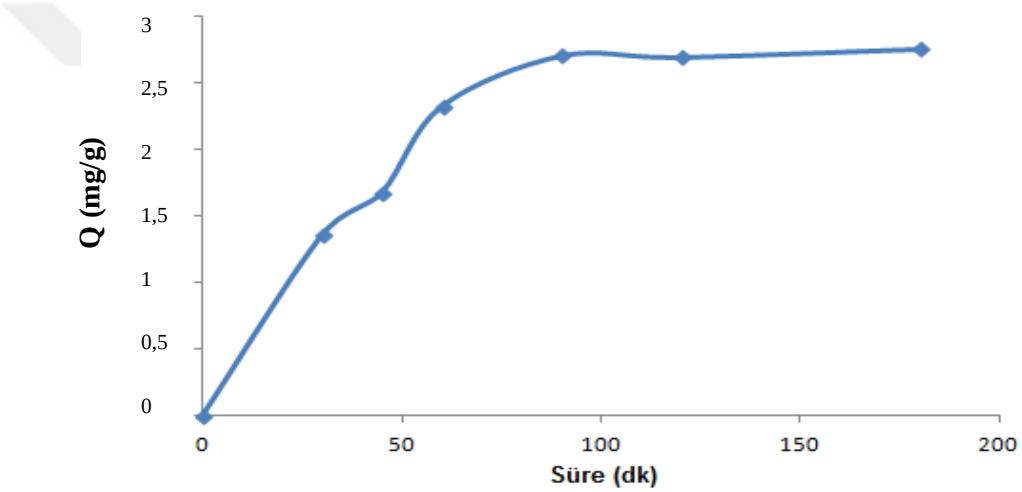


Şekil 3.2 FTIR spektrumları (a) MATrp (b)Poli(EGDMA-MATrp)

3.2 p(EGDMA-MATrp) Afinite Sorbentine Sülfomerazin Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu

3.2.1. *SMR Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi*

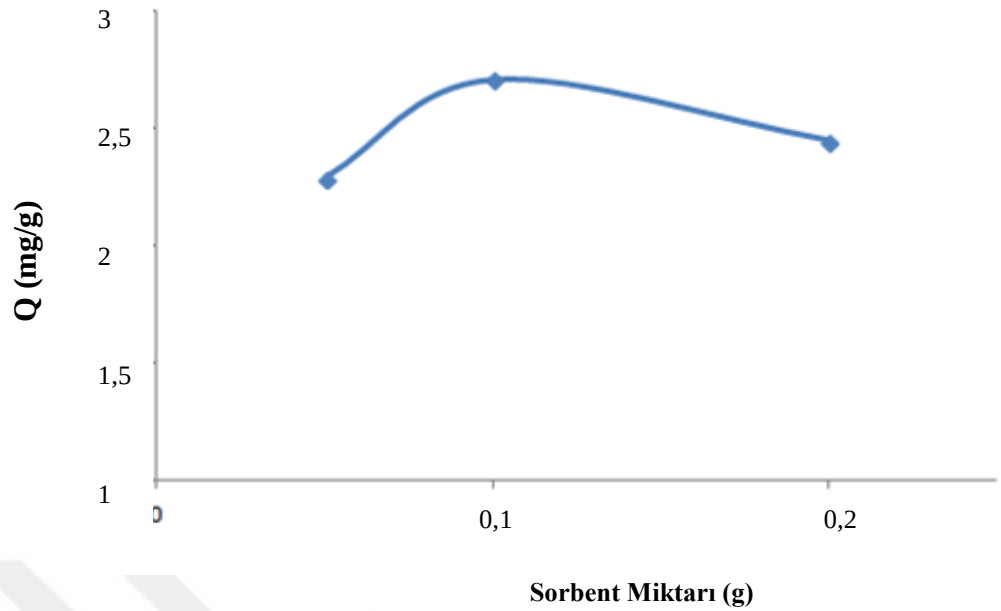
Şekil 3.3'ten görüleceği üzere 90. dakikaya kadar adsorplanan SMR miktarında artış olduğu, 90. dakikadan sonra dengeye ulaştığı gözlenmiştir. 90. dakika itibariyle matriks yüzeyindeki tüm bağlanma bölgelerinin dolması nedeniyle bu süre sonrasında adsorpsiyon kapasitesinde değişim gözlenmemiştir. Bu nedenle, adsorpsiyon çalışmaları için optimum süre 90 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3 SMR adsorpsiyonuna süre etkisi (Deneysel koşullar: 0,1 g sorbent; 25ºC; 50 ppm SMR)

3.2.2 SMR Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi

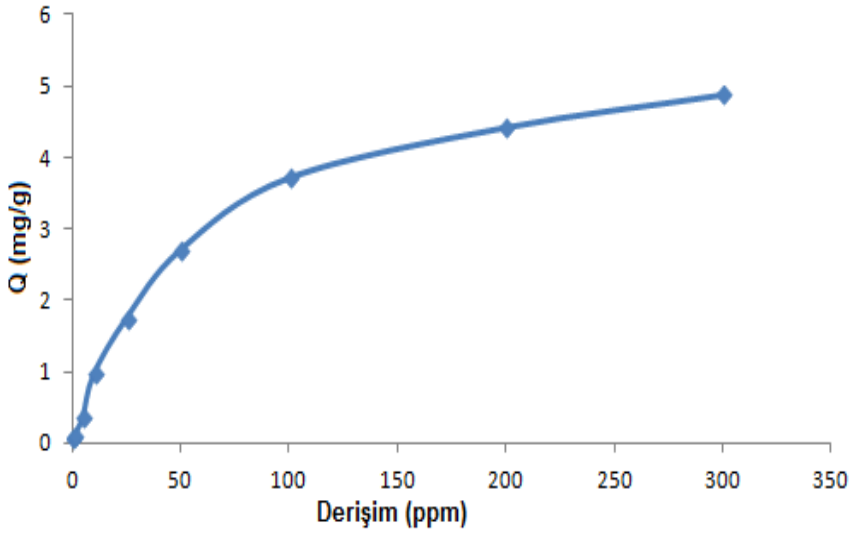
Adsorpsiyon çalışmaları poli(EGDMA-MATrp) afinite sorbentinin 0,05; 0,1 ve 0,2 gram miktarları ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.4'de gösterilmektedir. 0,1 g sorbentle daha yüksek adsorpsiyon kapasitesinin elde edilmesi nedeniyle çalışmalara 0,1 g sorbent ile devam edilmiştir.



Şekil 3.4 SMR Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi (Deneysel koşullar: 90 dk çalkalama; 25ºC; 50 ppm SMR)

3.2.3 SMR Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisi

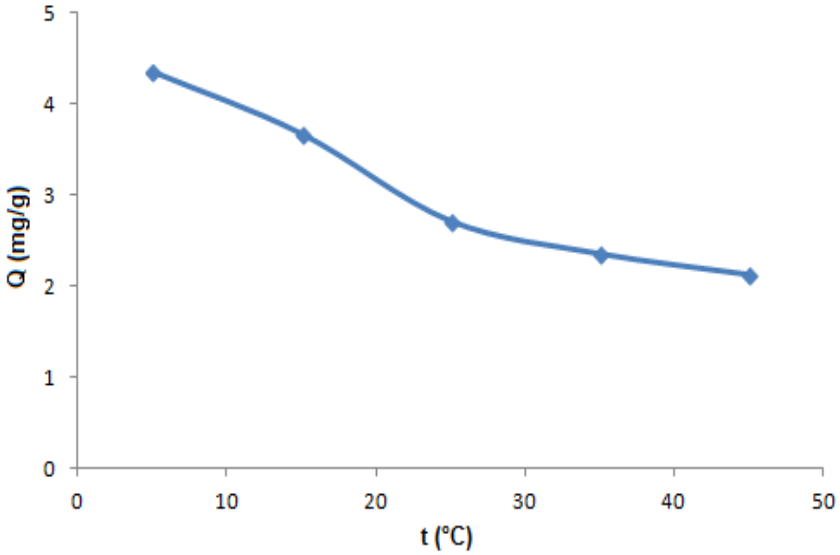
SMR adsorpsiyonu üzerine başlangıç derişiminin etkisini incelemek amacıyla adsorpsiyon çalışmaları, 0,5-300 ppm derişim aralığındaki sülfomerazin çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 3.5'de sunulmuştur. Şekil 3.5'den görüleceği gibi başlangıçta artan SMR derişimi ile adsorpsiyon kapasitesi de artmış, 100 ppm SMR derişiminden sonra doygunluğa ulaşılmıştır. P(EGDMA-MATrp) afinite sorbentinin maksimum SMR adsorpsiyon kapasitesi, 3,72 mg/g olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5 SMR Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisi (Deneysel koşullar: 0,1 g sorbent; 25ºC; 90 dk çalkalama)

3.2.4 SMR Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi

SMR adsorpsiyonuna sıcaklık etkisinin incelenmesi amacıyla adsorpsiyon çalışmaları, sırasıyla 5-45ºC sıcaklık aralığında yapılmıştır. Şekil 3.6'ten görüleceği üzere p(EGDMA-MATrp) mikrokurelere SMR adsorpsiyonu sıcaklık 5°C'den 45°C'ye çıkarıldığında % 43,96 oranında azalmıştır. Adsorpsiyon teorisine göre, artan sıcaklıkla adsorpsiyon azalır ve yüzeyde tutunan moleküller desorplanma eğiliminde olur. Bu yüzden, adsorpsiyon kapasitesinde artan sıcaklıkla gözlenen bu düşüşün nedeni, adsorpsiyonun ekzotermik doğası olabilir.

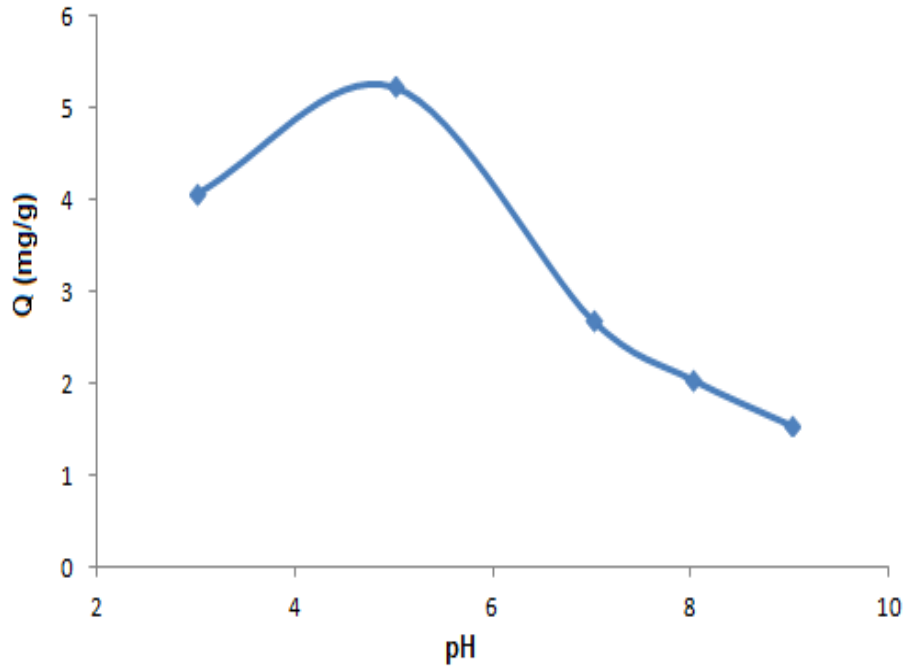


Şekil 3.6 SMR Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi (Deneysel koşullar, 0,1 g sorbent; 90 dk çalkalama; 50 ppm antibiyotik)

3.2.5 SMR Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi

p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere SMR adsorpsiyonu uzerine pH'ın etkisini belirlemek icin adsorpsiyon çalışmaları, pH 3-9 aralığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.7'de sunulmuştur. Şekilden de görüleceği gibi, SMR adsorpsiyonu pH 3,0-5,0 arası artmış, sonra bir düşüş göstermiş; maksimum adsorpsiyon pH 5'te elde edilmiştir. Bilindiği gibi pH, bir sorbentle numune matrikslerinden organik bileşiklerin ekstraksiyonunda ve analitlerin adsorpsiyonundaönemli bir faktördür. SMR'nin iki pK_a değeri vardır (pK_{a1}=2.01 and pK_{a2}= 6.99). SMR pK_{a1}'in altındaki pH değerlerinde katyonik, pK_{a2}'nin üzerindeki pH değerlerinde anyonik, bunların arasındaki pH değerlerinde ise nötral formdadır. Sülfomerazin molekülünün pH 5 civarında net yükünün sıfır olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu pH değerinde SMR molekülü ve p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri arasında gerçekleşen bağlanmada baskın olan etkileşimin hidrofobik etkileşimler olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle net yükün sıfır olduğu bu pH değerinde, mikroküreler ve sülfomerazin molekülü üzerindeki hidrofobik bölgelerde daha fazla etkileşim söz konusudur. Bu hidrofobik etkileşimler, SMR molekülünün apolar yan zinciri ile p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin hidrofobik yüzeyi arasında veya p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin yüzeyine adsorplanmış SMR moleküllerinin

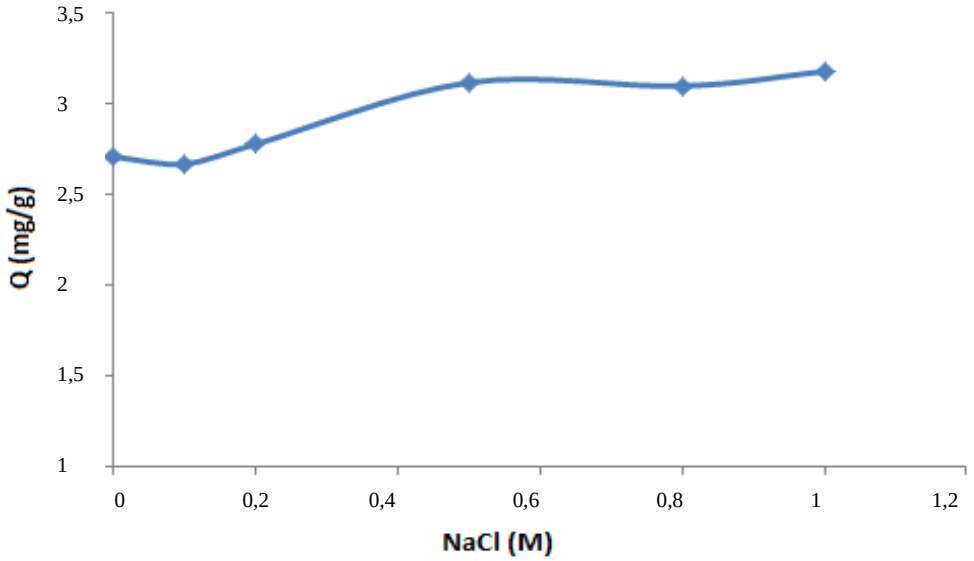
hidrofobik yan zincirleri ile ortamdaki SMR molekülleri arasında gerçekleşmektedir. Daha yüksek ve daha düşük pH değerlerinde değişen yük dengelerinden dolayı elektrostatik itme kuvvetlerinin söz konusu olabileceği ve bu nedenle adsorpsiyon miktarında düşüşe neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.7 SMR Adsorpsiyonuna pH Etkisi (Deneysel koşullar: 0,1 g sorbent; 25ºC; 50 ppm SMR; 90 dk çalkalama)

3.2.6 SMR Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi

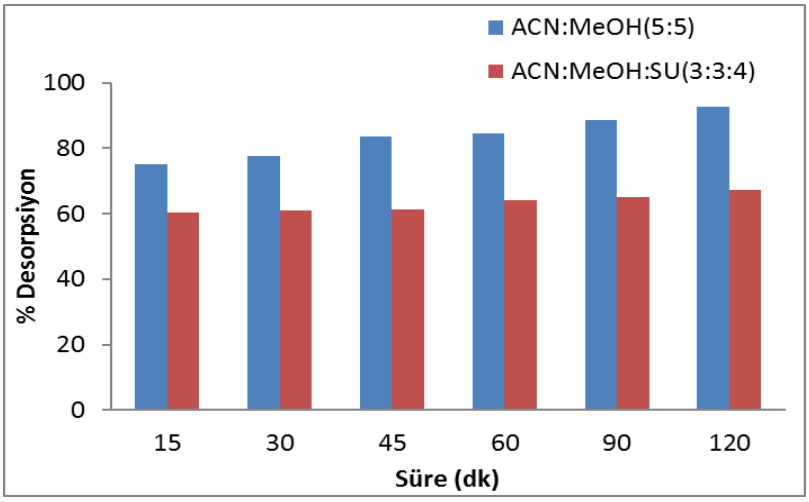
Sülfomerazinin adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisini incelemek amacıyla 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 ve 1,0 M derişimli NaCl çözeltileri ile adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8'de sunulmuştur. Bu sonuçlar sülfomerazin adsorpsiyonunda iyon şiddetinin anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermektedir.



Şekil 3.8 SMR Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi(Deneysel koşullar, 0,1 g sorbent; 25ºC sıcaklık; 50 ppm antibiyotik; 90 dk çalkalama)

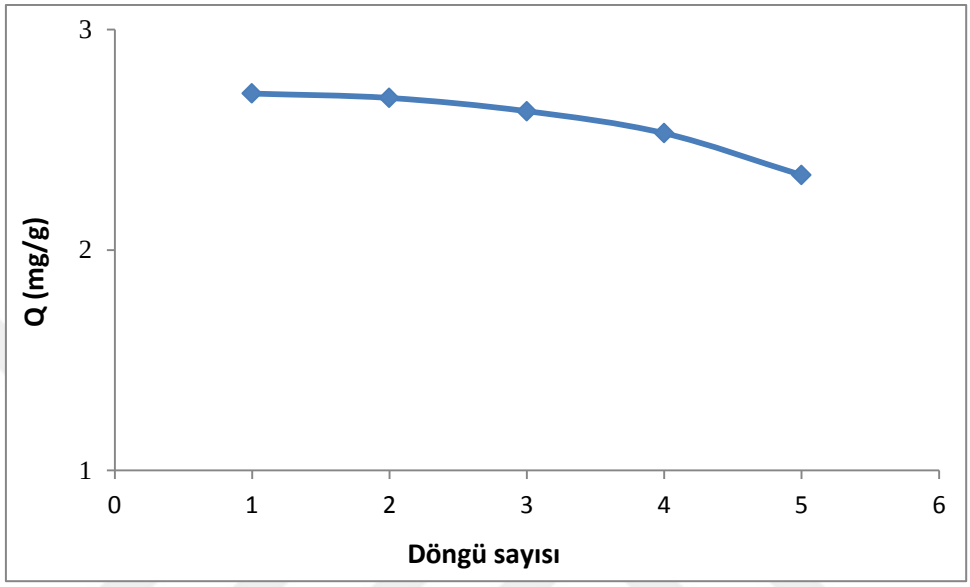
3.3 Desorpsiyon Çalışmaları

p(EGDMA-MATrp) afinite sorbentine tutunmuş sülfomerazinin desorpsiyonu amacıyla farklı desorpsiyon ajanlarıyla çalışılmıştır. En iyi sülfomerazin desorpsiyonu, desorpsiyon ajanı olarak kullanılan ACN:MeOH (5:5) çözeltisi ile 2 saat sonunda %90 olarak elde edilmiş ve değişen zaman aralığındaki desorpsiyon oranları %75-90 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.9'da sunulmuştur.



Şekil 3.9 Sülfomerazinin farklı desorpsiyon ajanlarındaki % desorpsiyon sonuçları.

p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanmıştır. Her bir döngü sonrasında elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10 p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri tekrar kullanılabilirliği

Şekil 3.10'dan görüleceği üzere p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri adsorpsiyon kapasitesi 5 döngü sonunda % 14 oranında azalmıştır. Bu sonuç, poli(EGDMA-MATrp) mikroküreleri sülfomerazin adsorpsiyonunda defalarca etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

3.4 Hayvansal Gıda Örneklerinde Sülfomerazin Tayini

Süt ve yumurta örnekleri İzmir'deki yerel marketlerden satın alınıp adsorpsiyon işlemi için hazırlanmış ve optimize edilen yönteme göre adsorpsiyonu sağlanarak, HPLC cihazında tayini gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.1'de standart eklemesi yapılan (1,00 µg/mL'lik standart sülfomerazin çözeltisi) süt ve yumurta örneklerine ait sonuçlar verilmiştir. Tablo 3.1'den görüleceği üzere çalışılan süt ve yumurta örneklerinden bazılarında SMR'e rastlanmıştır.

Tablo 3.1 Süt ve yumurta örneklerinde sülfomerazinin analiz sonuçları

No	Süt			Yumurta	
	Ekl.(µg/mL)	**Bulunan (µg/mL)**	**Geri Kaz. (%)**	**Bulunan (µg/mL)**	**Geri Kaz. (%)**
1	1,00	1,10±0,8	82,8±4,0	1,01±0,8	87,6±4,0
2	1,00	1,07±0,7	75,2±6,0	0,97±0,3	89,1±6,0
3	1,00	1,04±0,0	77,5±4,0	1,05±0,4	85,2±5,0
4	1,00	1,05±0,6	73,4±2,0	0,98±0,3	79,9±5,0
5	1,00	1,07±0,3	71,3±5,0	1,02±0,4	90,1±8,0

BÖLÜM DÖRT
SONUÇLAR

Bu çalışmada, gıdalarda kalıntı oluşturan sülfonamid grubu antibiyotiklerden sülfomerazinin tayin ve uzaklaştırılmasına yönelik afinite sorbenti sentezlenmiş ve gıda örneklerindeki antibiyotik kalıntılarının uzaklaştırılması ya da tayininde geliştirilen bu sorbentin kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Antibiyotik uzaklaştırma amacıyla sentezlenen afinite sorbenti ile adsorpsiyon yönteminin süre, derişim, sıcaklık, sorbent miktarı, pH, iyon şiddeti gibi parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiş, 0,1 g sorbent ile 90 dk gibi bir sürede SMR adsorpsiyonunun tamamlanabileceği ve maksimum adsorpsiyon kapasitesinin 3,72 mg/g olduğu belirlenmiştir. Adsorplanan SMR ACN: MeOH (5:5) çözeltisi ile %75-90 oranında desorplanmıştır ve poli(EGDMA-MATrp) mikroküreleri sulfamerazin adsorsiyonunda defalarca etkin bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir. Sülfomerazin için optimum adsorpsiyon koşulları sağlanarak geliştirilen yöntemin, hayvansal gıda örneklerindeki (süt ve yumurta) antibiyotik kalıntılarının uzaklaştırılmasına başarıyla (geri kazanım yüzdeleri süt için: >%70; yumurta için: ≥%80) uygulanabileceği belirlenmiştir. Önerilen adsorpsiyon ve HPLC yönteminin gıda örneklerine uygulanabilir, tekrarlanabilir ve güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Literatürde gıda örneklerindeki antibiyotik kalıntılarının kromatografik analizleri öncesinde katı faz ekstraksiyonu amacıyla çoğunlukla daha yüksek miktarlarda (0,2-0,5 g) ve ticari olarak mevcut olan sorbentlerin kullanıldığı görülmektedir (Azofra ve diğer., 2010; Mei-Ratliff; 2012; Opriş, Soran, Coman, Copaciu ve Ristau, 2013). Polietilen glikol bazlı magnetik nanopartiküllerin kullanıldığı bir çalışmada ise işlem süresinin oldukça uzun (12 saat) olduğu belirtilmektedir (Ji, Lv, Xu, Zhao ve Zhang, 2014). Bir başka çalışmada 38–106 μm boyut aralığındaki moleküler baskılanmış polimerlerle 24 saat sureyle gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise 2-4 mikron boyutundaki moleküler baskılanmış polimerlerle 12 saat gibi çok uzun bir sürelerde giderim sağlanmıştır (Fernández-Álvarez, Le Noir ve Guieysse, 2009; Farber, Green

ve Domb, 2009). Bunun yanı sıra, literatürdeki çalışmalarda sülfonamid grubu antibiyotiklerin adsorpsiyonu amacıyla hazırlanan sorbentlerin adsorpsiyon kapasitesinin çok daha düşük olduğu görülmektedir. Örneğin, sülfonamid grubu antibiyotiklerden sülfometazinin adsorpsiyonu amacıyla sentezlenen baskılanmış amino-fonksiyonel grubu içeren silika jel sorbentin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 42,1 µg/g olarak belirlenmiştir (He, Wang, Fang, Zhu ve Zhang, 2008). Sülfonamid grubu antibiyotiklerin adsorpsiyonu amacıyla core–shell magnetik moleküler baskılanmış nanopartiküllerin kullanıldığı bir diğer calışmada maksimum adsorpsiyon kapasitesi 344 µg/g olarak bulunmuştur (Kong, Gao, He, Chen ve Zhang, 2012). Akrilamid bazlı sülfodiazin baskılanmış magnetik polimerin kullanıldığı calışmada maksimum adsorplanan antibiyotik miktarının 0,78 mg/g olduğu belirtilmiştir (Chen ve diger., 2015). Xu ve grubunun sülfonamid grubu antibiyotiklerin adsorpsiyonu amacıyla magnetik ZnO-yüzey baskılanmış polimerlerin kullanıldığı calışmada maksimum adsorpsiyon kapasitesi 2,35 mg/g olarak belirlenmiştir (Xu ve diğer., 2012). Sonuç olarak bu çalışma ile daha az destek materyali kullanılarak, çok daha kısa sürede ve az maliyetle daha fazla ve daha etkin bir şekilde antibiyotik kalıntı analizi ve uzaklaştırılmasına olanak sağlayan yöntem tasarlanmıştır.

KAYNAKLAR

Arda, M. (1997). *Temel mikrobiyoloji.* Ankara: Medisan Yayınevi.

Altıntaş, L. (2006). *Ağızdan kullanılan bazı sülfonamid preparatlarının broilerlerde biyoeşdeğerliliği*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Arıca, M. Y., Akyol, A. B., ve Bayramoğlu, G. (2008). Adsorption of trypsin onto magnetic ion-exchange beads of poly (glycidylmethacrylate-co-ethyleneglycoldimethacrylate). *Journal of Applied Polymer Science*, *107*(5), 2810-2819.

Azofra, R. D., Sarabia, L. A., ve Ortiz, M. C. (2010). Optimization of a solid-phase extraction procedure in the fluorimetric determination of sulfonamides in milk using the second-order advantage of PARAFAC and D-optimal design. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(2), 923-935.

Baydan, E. (1989). *Türkiye'de üretilen bazı antelmentik ilaçların etken madde (Heksaklorofen, Oksiklozanid, Niklozamid, Tetramizol, Tiyabendazol ve Triklorfon) düzeyleri üzerinde araştırmalar*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Bayramoğlu, G., Ekici, G., Beşirli, N., ve Arıca, M. Y. (2007). Preparation of ion-exchange beads based on poly (methacrylic acid) brush grafted chitosan beads: isolation of lysozyme from egg white in batch system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *310*(1), 68-77.

Bayramoğlu, G., ve Arıca, M. Y. (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *Journal of Hazardous Materials*, *156*(1), 148-155.

Bertini, S., Feirrero, S., ve Berny, P. (2003). A new improved high performance thin layer chromatography (HPTLC) method for the detection of ionophore antibiotics in feeds and animal tissues. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, *26*(1), 147-156.

Blasco, C., Picó, Y., ve Torres, C. M. (2007). Progress in analysis of residual antibacterials in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *26*(9), 895-913.

Booth, J. M., ve Harding, F. (1986). Testing for antibiotic residues in milk. *The Veterinary Record*, *119*(23), 565-569.

Booth, N. H., ve McDonald, L. E. (1988). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (6. Baskı). Iowa State University Press.

Carson, M. C., Righter, R. F., ve Wagner, D. D. (1994). In residues of veterinary drugs and mycotoxins in animal products. In G. Enen, H. A. Kuiper, ve A. Valentini (Ed.). *Proceedings of the 1st Electronic Mail Conference* (15). Wageningen The Netherlands, Wageningen Press.

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

Chander, Y., Kumar, K., Goyal, S. M., ve Gupta, S. C. (2005). Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *Journal of Environmental Quality*, *34*(6), 1952-1957.

Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A., ve Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *29*(9), 1038-1049.

Chen, K., ve Zhou, J. L. (2014). Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere*, *95*, 604-612.

Chen, L., Lee, Y.K., Manmana, Y., Tay, K.S., Lee, V.S., Abd Rahman, N. 2015. Synthesis, characterization, and theoretical study of an acrylamide-based magnetic molecularly imprinted polymer for the recognition of sulfonamide drugs. *Polymers*, 15(3), 141–150.

Choi, J. H., ve Ryu, K. S. (1987). Responses of broilers to dietary zinc bacitracin at two different planes of nutrition. *British Poultry Science*, *28*(1), 113-118.

Chung, H. H., Lee, J. B., Chung, Y. H., ve Lee, K. G. (2009). Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*,*113*(1), 297-301.

Cordle, M. K. (1988). USDA regulation of residues in meat and poultry products. *Journal of Animal Science*, *66*(2), 413-433.

Dafwang, I. I., 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*(1), 47-55.

Daughton, C. G., ve Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environmental Health Perspectives*, *107*(6), 907.

Demir, C. (2004). Hayvansal gıdalardaki antibiyotik ve hormon kalıntılarının insan sağlığı üzerine olası etkileri ve yasal düzenlemeler. *Dünya Gıda Dergisi*, *9*, 52.

Desbrow, C. E. J. R., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., ve Waldock, M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science and Technology*, *32*(11), 1549-1558.

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*(1), 53-89.

Droy, B. F., Goodrich, M. S., Lech, J. J., ve Kleinow, K. M. (1990). Bioavailability, disposition and pharmacokinetics of 14C-ormetoprim in rainbow trout (Salmo gairdneri). *Xenobiotica, 20*(2), 147-157.

Džidić, S., Šušković, J., ve Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, *46*(1), 11-21.

Erol, İ. (2007). *Gıda hijyeni ve mikrobiyolojisi*. Ankara: Pozitif Matbaacılık.

Evaggelopoulou, E. N., 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), 1322-1329.

Farber, S., Green, B. ve Domb, A., (2009). Selective 17-b-estradiol molecular imprinting. *Journal of Polymer Science 47, 5534–5542.*

Fernández-Álvarez P., Le Noir M. ve Guieysse B., (2009). Removal and destruction of endocrine disrupting contaminants by adsorption with molecularly ımprinted polymers followed by simultaneous extraction and phototreatment. *Journal of Hazardous Materials, 163, 1107–1112.*

Filazi, A. ve Gündinç, U. (2009). Detection of aflatoxin M1 concentrations in UHT milk consumed in Turkey markets by ELISA. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *12*(8), 653-656.

Finger, U. B., Thömmes, J., Kinzelt, D., ve Kula, M. R. (1995). Application of thiophilic membranes for the purification of monoclonal antibodies from cell culture media. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, *664*(1), 69-78.

Frenzel, A., Bergemann, C., Köhl, G., ve Reinard, T. (2003). Novel purification system for 6xHis-tagged proteins by magnetic affinity separation. *Journal of Chromatography B*, *793*(2), 325-329.

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*, 173-183.

Ginsburg, G. S., ve McCarthy, J. J. (2001). Personalized medicine: revolutionizing drug discovery and patient care. *Trends in Biotechnology*,*19*(12), 491-496.

Guo, W., Shang, Z., Yu, Y., ve Zhou, L. (1997). Removal of endotoxin from aqueous solutions by affinity membrane. *Biomedical Chromatography*, *11*(3), 164-166.

Guo, Z., Bai, S., ve Sun, Y. (2003). Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. *Enzyme and Microbial Technology*, *32*(7), 776-782.

Gustafson, R. H., ve Bowen, R. E. (1997). Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, *83*(5), 531-541.

Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T., ve Widmer, R. M. (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *17*(3), 377-382.

He, J., Wang, S., Fang, G., Zhu, F. ve Zhang, Y. (2008). Molecularly Imprinted Polymer Online Solid-Phase Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography-UV for the Determination of Three Sulfonamides in Pork and Chicken. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2919–2925.

Hennion, M. C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *856*(1), 3-54.

Hişmioğulları, Ş. E. (2004). *Türkiye'de ruhsatlı bazı veteriner antibakteriyel ilaç spesialitelerinin (Aminoglikozidler ve Sülfonamidler) etken madde içerikleri ve bazı saklama şartlarının bu düzeylere etkisi üzerine çalışmalar*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Ji, Y., Lv, R., Xu, Z., Zhao, C., ve Zhang, H. (2014). Preparation and characterization of an amphipathic magnetic nanosphere. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, *2014*. 3 Şubat 2016, http://www.hindawi.com/journals/jamc/2014/976145/.

Joshi, S. (2002). HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *28*(5), 795-809.

Junza, A., Amatya, R., Barrón, D. ve Barbosa, J. (2011). Comparative study of the LC–MS/MS and UPLC–MS/MS for the multi-residue analysis of quinolones, penicillins and cephalosporins in cow milk, and validation according to the regulation 2002/657/EC. *Journal of Chromatography B*, *879*(25), 2601-2610.

Kabir, J., Umoh, V. J., Audu-Okoh, E., Umoh, J. U., ve Kwaga, J. K. P. (2004). Veterinary drug use in poultry farms and determination of antimicrobial drug residues in commercial eggs and slaughtered chicken in Kaduna State, Nigeria. *Food Control*, *15*(2), 99-105.

Kafalı, H. (2008).*Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kolon sonrası türevlendirme ile 7 adet sulfonamid tespitinin metot validasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Denizli.

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

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., ve Guwy, A. J. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*, *43*(2), 363-380.

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 Veterinerlik Fakülte Dergisi 36*(2), 390-403.

Kaya, S., Pirinçci, İ., ve Bilgili, A. (2002). *Veteriner hekimliğinde toksikoloji*. Ankara: Medisan Yayınevi, 212-221.

Kaya, S. ve Ünsal, A. (2007). *Besinlerdeki ilaç kalıntıları, uygulamalı farmakoloji* (3. Baskı). Ankara : Medisan Yayınevi.

Kaya, S., Pirinçci, İ. ve Bilici, A. (Ed.). (2007). *Kemoterapötikler (antibiyotikler), veteriner farmakoloji*, (4. Baskı). Ankara : Medisan Yayınevi, 2, 329-768.

Kayaalp, O. (2002). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji kitabı* (10. Baskı). Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık.

Kayaalp, O., (2009). Antiseptikler ve dezenfektanlar. *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji kitabı*, (12. Baskı). Ankara: Nüve Matbbası, 307-314.

Kılıçturgay, K. (1996). *Temel mikrobiyoloji ve parazitoloji*. Bursa: Onur Yayıncılık.

Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A., ve Danaher, M. (2009). Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A,1216*(46), 7977-8015.

Kleinow, K. M., Beilfuss, W. L., Jarboe, H. H., Droy, B. F., ve Lech, J. J. (1992). Pharmacokinetics, bioavailability, distribution, and metabolism of sulfadimethoxine in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *49*(5), 1070-1077.

Kong, X., Gao, R., He, X., Chen, L. ve Zhang, Y. (2012). Synthesis and characterization of the core–shell magnetic molecularly imprinted polymers (Fe3O4@MIPs) adsorbents for effective extraction and determination of sulfonamides in the poultry feed. *Journal of Chromatography A*, 1245, 8–16.

Kráčalíková, K., Tishchenko, G., ve Bleha, M. (2006). Effect of the matrix structure and concentration of polymer-immobilized Ni 2+–iminodiacetic acid complexes on retention of IgG 1. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *67*(1), 7-25.

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), 1203-1214.

LeBlanc, G. (2001). A review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples. *LCGC North America*, *19*, 1120-1130.

Lee, H. B., Sarafin, K., Peart, T. E., ve Svoboda, M. L. (2003). Acidic pharmaceuticals in sewage-Methodology, stability test, occurrence, and removal from Ontario samples. *Water Quality Research Journal of Canada*,*38*(4), 667-682.

Lee, M. H., Lee, H. J., ve Ryu, P. D. (2001). Public health risks: chemical and antibiotic residues-review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *14*(3), 402-413.

Liljegren, G., Pettersson, J., Markides, K. E., ve Nyholm, L. (2002). Electrochemical solid-phase microextraction of anions and cations using polypyrrole coatings and an integrated three-electrode device. *Analyst*, *127*(5), 591-597.

Majors, R. E. (2002). Trends in sample preparation. *LC GC North America*, *20*(12), 1098-1113.

Majors, R. E. (2001). New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation. *LC GC North Amerıca*, *19*(7), 678-687.

Mei-Ratliff, Y. (2012). Determination of the antibiotic oxytetracycline in commercial milk by solid-phase extraction: a high-performance liquid chromatography (HPLC) experiment for quantitative instrumental analysis. *Journal of Chemical Education*, *89*(5), 656-659.

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

Mussman, H. C. (1975). Drug and chemical residues in domestic animals. In *Federation Proceedings* 34, 2, 197-201.

Nizamlıoğlu, F. (1992). *Sülfonamidtrimetoprim kombinasyonu uygulanan broyler piliçlerin plazma, kırmızı kas ve karaciğer ilaç düzeyleri ve atılma sürelerinin araştırılması*. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.

Opriş, O., Soran, M. L., Coman, V., Copaciu, F., ve Ristoiu, D. (2013). Determination of some frequently used antibiotics in waste waters using solid phase extraction followed by high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection. *Open Chemistry*, *11*(8), 1343-1351.

Oruç, H. H., Cengiz, M., Bağdaş, D., ve Uzunoğlu, İ. (2007). Sığır etlerinde streptomisin ve sulfametazin (sulfadimidin) kalıntıları (streptomycin and sulamethazin (sulphadimidine) residues in cattle meat). *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *26*(1-2).

Osman, B., Tümay Özer, E., Demirbel, E., Güçer, Ş., Beşirli, N. 2013. Synthesis and characterization of L-tryptophan containing microbeads for removal of dimethyl phthalate from aqueous phase. *Separation and Purification Technology* 109:40–47.

Paredes, B., González, S., Rendueles, M., Villa-García, M. A., ve Díaz, M. (2003). Influence of the amination conditions on the textural properties and chromatographic behaviour of amino-functionalized glycidyl methacrylate-based particulate supports. *Acta Materialia*, *51*(20), 6189-6198.

Parks, O. W. (1988). Liquid chromatographic-electrochemical detection screening procedure for six nitro-containing drugs in chicken tissues at low ppb level. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, *72*(4), 567-569.

Pavlov, A., Lashev, L., Vachin, I., ve Rusev, V. (2008). Residues of antimicrobial drugs in chicken meat and offals. *Trakia Journal of Science*, *6*(1), 23-25.

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

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*(46), 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*, *53*(1), 28-52.

Pichon, V. (2000). Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, *885*(1), 195-215.

Picó, Y., ve Barceló, D. (2008). The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *27*(10), 821-835.

Pitiot, O., Legallais, C., Darnige, L., ve Vijayalakshmi, M. A. (2000). A potential set up based on histidine hollow fiber membranes for the extracorporeal removal of human antibodies. *Journal of Membrane Science*, *166*(2), 221-227.

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), 17-39.

Porath, J., Carlsson, J. A. N., Olsson, I., ve Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, *258*, 598-599.

Reiner, R. (1982). Antibiotics: An introduction. *F. Hoffman-la roche ve co., ltd., basle, Switzerland.*

Riviere, J. E., ve Papich, M. G. (Ed.). (2013). *Veterinary pharmacology and therapeutics*. John Wiley and Sons.

Rosenfeld, J. M. (1999). Solid-phase analytical derivatization: enhancement of sensitivity and selectivity of analysis. *Journal of Chromatography A*, *843*(1), 19-27.

Routledge, E. J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M., ve Sumpter, J. P. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*, *32*(11), 1559-1565.

Samuelsen, O. B., ve Ervik, A. (1997). Single dose pharmacokinetic study of flumequine after intravenous, intraperitoneal and oral administration to Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) held in seawater at 9 C. *Aquaculture*, *158*(3), 215-227.

Sawant, A. A., Sordillo, L. M., ve Jayarao, B. M. (2005). A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, *88*(8), 2991-2999.

Schneider, H. C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M., ve Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, *371*(6500), 768-774.

Shapiro, T. A., Goldberg, D. E., Brunton, L. L., Lazo, J. S., ve Parker, K. L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*.

Stevenson, D. (2000). Immuno-affinity solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, *745*(1), 39-48.

Sunay, A. E. (2006). Balda antibiyotik kalıntısı sorunu. *Uludağ Arıcılık Dergisi, 2006*(4).

Sweetman, S. C. (2009). *Martindale: the complete drug reference*. London: Pharmaceutical Press.

Şahindokuyucu, F.(2003). *Sağlıklı ve koksidiyozlu etlik piliçlerde sülfakinoksalinin farmakokinetiği*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Şanlı, Y., ve Kaya, S. (1988). Ankara Piyasasında Satılan Bazı İşlenmiş Et Ürünlerinin Nitrat ve Nitrit İçerikleri Üzerine Araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, *35*(1), 24-46.

Tajick, M. A., ve Shohreh, B. (2006). Detection of antibiotics residue in chicken meat using TLC. *International Journal of Poultry Science*, *5*(7), 611-612.

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

Temamoğulları, F., ve Kaya, S. (2010). Ankara piyasasında satılan sütlerde bazı antibiyotik kalıntılarının ince tabaka kromatografisi ve biyootografik yöntemle saptanması. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, 16*(2), 187-191.

Thiele-Bruhn, S., ve Beck, I. C. (2005). Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere*, *59*(4), 457-465.

Töreci, K. (2003). Antibiyotik kullanımı ve direnç ilişkisi. *Flora*, *8*(2), 89-110.

Turková, J. (1993). *Bioaffinity chromatography*. Amsterdam: Elsevier.

Wang, J., MacNeil, J. D., ve Kay, J. F. (Ed.). (2011). *Chemical analysis of antibiotic residues in food*, 38. New Jersey: John Wiley & Sons.

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*(8), 2873-2880.

Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., ve Kusk, K. O. (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to Daphnia magna. *Chemosphere*,*40*(7), 723-730.

Won, S. Y., Lee, C. H., Chang, H. S., Kim, S. O., Lee, S. H., ve Kim, D. S. (2011). Monitoring of 14 sulfonamide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS. *Food Control*, *22*(7), 1101-1107.

Wu, C. Y., Suen, S. Y., Chen, S. C., ve Tzeng, J. H. (2003). Analysis of protein adsorption on regenerated cellulose-based immobilized copper ion affinity membranes. *Journal of Chromatography A*, *996*(1), 53-70.

Xu, L., Pan, J., Dai, J., Cao, Z., Hang, H., Li, X. ve Yan, Y., (2012). Magnetic ZnO surface-imprinted polymers prepared by ARGET ATRP and the application for antibiotics selective recognition. *RSC Advances*, 2, 5571–5579.

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

Yıbar, A., ve Soyutemiz, E. (2013). Gıda değeri olan hayvanlarda antibiyotik kullanımı ve muhtemel kalıntı riski. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 8*(1).

Yılmaz, M., Bayramoğlu, G., ve Arıca, M. Y. (2005). Separation and purification of lysozyme by Reactive Green 19 immobilised membrane affinity chromatography. *Food Chemistry*, *89*(1), 11-18.

Zhang, Y., ve Yew, W. W. (2009). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [State of the art series. Drug-resistant tuberculosis. Edited by CY. Chiang. Number 1 in the series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, *13*(11), 1320-1330.

Zou, Q. H., Xie, M. X., Wang, X. F., Liu, Y., Wang, J., Song, J., ve Han, J. (2007). Determination of sulphonamides in animal tissues by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization of 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Journal of Separation Science*, *30*(16), 2647-2655.