

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATIK SULARDA VETERİNER İLAÇ KALINTILARININ
HPLC-DAD İLE ANALİZİ

FATMA ÖZER BAHŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

MAYIS 2019

Tezin başlığı: Atık Sularda Veteriner İlaç kalıntılarının HPLC-DAD ile Analizi

Tezi hazırlayan: Fatma Özer BAHŞI

Sınav tarihi:

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Analitik Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Sema Erdemoğlu
İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Gamze ERDOĞDU
İnönü Üniversitesi

Dr. Öğretim Üyesi Tuncay KAN
Turgut Özal Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim Adıgüzel
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ‘‘Atık sularda veteriner ilaç atıklarının HPLC-DAD ile analizi’’ başlıklı bu çalışmanın, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın, tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde, hem de kaynakçada yönetimine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Fatma Özer BAHŞI



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ATIK SULARDA VETERİNER İLAÇ KALINTILARININ HPLC-DAD İLE ANALİZİ

Fatma Özer BAHŞI

İnönü Üniversitesi
Fen-Bilimleri Enstitüsü
Kimya Ana Bilim Dalı

86 + xi sayfa

2019

Danışman: Prof. Dr. Sema ERDEMOĞLU

Bu tez çalışmasında, özellikle kümes hayvanlarında kullanılan veteriner antibiyotik ilaçlarının atık sulardaki kalıntılarının katı faz ekstraksiyon ile zenginleştirilmesi ve HPLC-DAD ile analizi için etkin bir analiz metodu geliştirildi. Oldukça karmaşık atık su matrislerinde, farklı sınıflardan (enrofloksasin, sülfadimidin, oksitetrasiklin, trimetoprim, seftiofur, tilosin ve doksisisiklin) önemli veteriner ilaç kalıntılarının eş zamanlı analizi için “RP-HPLC-DAD Miktar Tayini Metodu” geliştirilip valide edildi. Tavuk çiftliklerinden alınan atık su numuneleri, ekstraksiyon işleminden önce, askıdaki maddeleri elimine etmek için Whatman filte kağıdından geçirildi. Daha sonra süzülen atık su numuneleri, 0,45µm naylon membram filtrelerden geçirildi. Katı faz ekstraksiyonuna kadar, herhangi bir degradasyondan kaçınmak için, örnekler 4°C’ de muhafaza edildi. OASIS HLB 500 mg ekstraksiyon kolonu kullanılarak yapılan, katı faz ekstraksiyon metodu ile tavuk çiftliklerinin atık su numunelerine, temizleme ve deriştirme işlemleri yapıldı. Katı faz ekstraksiyonu ile deriştirilen atık su numunelerinde, seçilmiş antibiyotik ilaç kalıntılarının kantitatif analizleri, geliştirilen gradient elüsyon metoduyla HPLC-DAD ile yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan 7 antibiyotik ilaçtan, 5 tanesi tavuk çiftliği atık sularında tespit edilmiştir. Valide edilerek doğrulanmış sonuçlara göre 15 mL atık suda 0,1415 mg/L enrofloksasin, 0,0460 mg/L seftiofur, 0,0803 mg/L oksitetrasiklin, 0,1720 mg/L doksisisiklin, 0,2048 mg/L trimetoprim tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), katı faz ekstraksiyonu (SPE), veteriner ilaçları, atık su

ABSTRACT

M.Sc.Thesis

ANALYSIS OF VETERINARY DRUGS RESIDUES IN WASTE WATER WITH HPLC-DAD

Fatma Özer BAHŞI

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

86 + xi pages

2019

Supervisor: Prof. Dr. Sema ERDEMOĞLU

In this thesis study, developed an effective analysis method for extracting and quantifying veterinary pharmaceuticals from wastewater of poultry farm by solid phase extraction (SPE) and HPLC-DAD and RP-HPLC-DAD technique was developed and validated to simultaneously analyze residues of significant veterinary drugs from different classes (enrofloxacin, sulfadimidine, oxytetracycline, trimethoprim seftiofur, tylosin, doxycycline) in extremely complex water matrices. Drain water samples collected from chicken farms was filtered with Whitman filter paper to eliminate compounds in suspension. After that, samples were filtered again through 0,45µm nylon membrane. In order to prevent any possible degradation, the samples were kept at 4°C until solid phase extraction stage. Solid phase extraction method, which was done by using OASIS HLB 500 mg extraction cartridge, was applied to clean and concentrate waste water samples. Final analysis to determine the residues of selected antibiotic drugs in samples which were concentrated by solid phase extraction was done by developed HPLC-DAD residue detection method. According to the results, 5 of 7 antibiotic drugs was detected in waste water of poultry farms. Validated results showed that 15 mL of waste water contains 0,1415 mg/L Enrofloxacin; 0,0460 mg/L seftiofur; 0,0803 mg/L enrofloxacin; 0,1720 mg/L doxycycline and 0,2048 mg/L trimetoprim.

Key words: High performance liquid chromatography (HPLC), solid phase extraction (SPE), veterinary drugs, waste water

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tez konusu olarak belirlenmesinde ve yürütülmesinde bana yön veren, her konuda destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgi ve hoşgörüsünden yararlandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Sema ERDEMOĞLU' na saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Huzurlu ve rahat bir çalışma ortamı sağladığı için sayın Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK' a saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın yürütülmesinde bana yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen eşim İrfan BAHŞİ' e teşekkür ederim.

Çalışmalarımıza 2014/32 numaralı proje ile maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi' ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ixx
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
3. KURAMSAL TEMELLER	10
3.1. Antibiyotik.....	10
3.2. Antibiyotiklerin Kullanım Amaçları	12
3.3. Antibiyotiklerin Olumsuz Etkileri.....	14
3.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	16
3.5. Veteriner İlaçlarının Analizi ve Zenginleştirme Yöntemleri.....	17
3.5.1. Katı faz ekstraksiyonu (SPE).....	17
Katı faz ekstraksiyonundaki katı materyaller.....	19
Otomatik (On-line) SPE.....	20
3.5.2. Solvent ekstraksiyonu (SE).....	21
3.5.3. Ultrases destekli ekstraksiyon (UAE).....	22
3.5.4. QuEChERS yaklaşımı (Hızlı, Kolay, Hesaplı, Etkili, Sağlam ve Güvenilir örnek hazırlama)	24
3.5.5. Matriks katı faz dispersiyonu (MSPD)	26
3.5.6. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE)	27
3.5.7. Mikro ekstraksiyon teknikleri.....	28
Katı faz mikroekstraksiyonu (SPME).....	28
Sıvı faz mikroekstraksiyonu (LPME)	29
3.6. Kromatografik Ayırma Yöntemleri.....	29
3.6.1. Ayırma mekanizmalarına göre sıvı kromatografisi	30
Adsorpsiyon kromatografisi.....	30
Dağılma kromatografisi	31
İyon değiştirme kromatografisi.....	31
Boyut eleme kromatografisi.....	32
Affinite kromatografisi	33

3.6.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	34
3.6.3. Sıvı kromatografisinde kullanılan dedektörler	35
UV/Vis Spektrofotometrik dedektörler.....	35
Fotodiyot dizisi dedektörleri	35
Floresans dedektörler	35
Kondüktivite (iletkenlik) dedektörleri	36
Elektrokimyasal dedektörler	36
Kırılma indisi dedektörleri	37
Kütle spektrometre dedektörleri.....	37
3.6.4. Sıvı kromatografisinde sistem uygunluk parametreleri	37
Kapasite Faktörü (k')	38
Teorik Plaka Sayısı (N).....	38
Kuyruklanma ve Pık Simetri Faktörleri	38
Seçicilik (α) ve Ayırma Faktörü (R)	38
3.7. Analitik Yöntem Validasyonu.....	39
3.7.1. Seçicilik (matriks etkisi).....	39
3.7.2. Kesinlik.....	39
Tekrarlanabilirlik (Sistem Kesinliği)	39
Tekrar Elde Edilebilirlik (Metot Kesinliği).....	39
3.7.3. Doğruluk	40
3.7.4. Ölçüm alt limiti (LOD) ve Tayin alt derişimi (LOQ).....	40
3.7.5. Çalışma aralığı	40
3.7.6. Çözelti stabilitesi	41
3.7.7. Sağlamlık	41
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	42
4.1. Materyal.....	42
4.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan reaktifler.....	43
4.1.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	43
4.2. Yöntem	44
4.2.1. İlaç stok çözeltilerinin hazırlanması	44
4.2.2. Kalibrasyon grafiğı için standart çözeltilerin hazırlanması	44
4.2.3. Atık su örneklerinin analiz için hazırlanması	45
4.2.4. Katı faz ekstraksiyonu ile yapılan önderiştirme işlemleri	46

4.2.5. HPLC-DAD analiz koşullarının belirlenmesi.....	47
4.2.6. Tavuk çiftliğinden alınan örneklerin analizleri.....	61
4.2.7. Katı faz ekstraksiyonu için koşulların optimizasyonu.....	63
4.2.8. Atık su numunelerinde tespit edilen ilaç derişimleri	65
4.3. Kromatografik Analizlerin Validasyonu	65
4.4. Uygulanan Analiz Yöntemine Ait Parametreler.....	67
4.5. Uygulanan Analiz Yönteminin Doğruluğunun Belirlenmesi	70
5. SONUÇ	71
5.1. HPLC-DAD Kromatografik Metot Geliştirme Çalışmaları	71
5.2. Yöntem Validasyon Sonuçları.....	72
5.3. Katı Faz Ekstraksiyonu Metot Geliştirme Çalışmaları.....	74
5.4. Atık Su Numunelerinde Tespit Edilen İlaç Miktarları	75
6. TARTIŞMA	76
7. KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Veteriner antibiyotiklerin olası çevreye giriş yolları

Şekil 3.2. Avrupa Birliği ülkelerinde hayvan sağlığında kullanılan antibiyotikler

Şekil 3.3. Vakum manifoldu

Şekil 3.4. Katı faz ekstraksiyonu yöntemi ile maddelerin ayrılma şeması

Şekil 3.5. HPLC sisteminin şematik gösterimi

Şekil 4.1. Uygulanan SPE yönteminin şematik gösterimi

Şekil 4.2. Yöntem 1 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.3. Yöntem 2 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.4. Yöntem 3 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.5. Yöntem 4 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.6. Yöntem 5 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.7. Yöntem 6 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.8. Yöntem 7 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.9. Yöntem 8 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.10. Yöntem 9 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.11. Yöntem 10 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.12. Yöntem 11 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.13. Yöntem 12 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.14. Yöntem 13 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.15. Yöntem 14 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.16. Önderiştirme yapılmamış atık su örneğine (pH:4) ait HPLC-DAD kromatogramı

Şekil 4.17. SPE ile önderiştirme işlemi uygulanmış örneğe (pH:4) ait HPLC-DAD kromatogramı (A geniş, B dar skalada kromatogram)

Şekil 4.18. İlaç etken maddesini içeren standart (pembe) ve SPE ile önderiştirme uygulanmış örnek suyuna (pH:4) ait (mavi) karşılaştırılmış kromatogram.

Şekil 4.19. Katı faz ekstraksiyonunun elüsyon aşamasında kullanılan solvent miktarına karşı geri kazanım grafiği

Şekil 4.20. Doğrudan kuyu suyunun (pH:4) ve 10 mg/L derişimlerinde standart eklenmiş kuyu suyunun SPE işleminden sonra HPLC-DAD kromatogramları



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Başlıca kullanılan önemli antibiyotik çeşitleri

Çizelge 3.2. Antibiyotiklerin direnç mekanizmaları

Çizelge 3.3. İlaç kalıntılarının analizi için kullanılan analitik yöntemler

Çizelge 3.4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Çizelge 4.1. Kullanılan kimyasallar ve özellikleri

Çizelge 4.2. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Çizelge 4.3. Yöntem 1 için uygulanan izokrotik elüsyon programı

Çizelge 4.4. Yöntem 2 için uygulanan izokrotik elüsyon programı

Çizelge 4.5. Yöntem 3 için uygulanan gradient elüsyon programı

Çizelge 4.6. Yöntem 4 için uygulanan gradient elüsyon programı

Çizelge 4.7. Yöntem 5 için uygulanan gradient elüsyon programı

Çizelge 4.8. Yöntem 6 için uygulanan izokrotik elüsyon programı

Çizelge 4.9. Yöntem 7 için uygulanan izokrotik elüsyon programı

Çizelge 4.10. Yöntem 8 için uygulanan gradient elüsyon programı

Çizelge 4.11. Yöntem 9 için uygulanan gradient elüsyon programı

Çizelge 4.12. Yöntem 10 için uygulanan gradient elüsyon programı

Çizelge 4.13. Yöntem 11 için uygulanan gradient elüsyon programı

Çizelge 4.14. Yöntem 12 için uygulanan gradient elüsyon programı

Çizelge 4.15. Yöntem 13 için uygulanan gradient elüsyon programı

Çizelge 4.16. Yöntem 14 için uygulanan gradient elüsyon programı

Çizelge 4.17. pH'ı farklı atık su örneklerine eklenen ilaç etken maddelerinin SPE ile geri kazanım oranları

Çizelge 4.18. Atık sulardaki ilaç kalıntı miktarları

Çizelge 4.19. Optimize edilen HPLC-DAD analiz yöntemi için validasyon parametreleri

Çizelge 4.20. Optimize edilen HPLC-DAD analiz yöntemi için seçicilik ve ayırma faktörleri

Çizelge 4.21. İlaç etken maddelerinin HPLC-DAD analizi için doğrusal kalibrasyon aralığı, LOD ve LOQ değerleri

Çizelge 4.22. İlaç etken maddelerinin kalibrasyon grafiklerine ait veriler

Çizelge 4.23. Standart karışım çözeltisindeki her bir bileşene ait kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4.24. İlaç eklenmiş atık su örneklerinden SPE sonrası ilaçların geri kazanımı

Çizelge 4.25. Yöntem 14 ile yapılan validasyon sonuçları

SİMGELER VE KISALTMALAR

HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LOD	Minimum tayin limiti
LOQ	Minimum ölçüm limiti
SPE	Kat faz ekstraksiyonu
MS	Kütle spektrometrisi
LC	Sıvı kromatografisi
GC	Gaz kromatografisi
PDA	Diyot dizisi dedektörü
DAD	Foto diyot dizisi dedektörü
UV	Ultraviyole dedektör
FLD	Floresans dedektör
MSPD	Matriks katı faz dispersiyonu
LLE	Sıvı sıvı ekstraksiyonu
SE	Solvent ekstraksiyonu
SLE	Katı sıvı ekstraksiyonu
UAE	Ultrases destekli ekstraksiyon
PLE	Basınçlı sıvı ekstraksiyonu
SPME	Katı faz mikroekstraksiyonu
DSPME	Dispersif katı faz mikroekstraksiyonu
LPME	Sıvı faz mikroekstraksiyon
MSPD-LE	Matriks katı faz dispersiyonu-Kılcal elektroforezi
ASE	Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu
PFE	Basınçlı akışkan ekstraksiyonu
PHSE	Basınçlı sıcak solvent ekstraksiyonu

SSE	Subkritik solvent ekstraksiyonu
HWE	Sıcak su ekstraksiyonu
HF-LPME	Oyuk fibersıvı faz mikroekstraksiyonu
DLLME	Dispersive sıvı sıvı mikroekstraksiyonu



1. GİRİŞ

Son otuz yılda veteriner antibiyotikleri bütün Dünya’da, hastalıkları tedavi etmek ve hayvan sağlığını korumak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvanların beslenmesiyle ilgili çalışmalara verilen önemin her geçen gün artmasıyla birlikte, besi koşullarında hayvanların büyümesini sağlamak amacıyla, bazı veteriner ilaçları çoğunlukla yeme katılarak verilmektedir. Union of Concerned Scientists (UCS) tarafından 2001 yılında bildirilen bir rapora göre, Amerika’da yıllık 16 milyon kg antibiyotik bu amaçlar için uygulanmıştır, ancak bu oranın %70’i terepötik olmayan bir şekilde kullanılmıştır. Hayvan beslenmesinde antibiyotiklerin kullanımı 1950’lerden beri hızla artmaktadır. 1950’lerde 91,000 kg olan antibiyotik tüketimi 1999 yılında 9,3 milyon kg’a ulaşmıştır. 1990’larda Avrupa’da toplam 5 milyon kg antibiyotik kullanıldığı rapor edilmiştir. Bunun 1,5 milyon kg’ı hayvanlarda büyümeyi sağlamak için yem katkısı olarak ve 3,5 milyon kg’ı da terepötik amaçla kullanılmıştır. Çin’de hayvanlar için yemlere katılan bazı antibiyotiklerin kullanımına 1989 yılından itibaren bir takım düzenlemeler getirilmiştir. Hayvanların türüne ve büyüklüğüne göre kullanılan antibiyotik miktarları değişiklik göstermektedir. Çoğu antibiyotik suda çözünür. Antibiyotiklerin hayvan bağırsağında emilimi yetersizdir ve bu yüzden %30-%90 arasında dışkı ya da idrar yoluyla atılır ve günümüzde Dünya’nın birçok yerinde hayvan dışkıları toprağa atılmaktadır [1].

Veteriner amaçlı kullanılan sulfonamide, fluoroquinolone, tetracycline chloramphenicol gibi antibiyotikler, hastalıkların kontrolü ve enfekte olmuş çiftlik hayvanlarının tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Özellikle hayvan çiftliklerinde çeşitli amaçlarla kullanılan antibiyotikler hayvanlar üzerinde pozitif etkilerine rağmen, gübre, toprak vb. yollarla sulara geçmekte ve son 20 yıldır çevre için büyük tehdit oluşturmaktadırlar. Bazı Avrupa Ülkeleri tarafından özellikle tedavi edici dozun üzerinde veteriner ilaçların kullanımı yasaklanmış olmasına rağmen; oldukça çeşitli farmakolojik bileşikler, yiyecek üreten hayvan çiftliklerinde enfeksiyon veya enfeksiyona bağlı olmayan hastalıkların tedavisinde ya da hayvanların büyümelerini hızlandırmak için kullanılmaktadırlar. Bu bileşikler tedavi edici özelliklerine göre anti-mikrobial, iltahap giderici, antiseptikler, hormonlar, anaestezikler, parasitoidler, anti fungallar olmak üzere pek çok gruba ayrılmaktadır. Şu anda, Avrupa Birliği’nce yalnızca dört kimyasalın (salinomycin, monensin, avilamycin ve flavomycin) büyümeyi hızlandırıcı olarak hayvan besinlerine

katılmasına izin verilmiştir. USA ve Kanada’da esteroidler, tremboline asetat ve melengestrol asetat gibi çiftlik hayvanlarında büyümeyi artıran diğer bileşikler halen lisanslı satılmaktadır. Son çalışmalarda, belediye atık suyu, göl suları ve hatta yer altı sularında bu antibiyotik atıklarına rastlanmıştır [2, 3].

Çevreye çeşitli aktivitelerle salınan bu farmakolojik bileşenler, düşük derişimler de olmasına rağmen, bakterilerde direnç oluşturdıkları için özel bir çevre sorunu olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Ayrıca antibiyotik atıkları, farklı çevresel koşullar altında (sıcaklık, ışık, pH gibi) farklı davranış gösterirler. Antibiyotikler, fizikokimyasal özellikleri ve zayıf parçalanabilme özelliklerinden dolayı su kaynaklarında bulunmaları risk oluşturmaktadır. Bu kimyasallar biyolojik bozunmalara karşı da dirençlidirler ve parçalanmaları zayıftır. Son araştırmalar örneğin, sulfamethazine’in, potansiyel troid kanserojen reaktif olduğunu ve hidrofilik özelliğinden dolayı kolayca akuatik çevreye karıştığını göstermiştir. Tetrasiklin antibiyotikler, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve kümes hayvanlarında ekonomik olduğu için de yaygın olarak kullanılmaktadır [4].

Avrupa’da yüzey sularında, bu farmakolojik maddeler için 10 ng/L bulunması gereken eşik değeri olarak belirlenmiştir. Ancak Avrupa Nehirler’inde 0,1-250 ng/L aralığında bu kimyasallara rastlanmıştır. Yarı-sentetik veya sentetik olarak üretilen bu ilaçlar atık olarak sadece suya değil aynı zamanda hayvansal ürünlere de geçmektedir. Örneğin et ve süt ürünlerinde de bu farmakolojik ilaçlara, özellikle antibiyotik kalıntılarına rastlanmaktadır. Bu şekilde terapatik amaçla kullanılan bu bileşikler, hayvan-besin-insan-çevre zinciri içerisinde dağılmaktadırlar. Son yıllarda özellikle hayvansal gıdalarda bu bileşenlerin analizine ilişkin çalışmalar dikkat çekici bir şekilde artmaktadır. Çevreye farklı yollarla (fabrika üretimleri sırasında, hayvan çiftliklerinden, atık sularla) yayılan bu kimyasallar belli derişimlerin üzerinde düşük düzeylerde dahi olsalar, bakterilerle parçalanmaya karşı direnç oluşturdıkları için insan ve hayvan sağlığı için zamanla tehlikeli hale gelmektedirler [5]. Bu ilaçlar polaritelerinden dolayı sularda yüksek çözünürlük ve kararlılık gösterirler ayrıca asidik farmasötiklerin parçalanmalarının zayıf olmasından dolayı sucul ortamdan ayrılmaları düşük düzeydedir ve bu sebeple yeraltı sularında, yüzey sularında ve içme sularında kirlilik olarak görülebilmektedir. Ayrıca bunların adsorpsiyon,

fotokatalitik, Fenton yöntemi gibi daha pek çok teknikle giderimi üzerine de son yıllarda oldukça fazla çalışma vardır.

Farklı matrikslerde (toprak, su, hayvansal gıda gibi...) bu maddelerin analizi, örneğin yapısına bağlı olarak oldukça karmaşık işlem basamaklarını içerebilir. Antibiyotikler çoğunlukla non-polar bir çekirdek ve fonksiyonel bir grup içerirler. Bunların birleşmesi veya protonlanması ortam pH'na bağlıdır. Oldukça polar veya non-polar ekstraksiyon çözücülerini ile tam olarak ekstraksiyon sağlanamayabilir. Bu oldukça önemli bir analitik problemidir. Genellikle organik çözügenler zayıf asidik tamponlarla birlikte ekstraksiyon çözeltisi olarak kullanılırlar. Örnekler doğrudan filtrasyonla veya katı faz ekstraksiyonu ile temizlenirler. Bu maddeler sulu ortamda pH, sıcaklık fotoliz olaylarının etkisiyle orijinal türlerini korumakta da zorlanabilirler. Bu durumda orijinal türün izlenmesinde pek çok analitik problemlerle karşılaşılır. Dedeksiyon modunda çoğunlukla sıvı kromatografisiyle beraber DAD, floresans veya MS dedektörler kullanılır. Özellikle sulu ortamda derişimleri düşük olduğundan ayırma, zenginleştirme gibi ön işlem basamaklarının kullanılması da gerekebilir. [6].

Pek çok ülkede veteriner ilaçlarının kullanımına ilişkin bazı sınırlamalar getirilmesine rağmen; hayvansal gıdalarda, toprakta, suda ve farklı çevresel ortamlarda bu tür kirliliklere ne yazık ki rastlanmaktadır. Ancak bu maddelerin varlığına bağlı olarak sağlık ve diğer potansiyel zararlı etkileri üzerine araştırmalar hala yetersizdir. Ülkemizde ise yaygın olarak kullanıldığı bilinen bu ilaçların kontrolü ve farklı matriksler de (su, toprak, hayvansal gıdalar vd.) analizine ilişkin araştırmalar ne yazık ki yeterince bulunmamaktadır. Hastalıklara karşı tedavi amaçlı veya hayvan gelişimlerini hızlandırmak için çoğunlukla da hayvan yemlerine katılarak kullanılan bu ilaçların, çeşitli yollarla çevreye atılması ve hayvansal gıdalara geçen atık düzeylerinin belirlenmesine ilişkin doğru, hızlı ve kolay analitik metotların geliştirilmesi bunların izlenmesi açısından oldukça önemlidir.

İlaçların kimyasal özelliklerine bağlı olarak; sulu ortamda çözünme dengeleri, toprak tarafından adsorpsiyonları, ışık etkisiyle fotoliz sonucunda kısmen de olsa parçalanmaları gibi etkiler nedeniyle, analizlerinde pek çok problemle karşılaşmaktadır. Düşük derişimlerde olmaları, taşınmaları sırasında fiziksel koşullar ve matriks etkisiyle orijinal türlerini koruyamamaları karşılaşılan diğer analitik problemlerdir. Bu nedenle veteriner ilaçlarının tayininde kullanılacak analitik

metotların iyileştirilmesi bu alandaki çalışmalara katkı sağlanması açısından oldukça önemlidir. Bu bileşenlerin analizinde genellikle HPLC-DAD veya LC-MS teknikleri kullanılmaktadır. Ancak kullanılan tekniklerin başarısı daha çok ekstraksiyon basamağına ve örnek hazırlama işlemlerine bağlıdır.

Bu tez kapsamında; ülkemizde özellikle tavuk çiftliklerinde kontrolsüz ve çoğunlukla hiç bir sınırlama olmadan kullanılan veteriner ilaçlarının, çiftlik atık sularında bulunan tür ve düzeylerinin tayini için bir analitik yöntem geliştirilmesi amaçlandı. Özellikle yemlere veya suya katkılanarak verilen başta antibiyotikler olmak üzere bu ilaçların tayini, her tavuk yetiştirme döneminin sonunda hayvanlar kesime gönderildikten sonra yemlik ve su içme bölmeleri dahil olmak üzere yıkama sularının da toplandığı atık sularda yapılmıştır. Bu sularda düşük derişimler de bulunan atık veteriner ilaçlarının tayini için, katı faz ekstraksiyon işlemleri (SPE) uygulandı ve ayırma-zenginleştirme basamakları optimize edilerek, örnek hazırlama basamaklarının iyileştirilmesi ve ardından HPLC-DAD ile tayini amaçlandı. Böylece kolay, uygulanabilir, rutin bir analitik metod geliştirilmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sandra Babic ve ark., [4] son derece karmaşık atık su matriksinde farklı sınıflardan önemli veteriner ilaçların HPLC-DAD ile analizini yapmışlardır. Örnek temizleme adımında katı faz ekstraksiyonu uygulamaları üzerinde durmuşlardır. Sülfonamid (sülfametazin, sülfadiazin, sülfaguanidin), sülfonamid sinerjit (trimetoprim), tetrasiklin (oksitetrasiklin), florokinolon (enrofloksasin), ve B-laktam (penisilin G/prokain) grubu içeren ilaçları incelemişlerdir. Oasis HLB ekstraksiyon mini kolonu kullanarak katı faz ekstraksiyonuyla zenginleştirme ve temizleme işlemi yapmışlardır. Geri kazanımları %68,3'ün üzerinde bulmuşlardır ve sadece sülfaguanidin için düşük geri kazanım elde etmişlerdir (%11.2). İlaçların tayin limitlerinin 0,1 µg/L – 40 µg/L arasında değiştiğini göstermişlerdir.

Lei Tong ve ark., [2] optimize edilmiş SPE-LC/MS/MS kullanarak çevresel su örneklerinde ve domuz atık suyunda sülfonamid, florokinolon, tetrasiklin ve kloramfenikol grubu antibiyotikleri incelemişlerdir. Katı faz ekstraksiyonunu Oasis HLB kolon ile yapmışlardır. Yaz aylarında yapmış oldukları çalışmada antiyobitik kalıntılarının konsantrasyonlarını sırasıyla yeraltı suyunda 1,6 ng/L–8,6 ng/L, göl suyunda 5,7 ng/L–11,6 ng/L , atık suyun giriş suyunda 7,9 ng/L–1172,3 ng/L ve çıkış

suyunda 8,5 ng/L–21692,7 ng/L olarak bulmuşlardır. Kış aylarında yapmış oldukları çalışmada ise antiyobitik kalıntılarının konsantrasyonlarını sırasıyla yeraltı suyunda 2,0 ng/L–7,3 ng/L, göl suyunda 6,7 ng/L–11,7 ng/L, atık suyun giriş suyunda 5,8 ng/L–409,5 ng/L ve çıkış suyunda 6,4 ng/L–104,4 ng/L olarak bulmuşlardır. Çok fazla miktarda antibiyotik kullanılması sonucu sulu çevrenin kirlendiğini ve bu yüzden acilen kirlilik önlemlerinin alınması gerektiğini ortaya koymuşlardır. Antibiyotiklerin derişimlerinin oldukça düşük olduğunu fakat hedef olmayan organizmalara ve sonuçta insan sağlığına olumsuz etki edeceğini bildirmişlerdir.

Hu Yu ve ark., [7] domuz eti matriksinde farklı sınıflardan bazı önemli veteriner ilaç kalıntılarını belirlemek için etkili bir yöntem geliştirmişlerdir. HPLC-DAD ile florokinolon (enoksasin, lomefloksasin), sülfonamid (sülfanilamid, sülfametoksazol) ve tetrasiklin (tetrasiklin) grubu antibiyotiklerin eş zamanlı analizini yapmışlardır. Matriks katı faz dispersiyon (MSPD) yöntemini örneği temizlemek için kullanılmışlardır ve bu aşamada yağı uzaklaştırmak için örneği n-hekzan ile yıkamışlardır. Analitleri elüe etmek için de asetonitril-diklorometan (1:1 v/v) kullanmışlardır. HPLC-DAD analizlerini 1,0 ml/dk akış oranında 15 dk içerisinde yapmışlardır. Geri kazanımları %80'in üzerinde bulmuşlardır. İlaçların ölçüm limitlerinin 7 µg/kg–34 µg/kg arasında değiştiğini göstermişlerdir.

Reza Hajian ve ark., [8] bazı büyükbaş hayvanların sütünde sülfadiazin ve trimetoprim ilaçlarını spektrofotometre ile belirlemek için net analit sinyal standart ekleme metodunu kullanmışlardır. Yöntemde çok bileşenli karışımların spektrumlarından belirli bir analitle ilgili bilgiyi sağlayan net analit sinyal kavramı ile standart ekleme metodunun avantajlarını birleştirmişlerdir. Bu yöntemin tam spektrum gerçekleşmesi gibi avantajlara sahip olduğunu göstermişlerdir ve bu yüzden kalibrasyon ve tahmin adımı gerektirmediğini ortaya koymuşlardır. Büyük baş hayvan sütünde sülfadiazin ve trimetoprim ilaçlarının analizi için bulutlama noktası ekstraksiyonu yapmışlardır. Ekstraksiyon çözücüsü olarak Triton-X 100 (miselli ortamı indüklemek için) kullanmışlardır. Sülfadiazin ve trimetoprim için 1,0 µmol/L–150,0 µmol/L aralığındaki derişimlerde net analit sinyal vektörünün doğrusal bir şekilde arttığını göstermişlerdir. Tayin limitini sülfadiazin için 0,86 µmol/L ve trimetoprim için 0,92 µmol/L bulmuşlardır.

Nina Bilandzic ve ark., [9] 1259 işlenmemiş süt örneklerinde kloramfenikol, penisilin, sefalosporin, tetrasiklin, sülfonamid, beta-laktam, kinon, aminoglikozid,

makrolid gibi farklı sınıftan antibiyotikleri 3 yıl boyunca incelemişlerdir. Bu gruptan antibiyotiklerin belirlenmesi için mikrobiyolojik ve immunoassay analiz yöntemlerini kullanmışlardır. Mikrobiyolojik analizlerde 36 tane ilacın varlığını tespit etmişlerdir. Ayrıca immunoassay analizler sonucu örneklerde tetrasiklinin kalıntı düzeyinde var olduğunu göstermişlerdir. HPLC-DAD yöntemiyle yaptıkları analiz sonucunda bazı süt örneklerindeki 1671 µg/kg tetrasiklin, 19 µg/kg amoksisilin ve 12 µg/kg penisilin G, miktarlarının maksimum kalıntı limitinin üzerinde olduğunu belirlemişlerdir.

Elena Martinez - Carballo ve ark., [10] domuz, tavuk ve hindi gibi hayvanların gübrelerinde, tetrasiklin, sülfonamid, trimetoprim, florokinolon grubu antibiyotiklerinden bazılarını incelemişlerdir. Bu grup antibiyotiklerin enstrümental analizi için LC-MS/MS kullanmışlardır. Çevresel örneklerdeki bu grup antibiyotikleri ekstrakte etmek için çeşitli ekstraksiyon teknikleri denemişlerdir. Farklı tamponlar kullanarak ultrasonik ekstraksiyon yapmışlardır. Örnek temizleme adımı için katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve sıvı-sıvı ekstraksiyonunu (LLE) uygulamışlardır. Geri kazanımların %61-%105 arasında değiştiğini göstermişlerdir. Avusturya'dan alınan hayvan gübre örneklerinin analizi sonucu domuz gübresinde 46 mg/kg klortetrasiklin, 29 mg/kg oksitetrasiklin 23 mg/kg tetrasiklin tespit etmişlerdir. Ayrıca domuz gübresinde sülfadimidin, tavuk ve hindi gübresinde önemli miktarlarda sülfadiazin belirlemişlerdir. Tavuk ve hindi gübre örneklerinde özellikle enrofloksasinin varlığını gözlemlemişlerdir. Çevresel örneklerde tespit edilen antibiyotik miktarlarının endişe verici boyutta olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ling Zhao ve ark., [1] Çin'in çeşitli bölgelerinden topladıkları 143 hayvan gübre örneklerinde florokinolon, sülfonamid, tetrasiklin grubundan bazı antibiyotikleri incelemişlerdir. Veteriner ilaç kalıntılarını belirlemek için etkili bir HPLC metodu geliştirmişlerdir. Örnek hazırlama aşamasında, farklı ekstraksiyon çözeltileri kullanarak ultrasonik ekstraksiyon yapmışlardır. Geri kazanımlar florokinolon grubu antibiyotikler için %79,9 - %102,0 arasında, sülfonamid grubu antibiyotikler için %79,9 - %102,0 arasında, tetrasiklin grubu antibiyotikler için %79,9-%102,0 arasında değişmektedir. LOQ değerleri, florokinolon grubu antibiyotikler için 0,155 mg/L–0,332 mg/L arasında, sülfonamid grubu antibiyotikler için 0,079 mg/L–0,194 mg/L arasında, tetrasiklin grubu antibiyotikler için 0,709 mg/L–1,829 mg/L arasında değişmektedir. Bütün gübre örneklerinde farklı sınıflardan antibiyotikleri tespit

etmişlerdir. Sülfonamid grubu antibiyotikleri en çok tavuk gübresinde belirlemişlerdir. Sonuç olarak farklı sınıflardan antibiyotik ilaçların olumsuz etkilerini ve taşınma sistemlerini değerlendirmek için daha fazla araştırma yapmaları gerektiğini ortaya koymuşlardır.

Luisa Patrolecco ve ark., [11] çevresel su örneklerinde çeşitli sınıflardan bazı ilaçların HPLC-UV ile analizini yapmışlardır. Katı faz ekstraksiyonu uygulayarak atık su ve yüzey suyu örneklerinde ilaçların belirlenmesi için basit ve güvenilir bir analitik prosedürü valide etmişlerdir. % 65-% 104 arasında değişen geri kazanımlar ile ve %16'dan küçük bağıl standart sapma ile doğru ve hassas bir yöntem elde ettiklerini göstermişlerdir. Geliştirdikleri yöntem ile çevresel su örneklerinde ilaç aktif ürünlerin rutin analizini amaçlamışlardır.

P.Perez-Lozano ve ark., [12] katı formdaki bir premikte amoksisilinin ve dekratasyon ürünlerinin belirlenmesi için yeni bir ters faz HPLC-DAD yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C₁₈ nükleosil bir kolon kullanmışlardır ve gradient elüsyon yapmışlardır. Farklı oranlarda metanol ve tampon çözelti karışımından oluşan bir mobil faz sistemi oluşturmuşlardır. 230 nm dalga boyunda çalışmışlardır. Bu yöntemin amoksisilinin ve dekratasyon ürünlerinin analizi için hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu ortaya koymuşlardır. Premikslerin stabilitelerine bakılarak tahmini raf ömrünün 21 ay olduğunu belirlemişlerdir.

Ruicheng Wei ve ark., [13] Çin'in bir bölgesindeki çiftlikler etrafında yer alan yüzey sularında ve hayvan atık sularında farklı sınıflardan veteriner antibiyotik kalıntılarını incelemişlerdir. Bu yüzden 27 tane çiftlikten çok sayıda atık su örneği toplamışlardır. Farklı sınıflardan belirledikleri 10 tane veteriner antibiyotik ilacı LC/MS/MS ile incelemişlerdir. Çevresel su örneklerini zenginleştirmek ve temizlemek için katı faz ekstraksiyon metodu geliştirmişlerdir. Katı faz ekstraksiyonu için Oasis HLB mini kolonları kullanmışlardır. En çok çiftlik atık suyunda veteriner ilaç kalıntısı belirlemişlerdir. Farklı sınıflardan seçtikleri veteriner antibiyotiklerin kalıntı seviyelerinin hayvan türleriyle ve alındıkları yerle ilgili olduğunu ortaya koymuşlardır.

R. Nageswara Rao ve ark., [14] çevresel su örneklerinde florokinolon, sülfonamid, trimetoprim ve sefalosporin grubu antibiyotikleri incelemişlerdir. Antibiyotiklerin belirlenmesi için doğru ve hassas bir LC-MS/MS yöntemi

geliştirmişlerdir. Katı faz ekstraksiyonu için C₁₈ ve Oasis HLB mini kolonları denemişlerdir ve en iyi geri kazanımı Oasis HLB kartuş ile elde etmişlerdir. İncelenen antibiyotiklerin geri kazanımları üzerine pH'ın etkisini incelemek için üç farklı pH (3, 7, 10) değerinde çalışma yapmışlardır. En iyi geri kazanımı pH 3'te elde etmişlerdir. İlaçların ölçüm limitlerinin 2,0 µg/kg–24,0 µg/kg ve tayin limitlerinin 0,6 µg/kg–8,1 µg/kg arasında değiştiğini göstermişlerdir. Çevresel su örneklerinde farklı guruplardan beş tane antibiyotik ilaç tespit etmişlerdir.

R.W. Han ve ark., [15] süt örneklerinde 6 farklı sınıftan 38 tane veteriner antibiyotik kalıntısını belirlemek için hızlı ve seçici bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Sütün 1 ml' ine 0,5 ml su ve 3 ml asetonitril ilave ederek Oasis HLB kartuş ile saflaştırma işlemi yapmışlardır. Geri kazanımların %68-%118 arasında değiştiğini göstermişlerdir. Yöntemin validasyon parametrelerini 2002/657/EC sayılı Avrupa Birliği Komisyon kararının gerekliliklerine göre değerlendirmişlerdir. Bütün antibiyotik ilaçların ölçüm limitlerinin 7 µg/kg – 34 µg/kg arasında değiştiğini göstermişlerdir. Geliştirdikleri yöntem ile sütteki veteriner antibiyotik kalıntılarının riskli seviyede olup olmadıklarını değerlendirmeye olanak sağlamışlardır.

Antonia Garrido Frenich ve ark., [16] yumurtada farklı sınıflardan veteriner ilaçları UHPLC-MS/MS ile analiz etmişlerdir. Çözücü ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu, matriks katı faz dispersiyonu ve modifiye edilmiş QuEChERS yöntemi gibi 4 farklı ekstraksiyon tekniğini deneyerek bunların karşılaştırmasını yapmışlardır. Ekstrakte ettikleri ilaç sayısına ve ilaçların geri kazanımlarına bakarak bu ekstraksiyon tekniklerinin karşılaştırmasını yapmışlardır. Çözücü ekstraksiyon yönteminin diğer yöntemlerden daha iyi sonuç verdiğini göstermişlerdir. QuEChERS yönteminin çözücü ekstraksiyonundan daha basit ve daha hızlı bir yöntem olduğunu fakat daha az ilacın ekstrakte edildiğini belirtmişlerdir. Matriks katı faz dispersiyonu ile tetrasiklin ve kinolon grubu antibiyotikleri ekstrakte edememişlerdir. Katı faz ekstraksiyonuyla da makrolid ve tetrasiklin grubu antibiyotikleri ekstrakte edememişlerdir. Ekstraksiyon yönteminin seçiminin ekstrakte edilecek antibiyotığın türüne bağlı olduğunu göstermişlerdir. Çözücü ekstraksiyon yönteminin farklı sınıflardan bütün antibiyotiklerin eş zamanlı analizi için en uygun yöntem olduğunu ortaya koymuşlardır. Çözücü ekstraksiyon yöntemini valide etmişlerdir ve bütün ilaçlar için %60-%119 arasında değişen geri kazanım elde etmişlerdir. İlaçların

ölçüm limitlerinin yaklaşık olarak 5 µg/kg olduğunu göstermişlerdir. Yumurta örneklerine uygulanan yöntemlerin sonucunda farklı sınıflardan 6 tane veteriner ilacı belirlemişlerdir.

Mamani ve ark., [17] inek sütünde tetrasiklin, sülfonamid, ve kloramfenikol grubu antibiyotiklerin eş zamanlı belirlenmesi için bir HPLC-DAD yöntemi geliştirmişlerdir. HPLC analizleri için C₁₈ hibrit bir kolon kullanmışlardır. 0,075 mol/L sodyum asetat, 0,035 mol/L kalsiyum klorür ve 0,025 mol/L sodyum EDTA karışımından oluşan bir gradient elüsyon programı uygulamışlardır. Örnek hazırlama aşamasında polimerik bir kartuş kullanarak katı faz ekstraksiyonu yapmışlardır. Kloramfenikol grubu antibiyotikler hariç tüm antibiyotiklerin ölçüm limitlerinin maksimum kalıntı limitlerinin altında olduğunu bildirmişlerdir. Sütteki antibiyotiklerin belirlenmesi için seçtikleri yöntemin uygun bir yöntem olduğunu göstermişlerdir.

Wojciech Baran ve ark., [18] sülfanamid grubu antibiyotiklerin çevresel etkileri ve insan sağlığı üzerine etkileri üzerine bir çalışma yapmışlardır. İlaçların, dünyadaki üretim ve tüketimlerinin hızlı bir şekilde arttığını ve mikrabiyal enfeksiyonların tedavisinde önemli bir yere sahip olduğunu göstermişlerdir. Sülfonamidlerin çevredeki varlıklarıyla ilgili çok sayıda yayın incelemişlerdir. Bu ilaçların yaklaşık olarak olarak %80' ninin çevreye ulaştığını ve insan sağlığını etkileyecek mikropların popülasyonunu değiştireceğini bildirmişlerdir. Elde ettikleri veriler doğrultusunda çevreden kirlilikleri giderme yöntemlerinin pahalı olmadıklarını ve bunun için etkili bir araştırma yapılması gerektiğini ortaya koymuşlardır.

Huan Yu ve ark., [19] domuz, sığır ve tavuk dokularında tetrasiklin grubu antibiyotikleri kantitatif olarak belirlemek için hızlı ve basit bir hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) yöntemi geliştirmişlerdir. Ekstraksiyon için trikloroasetik asit ve asetonitril çözücü karışımlarını kullanmışlardır ve en iyi çözücü karışım oranını belirlemişlerdir. Sıcaklık ve basınç parametrelerini optimize etmişlerdir ve en iyi ekstraksiyon etkinliğini 60°C ve 65 bar'da elde etmişlerdir. Et örneklerinde 8 tane tetrasiklin grubu antibiyotiği HPLC-UV ile analizlemişlerdir ve 355 nm dalga boyunda çalışmışlardır. Antibiyotikler için %50-%450 arasında değişen geri kazanımlar elde etmişlerdir. Numunelerde oksitetrasiklin, klortetrasiklin ve minoksisilin gibi antibiyotikleri fazla miktarda tespit etmişlerdir.

3. KURAMSAL TEMELLER

3.1. Antibiyotik

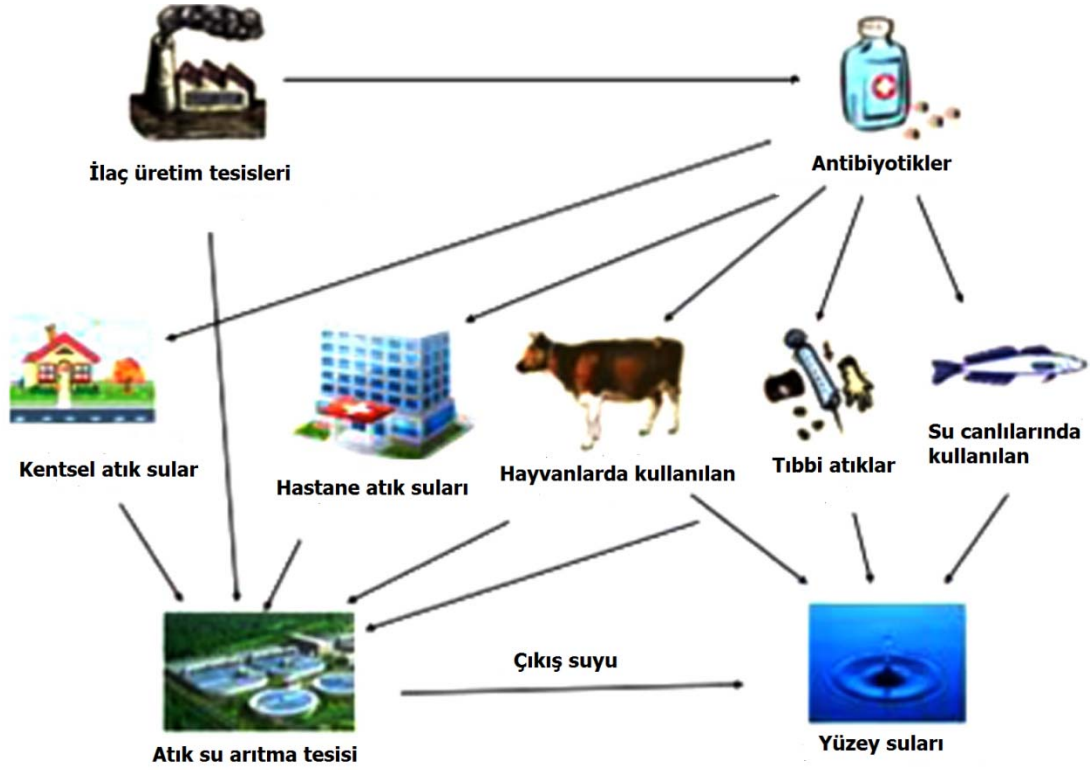
Antibiyotikler, çeşitli yollarla uygulanabilen, antimikrobiale aktiviteleri ile sentetik veya yarı sentetik oluşumlar olarak tanımlanırlar. Veterinerlikte hastalıkları önlemek ve tedavi etmek için kullanılırlar. İlaçların aşırı kullanılması dirençli mikroorganizmaların oluşumuna sebep olduğundan biyotik çevreyi olumsuz etkilemektedirler. Başlıca kullanılan önemli antibiyotik çeşitleri ve kullanım yerleri Çizelge 3.1.' de verilmiştir [20].

Çizelge 3.1. Başlıca kullanılan önemli antibiyotik çeşitleri

SINIF	BİLEŞİKLER	BİRİNCİL KULLANIMI	YAN ETKİLERİ
Aminoglikozidler	Apramisin Gentamisin Kanamisin Neomisin Sisomisin Spektinomisin Streptomisin	Sadece domuzlar Tüm hayvanlar, insanlar Köpek, domuz, sığır ve atlar Tüm hayvanlar Sadece insanlar Domuz, sığır, koyun ve kümes hayvanları Artık kullanılmıyor	Nörotoksik Nefrotoksik Ototoxik, nefrotoksik Ototoxik, nefrotoksik
B-Laktamlar: penisilinler	Amoksisilin Ampisilin Azlosilin Benzilpenisilin Kloksasilin Dikloksasin Flukloksasilin Metisilin Mezlosilin Nafsilin Oksasilin Piperasilin Fenoksimetilsilin Penisilin G	Tüm hayvanlar Tüm hayvanlar İnsanlar Tüm hayvanlar Sığırlar Sığırlar İnsanlar İnsanlar İnsanlar İnsanlar Sığırlar İnsanlar İnsanlar İnsanlar	Alerjik reaksiyonlar
Sefalosporinler	Sefalekszin Sefalotin Sefazolin Seftiofur Sefotaksim Sefotiam Sefkuinom	Köpekler İnsanlar İnsanlar Sığırlar, domuzlar İnsanlar İnsanlar Sığırlar, domuzlar	B-Laktamlar ile birlikte alerjik reaksiyonlar
Fenikoller	Kloramfenikol	Kedi ve köpekler	Anemi
Florokinolonlar	Siprofloksasin Enrofloksasin Marbofloksasin Flumekin Ofloksasin	İnsanlar Tüm hayvanlar Tüm hayvanlar İnsanlar İnsanlar	Genç hayvanlarda artropatiler
Linkozamidler	Klindamisin Linkomisin	Köpekler, insanlar, Kedi, domuz ve sığırlar	Gastro-intestinal problemler

Makrolidler	Azitromisin Klaritromisin Eritromisin Roksitromisin Spiramisin Tilosin Vankomisin	İnsanlar İnsanlar İnsanlar, sığır ve tavuklar İnsanlar Tüm hayvanlar Sadece hayvanlar İnsanlar	
Sülfonamidler	Sulfanilamid Sulfadimetoksin Sulfadimidin Sulfametoksazol Sulfapiridin Sulfatiazol	İnsanlar Sığır, domuz ve tavuklar Sığır, koyun ve tavuklar İnsanlar Domuzlar İnsanlar	Nefrotoksik
Trimetoprim		Sülfonamidler ile birlikte kullanılırlar	
Tetrasiklinler	Klortetrasiklin Doksisiklin Oksitetrasiklin Tetrasiklin	Sığır ve domuzlar İnsanlar, kedi ve köpekler İnsanlar, sığır, koyun ve domuzlar İnsanlar, at, koyun ve domuzlar	Hepatotoksik

Antibiyotiklerin bir kısmının özellikle toprakta uzun süre kaldığı ve diğer bir kısmının da çok hızlı parçalandığı gözlemlenmiştir. 2006 yılında Avrupa’da büyüme öncüsü olarak antibiyotiklerin kullanılması yasaklanmıştır. Bu yasaklama ile ilaçların aşırı tüketimine ve artan bakteri direncine dikkat çekilmesi hedeflenmiştir. Antibiyotikler biyoaktif maddeler oldukları için hayvan organizmalarından tamamen elimine edilemezler. Bu nedenle ana bileşikler veya metabolitler olarak canlı organizmadan atılırlar. Atılma oranları maddelere, uygulanma şekillerine ve atılan türlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Tetrasiklin ve sülfonamid grubu antibiyotiklerin canlı organizmalarındaki degradasyon oranları %40 ve %90 arasında değişiklik gösterir. Sülfametoksazol grubu antibiyotiklerin %85’i degradasyona uğrar. Vücutta oldukça inert olan ilaçların degradasyon yani parçalanma oranları düşüktür. Amoksisilin degradasyon oranı %10 ve %20 arasında değişmektedir. Antibiyotik metabolitlerinde degradasyon meydana gelirse, atıldıkları yerlerde de degrade olmaya devam ederler fakat metabolitler parçalanmaya uğramazlarsa onların çevredeki dirençleri kararlı olur. Antibiyotik metabolitleri atıldıktan hemen sonra tekrar ana bileşiğine de dönüşebilir. Veteriner antibiyotiklerin olası çevreye giriş yolları Şekil 3.1’de gösterilmiştir [20].



Şekil 3.1. Antibiyotiklerin çevreye olası giriş yolları

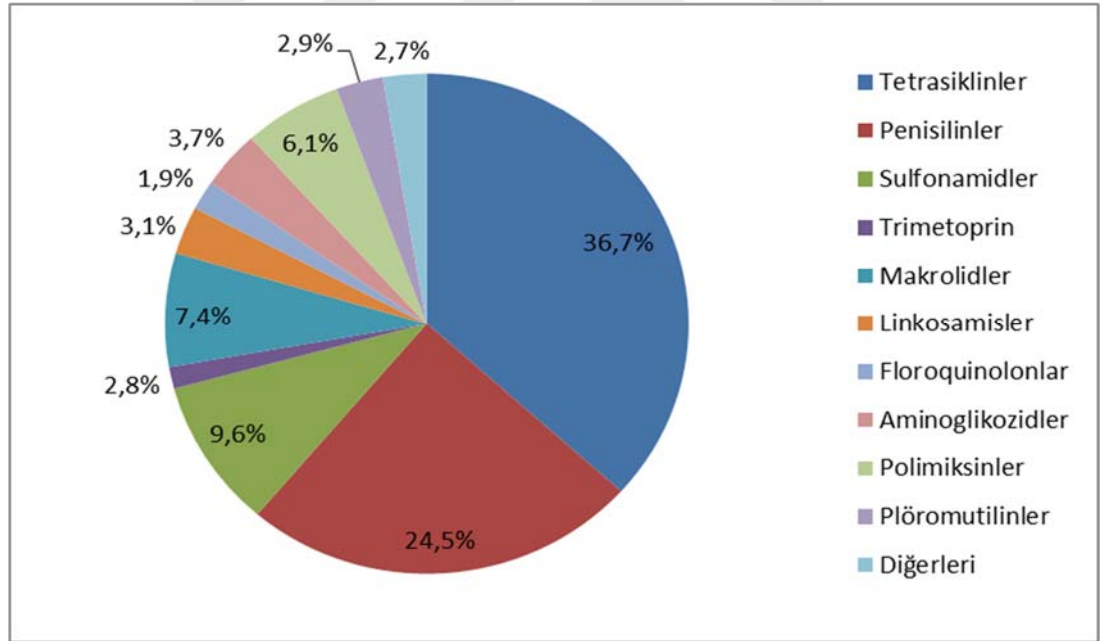
3.2. Antibiyotiklerin Kullanım Amaçları

Veteriner hekimlikte antibiyotikler, başta hasta hayvanların tedavisinde olmak üzere, hastalıklardan koruma, çevresel kaynaklı stres durumlarında ve bazı ülkelerde büyümeyi arttırıcı amaçla kullanılmaktadır. Hayvansal kökenli bakterilerde antibiyotiklere direnç, ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Bunun nedeni, hayvanlar için ruhsatlı antibiyotiklerin ülkelere göre değişmesi ve antibiyotiklerin son kullanıcıya farklı düzenlemeler ile ulaşması olarak gösterilmektedir [21]. Antibiyotiklerin hayvanlarda yoğun kullanımı, hayvandan insana bulaşabilen antibiyotiklerin, direncini arttırmakta ve bu durumun insan sağlığı için potansiyel bir tehdit olduğu değerlendirilmektedir. Özellikle çiftlik hayvanlarının üretiminde, büyütme amaçlı ve/veya düşük doz antibiyotik uygulamalarının bakterilerde antibiyotik direncini arttırmadaki potansiyel önemi, uzun bir süredir birçok otorite tarafından açıklanmaktadır [22-24].

Veteriner hekimlikte antibiyotik kullanımı, her ülkelerde uygulanan değişen mevzuatlara göre yapılmaktadır. Bu konuda en önemli farklılık, büyütme amaçlı kullanılan antibiyotiklerle ilgilidir. Büyütme amaçlı antibiyotiklerin hayvanlardaki kullanımı, Avrupa Birliği ülkelerinde 2016 yılı Ocak ayı itibarıyla yasaklanmıştır.

Ülkemizdeki uygulamalar da AB mevzuatlarına uyumludur ve büyütme amaçlı antibiyotik kullanımı AB ülkelerinde olduğu gibi aynı tarihte yasaklanmıştır. Bu grup antibiyotiklerin ülkemize ithalatı ve üretimi yapılmamaktadır ve dolayısıyla satışı da yoktur. Ülkemizde ve AB ülkelerinde bu yasaklamaya karşın, Amerika Birleşik Devletleri gibi ülkelerde büyütme amaçlı antibiyotik kullanımı yasaklanmamıştır ve hayvansal üretimde işletme tercihinine bağlı olarak kullanılabilir.

Hayvan sağlığında antibiyotikler, sindirim sisteminden (oral yolla), sistemik, meme içi ve uterus içi kullanılmaktadır. AB ülkelerinde hayvan sağlığında kullanılan antibiyotikler, çok detaylı olarak izlenmektedir ve etken maddeleri de belirtilerek Şekil 3.2’ de gösterilmiştir [25]. Bu verilerden görüldüğü üzere, AB ülkelerinde hayvan sağlığında, en çok tetrasiklin grubu (%36,7) antibiyotikler kullanılmaktadır. Bunu penisilinler (%24,5), sülfonamidler (%9,6) ve makrolidler (%7,4) izlemektedir. Ülkemizde, hayvan sağlığında kullanılan antibiyotiklerle ilgili açıklanmış veya paylaşılmış detaylı veriler bulunmamaktadır.



Şekil 3.2. Avrupa Birliği ülkelerinde hayvan sağlığında kullanılan antibiyotikler

Hayvan sağlığında kullanılan antibiyotiklerle ilgili risk değerlendirmesine göre, antibiyotikler üç grupta değerlendirilmektedir [21-24]. Bunlar;

- **Birinci grup antibiyotikler:** İnsan sağlığı için düşük veya sınırlı riske sahip olan veteriner antimikrobiyaller olarak değerlendirilir. Bu grupta, makrolidler,

penisilinler, tetrasikler sayılabilir ve bu grupların kullanılmasında, direnç durumu izlenmeli ve akılcı antibiyotik kullanımına göre tercih edilmelidir.

- **İkinci grup antibiyotikler:** İnsan sağlığı için yüksek riske sahip antibiyotiklerdir. Bunlar arasında, sefalosporinler, kinolonlar, aminoglikosidler gelir. Bu grup antibiyotiklerin kullanımında dikkatli olunması gerekir ve sadece alternatif olmadığı durumda kontrollü olarak kullanılmalıdır.

- **Üçüncü grup antibiyotikler:** Hayvan sağlığı için ruhsatlı olmayan antibiyotiklerdir. Bunlar arasında karbapenem ve glikopeptidler sayılabilir. Bu grup antibiyotikler hayvan sağlığı için ruhsatlı olmadıklarından, kullanılmaları uygun değildir. İnsan için ruhsatlı olan bu antibiyotiklerin sadece bazı pet kliniklerde kullanımına rastlanmaktadır.

3.3. Antibiyotiklerin Olumsuz Etkileri

Antibiyotikler, ilk kullanımlarından itibaren, insan ve hayvan sağlığında bakteriyel hastalıkların tedavisinde önemli katkılar sağlamışlardır. Ancak, ilk antibiyotik kullanımından bu yana, antimikrobiyal aktivitenin mekanizmasına bakılmaksızın, antibiyotiğe dirençli bakterinin ortaya çıkması kaçınılmaz olmuştur. Özellikle antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı, antibiyotik direncinin tüm dünyada endişe verici düzeylere ulaşmasına sebep olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü, antibiyotik direncini, insan sağlığı için en önemli üç tehditten biri olarak tanımlamaktadır [26]. Antibakteriyel ilaçlara karşı direnç, hem insan hem de çiftlik hayvanlarında ciddi bir sorun haline gelmiştir. Ayrıca insanların, hayvanların ve yiyeceklerin artan uluslararası hareketi yoluyla da bulaşma da olmuştur [26]. İnsanlarda ve hayvanlarda tedavi amaçlı kullanılan antibiyotik sınıfları çoğunlukla aynı olup enfeksiyona neden olanlar da dahil olmak üzere dirençli bakterilerin ortaya çıkma ve yayılma riskini arttırmıştır [28, 29]. Çiftlik hayvanları, dirençliliği insanlara ulaşabilecek potansiyel patojen kaynaklarıdır. Dünyada çiftlik hayvanlarında antibiyotik kullanımını değerlendirmek için uluslararası karşılaştırmalı çalışmalar yapmak ve gerektiğinde müdahale için öncelikli alanları belirlemek önem kazanmaktadır. Ancak, farklı ülkelerde ve farklı üretim sistemlerinde antimikrobiyal direncin nasıl oluştuğunu gözlemek için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Dünyada ilaca dirençli enfeksiyonlar artmakta ve bu sebeple ilaç direnci, giderek artan küresel bir sağlık sorunu olmaktadır. Günümüzde yılda 700 bin kişinin antibiyotik dirençli enfeksiyonlardan ötürü hayatını kaybettiği eğer yeni ve etkili

antibiyotikler geliştirilemez ve direnç gelişimi önlenemez ise 2050 yılında 10 milyon insanın antibiyotik direncinden dolayı öleceği bildirilmektedir. Bu rakamın kanser (yılda 8 milyon kişi ölmektedir) ve diyabet (1.5 milyon kişi ölmektedir) gibi hastalıklardan beklenen ölümlerden çok fazla olacağı, hatta birinci derecede ölüm nedeni olacağı tahmin edilmektedir [26]. Amerikada yapılan bir araştırma ile, antimikrobiyal direncin zararlı etkilerinin tüm dünyada hissedilir derecede arttığı, antimikrobiyal dirençli enfeksiyonların şu anda Avrupa’da ve ABD’de her yıl en az 50 bin kişinin ölümüne neden olduğu ve yüz binlerce kişinin de dünyanın çeşitli yerlerinde bundan etkilendiği, bildirilmiştir [30]. Antibiyotik dirençlilik bir yandan insan sağlığını tehdit ederken, diğer yandan da ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Araştırmacılar, direnç artışının bu hızla devam etmesinin dünyada 100 trilyon Amerikan Dolarından fazla kayıp oluşturacağını bildirmişlerdir [31].

Yapılan bir çalışmada, 2014 yılında hastanede yatan hastalarda tespit edilen yaygın bir bağırsak bakterisi olan *Escherichia Coli*’nin yaklaşık %60’ının penisilinler ile tedavi edilemeyen bakyeri formlarının olduğu ve yaklaşık %25’inin antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılan iki tipinden birine veya her ikisine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu direncin başlıca nedeninin, antibiyotiklerin hem insanlar hem de hayvanlarda aşırı kullanımından kaynaklı olduğu ifade edilmiştir [31]. Ayrıca, 2000-2014 yılları arasında kullanılan standart antibiyotik dozlarının sayısı %50 oranında artmıştır [26]. Ülkemizde 2002 yılında yapılan çok merkezli bir çalışma sonucunda, hastanede yatanların %30,6’sı en az bir antibiyotik kullanırken, bu sayı 2016 yılında %44,8 seviyesine yükselmiştir. Avrupa’da kişi başına günde kullanılan antibiyotik hesaplamasında Türkiye, 40 ülke arasında birinci sırada yer almaktadır.

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi ile Avrupa İlaç Ajansı (EMA: European Medicines Agency) yayınladıkları raporlarda, dirençli enfeksiyonlar için mevcut antibiyotiklerden daha etkili bir antibiyotik geliştirmede çok yavaş kalındığını bildirmişlerdir [32]. Giderek artan direnç sorununu çözecek yeni antibiyotikler geliştirilemezse, hali hazırdaki cerrahi girişimler, kanser tedavileri, organ nakli, prematür yeni doğan bakımı gibi tıp uygulamalarının yapılamaz hale gelmesi olası görünmektedir.

3.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Bakteriler antibiyotiklere karşı doğal dirence sahiptirler. Mikroorganizmaların doğal olarak ilaçlar için hedef alana sahip olmadığı ve dolayısıyla ilacın onları etkilemediği veya ilacın kimyasal doğasındaki ve mikrobiyal membran yapılarındaki farklılıklardan dolayı, doğal olarak antibiyotiklere karşı direnç oluştururlar. Doğal olarak duyarlı bir mikroorganizmanın ilaca göre etkilenmeme yollarını elde etmesi sonucu direnç kazanabilirler. Kromozomal genlerde meydana gelen mutasyon veya kromozom dışı (plazmid, transpozon) genetik materyalin transferleri ile de direnç kazanabilirler [33].

Antibiyotik Direncinin Moleküler Mekanizması

Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç göstermesi aşağıdaki mekanizmalardan biri ile gerçekleşir [34] ve Çizelge 3.2’de bu mekanizmalar verilmiştir.

Çizelge 3.2. Antibiyotiklerin direnç mekanizmaları

ANTİBİYOTİK SINIFI	ÖRNEKLER	HEDEF	DİRENÇ ŞEKLİ
β-Laktamazlar	Penisilinler, Sefalosporinler	Peptidoglikan biyosentezi	Hidroliz, efflux, değiştirilmiş hedef
Aminoglikozitler	Gentamisin, streptomisin, spektinomisin	Translasyon	Fosforilasyon, asetilasyon, nükleotidilasyon, efflux, değiştirilmiş hedef
Glikopeptidler	Vankomisin, Teikoplanin	Peptidoglikan biyosentezi	Peptidoglikan biyosentezini yeniden programlamak
Tetrasiklinler	Minosiklin, tigesiklin	Translasyon	Mono oksijenasyon, efflux, değiştirilmiş hedef
Makrolidler	Eritromisin, azitromisin	Translasyon	Hidroliz, glikozilasyon, fosforilasyon, efflux, değiştirilmiş hedef
Linkozamidler	Klindamisin	Translasyon	Nükleotidilasyon, efflux, değiştirilmiş hedef
Streptograminler	Sinersid	Translasyon	C-0 liyaz (B tipi streptograminler), asetilasyon (A tipi streptograminler), efflux, değişmiş hedef
Oksazolidinonlar	Linezolid	Translasyon	Efflux, değişmiş hedef
Fenikoller	Kloramfenikol	Translasyon	asetilasyon, efflux, değişmiş hedef
Kinolonlar	Siprofloksasin	DNA replikasyonu	asetilasyon, efflux, değişmiş hedef
Pirimidinler	Trimetoprim	C1 metabolizması	Efflux, değişmiş hedef
Sulfonamidler	Sulfametoksazol	C1 metabolizması	Efflux, değişmiş hedef
Rifamisinler	Rifampin	Transkripsiyon	ADP-ribosilasyon, efflux, değişmiş hedef
Lipopeptidler	Daptomisin	Hücre zarı	Değişmiş hedef

- Hedef genlerden birinde nokta mutasyonlarının gelişimi (mikro evrimsel değişiklik) ile direnç geliştirebilirler.
- Makro evrimsel değişiklikler ile bakteriler direnç oluşturabilirler. Bu direnç mekanizması, plazmidleri veya transpozonları taşıyan antibiyotik direncinin kazanılmasındaki genlerin, yeniden düzenlenmesi ile oluşur.
- DNA’yı ekzojen bir kaynaktan edinmek .

3.5. Veteriner İlaçlarının Analizi ve Zenginleştirme Yöntemleri

Çevresel sular, atık su, toprak, et, süt ve gübre gibi farklı matrislerde veteriner ilaçların analiziyle ilgili yapılan çalışmalarda matris etkisinin giderilmesi ve zenginleştirme adımı için katı faz ekstraksiyonu (SPE) yaygın olarak kullanılmaktadır. Katı faz ekstraksiyonu için özellikle C₁₈ ve hidrofilik-liyofilik balans (HLB) kolonları tercih edilmektedir. Örnek temizleme ve zenginleştirme adımında katı faz ekstraksiyonunun yanı sıra sıvı sıvı ekstraksiyonu, sıvı faz ekstraksiyonu, matris katı faz dispersiyonu gibi ekstraksiyon yöntemleri de kullanılmaktadır [35]. İlaçların ayrılması ve dedeksiyonu için geleneksel HPC-DAD, HPLC-UV ve HPLC-FLD yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin yanı sıra LC-MS/MS veya GS-MS gibi modern analiz yöntemleri de kullanılmaktadır [36]. Farklı matrislerde ilaç kalıntılarının analizi için kullanılan analitik yöntemler Çizelge 3.3.'de verilmiştir [37-43].

Çizelge 3.3. İlaç kalıntılarının analizi için kullanılan analitik yöntemler

Analitler	Matris	Örnek Hazırlama	Dedeksiyon
Sülfanamidler	Karidesler	LPE/SEC-SPE	UV
B-Laktamlar	Süt	LLE/HLB-SPE	LC-MS
Penisilinler	Böbrek, karaciğer	LPE/C ₁₈ -SPE/QMA-SPE	UV
Makrolidler	Kas	LPE/SCX-SPE	DAD UV
Tetrasiklinler	Süt, yumurta	LPE/SPE	LC-MS
Sülfanamidler	Gübre	LLE	LC-MS
Oksitetrasiklin	Doku	LPE/HLB-SPE	IT-MS ⁿ

3.5.1. Katı faz ekstraksiyonu (SPE)

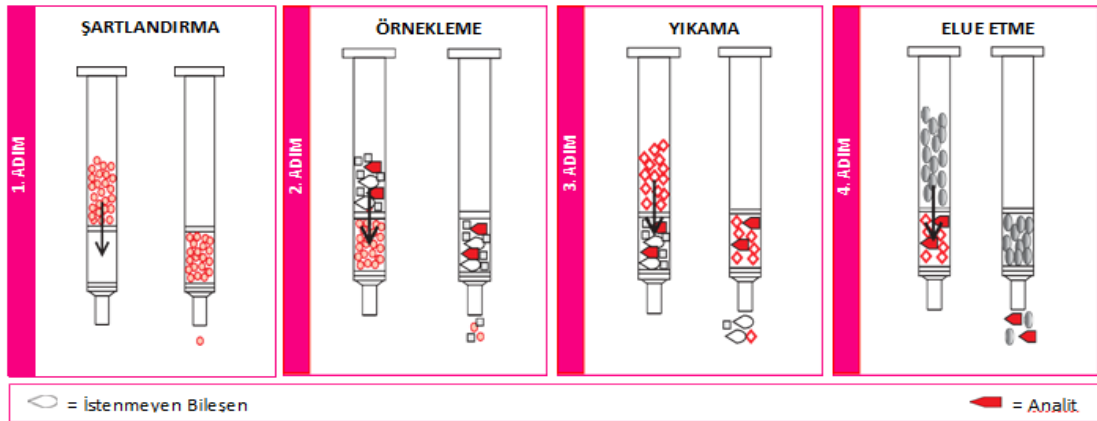
Katı faz ekstraksiyonu yöntemi, küçük ve genellikle tek kullanımlık ekstraksiyon kolon veya plakalarına çeşitli tutucu maddelerin doldurulması ve sıvı örneklerini istenmeyen bileşenlerden ayırma (temizleme), yoğunlaştırma ve sonraki analiz işlemleri için örnek matris yapısının değiştirilmesi, amacı ile kullanılmaktadır. Sıvı örneğin kolondan geçirilmesi, yer çekimi ile gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybını engellemek için, Şekil 3.3' daki sisteme vakum pompası takılarak da yapılabilir [44].



Şekil 3.3. Vakum manifoldu

Özellikle yüksek geri kazanımlara sahip olması, daha saf matriksler elde edilebilmesi ve çok sayıda örneğin kısa zamanda işlenmesine imkan tanınması nedeniyle, hemen hemen bütün ilaç ve benzeri maddelerin analizinde SPE yaygın olarak kullanılmaktadır [45].

SPE metodunda kolondan geçirilme sırasında örnek molekülleri ile tutucu madde arasında kimyasal bir etkileşim oluşur. Bu etkileşimden faydalanan maddelerin ayrılma işlemi Şekil 3.4’teki gibi gerçekleşmektedir. Birinci aşamada, analiz edilecek bileşik tutucu maddeye bağlanarak kolon içinde tutulurken, çözelti ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi bir etkileşime girmezler. Daha sonra istenmeyen bileşenler uygun yıkama çözeltisi ile uzaklaştırılır ve analiz edilecek bileşen tutucu maddeden uygun bir çözelti yardımıyla çözdürülerek alınır. Bu yüzden kullanılacak kimyasal çözücüler ona göre seçilmelidir [46].



Şekil 3.4. Katı faz ekstraksiyonu yöntemi ile maddelerin ayrılma şeması

Katı faz ekstraksiyonundaki katı materyaller

Bir SPE yöntemi geliştirilirken göz önünde bulundurulması gereken parametrelerden bazıları; sorbent tipi, sorbent miktarı, kartuş aktivasyonu için numune hacmi ve analitlerin elüsyonudur. Analit özellikleri, matriks yapısı ve girişimleri benzer şekilde sorbent seçiminde, dikkate alınmalıdır.

Literatürlerde, Oasis HLB ve C₁₈ katı fazlarının, en yaygın kullanılan sorbentler olduğunu gösteren ve özellikle gıdalarda tetrasiklin kalıntılarının tespiti için SPE tekniğinin kullanımını öneren, bir çok araştırma bulunmaktadır. HLB (polystyrene-divinylbenzene-*N*-vinyl pyrrolidone-*ter*-polymer), suda ıslanabilir olmasından dolayı, daha yüksek tutma kabiliyeti sağlayan, evrensel bir hidrofilik-lipofilik dengeli polimerik ters faz sorbentidir. Hidrofilik N-vinilpirolidon ve lipofilik divinilbenzen gibi iki monomerin belirli bir oranından oluşur [47, 48]. Oasis HLB polimerik kartuşları, HPLC-DAD ile süt örneklerinden tetrasiklin, Sülfonamid ve kloramfenikol grubu ilaçların ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Tetrasiklinlerden iyi bir geri kazanım sağlamak için, McIlvaine tamponu ve metanollü trikloroasetik asit ilavesiyle proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. LC-MS/MS tekniği, sodyum süksinat tamponu ilave edildikten sonra Oasis HLB kartuşlar kullanılarak temizleme işlemi ile yumurtalarda tetrasiklinler dahil veteriner ilaç kalıntılarını belirlemek için kullanılmıştır. Bu çalışmada tetrasiklinlerin ekstraksiyon etkinliği, Oasis HLB kartuşlarının kullanımından etkilenmiştir.

Oasis HLB kartuşların kullanımı, süt ve yumurta gibi gıda örneklerinden tetrasiklinlerin deriştirilmesi ve ayrılması için çok tavsiye edilir. Oasis HLB kartuşları, kararlı pH değerleri, geniş bir yelpazede çözücü kullanımı, polar bileşiklerin çok iyi alıkonması ve bağlı hidrofobik alıkonma kapasitesi nedeniyle C₁₈ gibi silika bazlı SPE sorbentlerinden daha fazla kullanılmıştır [47, 48].

C₁₈ sorbenti, düzensiz şekilli silika moleküllerine bağlanmış oktadesilsilana monomeriden meydana gelir. Bu sorbent apolar özellik gösterir, seçici değildir ve hidrofilik bileşiklerin ters faz bağlanmasını sağlar. Genel olarak, bütün bu şırınga tipi kartuşlar, vakum monifodları ve otomatik SPE cihazları ile kullanılmak için tasarlanmışlardır Son 20 yılda tetrasiklin analizlerine ilişkin Oasis HLB kartuşların kullanımına yer veren literatür sayısı, C₁₈ kartuşların kullanıldığı literatürlerden çok daha fazladır [47, 48].

Otomatik (On-line) SPE

Son yıllarda on-line ve otomatik SPE büyük bir önem kazanmıştır ve kimyasal analizler için önerilmiştir. Otomatik SPE sistemleri, eluat ölçümü ile on-line SPE ve doğrudan kolon üstü ölçüm ile SPE'yi içerir. Genel olarak analit katı destek tarafından tutulur ve uygun bir çözücüyle elüe edildikten sonra, elüsyon çözeltisi yada doğrudan katı destek kullanılarak ölçülebilir. Katı destek kullanılarak yapılan ölçümünün konfigürasyonu, analitik kimyada çok yaygın olmasada, elüsyon işleminde yer alan seyreltme faktörlerini önlediğinden dolayı iyi dedeksiyon limitleri sağlar. Diğer yandan, hayvansal gıdalarda tetrasiklinlerin belirlenmesi için kullanılan çoğu SPE yöntemleri, HPLC sistemlerinin, spektrofotometrik veya kemilüminesans dedektörlerinin biri ile birleştirilmiş SPE kolonlarından oluşur [48, 49].

Bugüne kadar, gıdalarda tetrasiklinlerin analizi için en sık kullanılan on-line biçimi, HPLC ile birleştirilmiş SPE'dir. PLRP-S ve C₁₈ kolonlar kullanılarak, HPLC ile birleştirilmiş on-line SPE ile yumurta ve bal numunelerinde tetrasiklinler belirlenmiştir. Ek olarak, HPLC-UV ile birleştirilmiş MIP'e bağlı on-line SPE ile yumurta, süt ve süt tozu numunelerinde tetrasiklin antibiyotik kalıntıları tespit edilmiştir. Test edilen bütün sorbentler, hedef matrikslerde kalıntıların tespiti için yeterli hassasiyet göstermiştir ve her durumda iyi geri kazanımlar elde edilmiştir.

Sıvı kromatografisi ayırımı ve on-line SPE kullanılarak örnek deriştirme işlemlerini birleştiren otomasyon tekniklerin, kullanımına yönelik bir eğilim olmuştur. Birleştirme teknikleri, kromatografik yöntemin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini artırır. Ayrıca, bütün örnek ekstraktının analitik kolona aktarılmasından dolayı, on-line SPE-HPLC yönteminin duyarlılığı çok daha iyidir. Geleneksel off-line tekniklerde, ekstraktın sadece küçük bir kısmı enjekte edilir.

On-line SPE-HPLC yöntemlerinden ayrı olarak, balık numunelerinde de MIP-SPE ile kemilüminesans akış enjeksiyon analizi (FIA) birleştirilerek tetrasiklinler belirlenmiştir. Burada, politetrafloroetilen (PTFE) tüpleri MIP ile doludur ve FIA sistemi enjeksiyon valfi örnekleme lobuna bağlıdır. Kemilüminesans yoğunluğunun, numunenin uygulama aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur. Bu yöntemlerin kombinasyonu ile, gıdalarda tetrasiklin kalıntılarını belirlenmesi için on-line ekstraksiyon yapabilen yeni bir akış metodu geliştirilmiştir.

Önemli bir şekilde on-line SPE, numunenin ön işlem süresini azaltmak ve bu nedenle örnek verimini arttırmak gibi çeşitli avantajlar sunduğu için tavsiye edilir [48, 49].

3.5.2. Solvent ekstraksiyonu (SE)

Solvent ekstraksiyonu, hayvansal ürünlerdeki farklı veteriner ilaç sınıflarının eş zamanlı analizinde sıklıkla tercih edilen, bir saflaştırma yöntemidir. Yöntem, geleneksel sıvı sıvı ekstraksiyonu ve homojenize dokuların (kas karaciğer ve böbrek gibi) sıvı ekstraksiyonunu içerir.

En iyi sonuçları elde etmek için ekstraksiyon çözücüsü, hedef bileşiklerin etkili bir şekilde ekstraksiyonunun elde edileceği şekilde seçilmelidir. Fakat çözücünün seçimi sadece hedef bileşiklere değil aynı zamanda matriksede bağlıdır [50].

Tetrasiklinlerin proteinlere kolay bağlanmasından dolayı, gıda örneklerinden bu bileşiklerin ekstraksiyonu söz konusu olduğunda, güçlü asitlerin ve çöktürücü maddelerin eklenmesi özellikle tavsiye edilir. Deproteinizasyon, karmaşık matrikslerden antibiyotikleri ekstrakte etmek için yaygın olarak kullanılan basit bir solvent ekstraksiyonu (SE) prosedürüdür. Bu off-line prosedür, ilgilenilen analitlerden, iyi bir geri kazanım elde etmek için matriks etkisinin kaldırılmasında, sıklıkla kullanılır.

Süt ve yumurta numunelerinde proteinlerin çökmesi için, trikloroasetik asit, trifloroasetik asit, buzlu asetik asit, süksinik asit, sitrik asit, formik asit ve perklorik asit gibi asidik bileşikler yada bu solventlerin kombinasyonunun yanı sıra, asetonitril, metanol yada aseton içeren organik çözücülerin kullanılması gerekir. Diğer araştırmalarda, bu örneklerin temizlenmesi için deproteinize edici ajanlar olarak McIlvaine-EDTA, sodyum sitrat, oksalat, sodyum süksinat ve fosfat tamponu kullanmışlardır. Bu tür işlemlerin ardından bazı örnek temizleme yöntemleri de yapılır.

Spektrofotometre ile tetrasiklin kalıntılarının belirlenmesi için, daha fazla temizleme yöntemi olmadan % 1'lik trikloroasetik asit çözeltisi ile süt örneklerinin deproteinizasyonunun yeterli olduğu belirtilmiştir. Süt matriksinin karmaşıklığı göz önüne alındığında, çalışmada değerlendirilen asit muamelesi ile yeterli geri kazanımlar (71.0-82.0) sağlanmıştır. Ayrıca araştırmacılar, karmaşık örnek işlemleri

ve pahalı ekipmanlar gerektiren diğer çalışmalara kıyasla nispeten daha düşük dedeksiyon limiti elde edilmiştir.

Sıvı sıvı ekstraksiyonu (LLE), karışmayan farklı iki sıvı fazda (genellikle su ve bir organik çözücü) analitlerin farklı dağılma oranına dayalı bir ayırma işlemidir. Süreç partitasyon dengesiyle kontrol edilir. Analitlerin ekstraksiyonu, sıvı bir fazdan ikinci bir faza taşınmasına bağlıdır ve bu fazlar arasındaki çözünürlük farkı ile elde edilir. LLE, özellikle sulu örnekler gibi çok çeşitli matrikslerden, bir çok organik bileşiklerin ekstraksiyonu için en yaygın kullanılan ekstraksiyon tekniklerinden biridir.

Süt numunelerindeki tetrasiklin antibiyotikleri, diklorometan ile sıvı sıvı ekstraksiyonunun ardından, trikloroasetik asit ile protein çökeltmesine dayalı bir temizleme ve ekstraksiyon yöntemi kullanılarak, kapiler elektroforez ile belirlenmiştir. Kalıntıların belirlenmesi için yöntem yeterli hassasiyet göstermiştir ve elde edilen geri kazanımlar izin verilen limitler dahilindedir [48].

Süzme işlemi olarak bilinen katı sıvı ekstraksiyonu (SLE), LLE'ninkine benzer prensiplere sahip çözücü ekstraksiyonunda kullanılan başka bir tekniktir. Tek fark, SLE analitlerinin katı örneklerden ekstrakte edilmesidir. SLE işlemi, çözünen maddelerin yerdeğiştirmesi yoluyla meydana gelir ve analitler bir çözücü kullanılarak ekstrakte edilir. Fazlar arasındaki etkileşime bağlı olarak, analitler katı fazdan sıvı faza difüze olabilir ve buda ana bileşenlerin ayrılmasına yol açar.

Genel olarak yukarıda tarif edilen teknikler, önemli ölçüde çevre kirliliğine neden olan çok miktarda çözücünün kullanılmasına neden olur. Çevre üzerindeki olumsuz etkilerinin yanı sıra, bu teknikler büyük ölçüde pahalı ve zahmetlidir. Bu durum göz önüne alındığında, daha basit ve çevre dostu ekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesine ve uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır [48].

3.5.3. Ultrases destekli ekstraksiyon (UAE)

Ultrases destekli ekstraksiyon tekniği, ekstraksiyon verimliliğini arttırmak için ultrases yardımıyla solvent ekstraksiyonu gerektiren bir yöntemdir. Teknik, ekstraksiyon işlemi sırasında numunenin sallanması ve ısıtılmasından oluşur. Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) gibi, ultrases destekli ekstraksiyonda

soxhlet ekstraksiyonuna alternatif olarak geliştirilmiştir. Kullanılan solvent miktarının az olması ve nispeten daha hızlı olması, UAE'yi avantajlı yapmaktadır.

Ultrasonikasyon işlemlerinde maksimum ekstraksiyon verimi ve istenen seçiciliği elde etmek için, dikkat edilmesi gereken bir nokta, pH modifikasyonu olsun olmasın su ile solvent karışımının ya da solvent tipinin uygun bir şekilde seçilmesidir. Diğer tekniklere kıyasla ultrasonikasyon daha avantajlıdır. Çünkü: teknik oda sıcaklığında uygulanabilir ve bu da termobil bileşiklerin belirlenmesini sağlar. Ek olarak, birden fazla ekstraksiyon işlemini aynı anda yapabilir ve pahalı yada özel bir cihaz gerektirmez. Bununla birlikte, bu tekniğin seçiciliği ve zenginleştirme özellikleri sınırlı olduğundan, gıdalardaki kalıntı miktarlarını belirlemek için genellikle daha fazla numune hazırlama adımları yapılması gereklidir. Bu nedenle, UAE genellikle ekstraksiyon verimliliğini arttırmayı amaçlayan ek bir ekstraksiyon işlemi olarak diğer temizleme veya önderiştirme metodolojileri ile birleştirilir.

Tereyağı, balık dokusu, süt tozu ve yumurtalardan tetrasiklinlerin ekstraksiyonu için, % 0,1 (w/v) etilendiaminteraasetik asit (EDTA)- asetonitril-metanol (1:1:1, v/v) sulu çözeltisinde % 0,1 formik asit ile basit bir SLE prosedürü kullanılmıştır. Bununla birlikte, LC-MS/MS ile % 72-102 aralığında geri kazanım sağlamak için ilave bir UAE adımı gereklidir. Yöntem, matriks ile eşleşen kalibrasyon eğrileri kullanılarak valide edilmiştir ve belirlenen katsayı değeri matriks etkisinin olmadığını göstermiştir [48].

Ultrases destekli matriks katı faz dispersiyonu, HPLC-DAD kullanılarak beş tane tetrasiklinin belirlenmesi için uygulanmıştır. Bu durum süt matrikslerinden tetrasiklin kalıntılarını temizlemek ve deriştirmek için UAE ile birleştirilmiş matriks katı faz dispersiyonu uygulamasına yönelik ilk girişimdir. İlginç bir şekilde, yapılan işlemle yüksek bir ekstraksiyon verimi ortaya konulmuştur. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu, yumurta örneklerinden tetrasiklinleri temizlemek için UAE ile birleştirilmiştir ve akış analizi kullanılarak spektrofotometrik tayini yapılmıştır. İlave yapılan ultrasonikasyon adımı, metodun ekstraksiyon kapasitesini yaklaşık olarak % 6 arttırmıştır. Diğer çalışmalar arasında bu çalışma, birkaç ekstraksiyon işlemi ile birleştirilerek farklı gıda örneklerinde tetrasiklinlerin geri kazanımlarını arttırmak için çok yönlü UAE'nin avantajlarını göstermektedir [48].

3.5.4. QuEChERS yaklaşımı (Hızlı, Kolay, Hesaplı, Etkili, Sağlam ve Güvenilir örnek hazırlama)

LC-MS/MS ve GC/MS cihazları ile kalıntı analizlerinde, LOD değerlerinden geri kazanım değerlerine kadar bir çok kritik parametre, numune hazırlama prosedürüne bağlıdır. 2003 yılında USDA araştırmacılarından Lehotay ve arkadaşlarının geliştirdiği QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) metodu ile laboratuvarların kazandığı pratik numune hazırlığı prosedürü, özellikle yaygın olarak kullanılan AOAC 2007.01 metodu ile güncellenerek tüm laboratuvarlarda kullanılmaya başlanmıştır. QuEChERS yaklaşımının başlıca avantajları şunlardır:

- Daha az organik solvent kullanımı sağlar. Bu sayede kullanıcı ve çevre dostudur.
- Klorlu atık oluşturmaz, çevreye daha duyarlıdır.
- Yönetmeliğe uygun geri kazanım değerleri elde edilir.
- Daha az işlem basamağı ile hızlı analiz etme imkanı sağlar.
- Düşük analiz maliyeti sağlar

QuEChERS yöntemi, sebze ve meyvelerde pestisit kalıntılarının analizi için bir grup araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. Gelişimi sırasında, adımların sadeliği ve esnekliği göz önüne alındığında, herhangi bir laboratuvarda uygulanabilecek dinamik bir prosedürün elde edilmesine büyük önem verilmiştir. İlk QuEChERS yönteminde asetonitril ile başlangıç ekstraksiyonu yapılır, ardından sıvı-sıvı bölmesi magnezyum sülfat ($MgSO_4$) ve sodyum klorür ($NaCl$) ilavesiyle düzenlenir. Bununla birlikte, ilave temizleme yöntemleri atık suyun temizlenmesi ve analitlerin izolasyonu için yaygın olarak kullanılmıştır [48].

Hayvansal ürünlerdeki farklı sınıflardan veteriner ilaçların analizinde sıkça uygulanan üçüncü bir temizleme tekniği, yüksek oranda tuz içeriği kullanılarak organik solvent ve faz ayırımı ile ekstraksiyonu içeren QuEChERS yaklaşımıdır. Bu prosedür QuEChERS olarak kabul edilir ve ilk pestisit analizi için uygulanmıştır. Sonraki yıllarda QuEChERS yaklaşımı, hayvansal ürünlerdeki farklı sınıftan veteriner ilaçların analizinde de uygulanmıştır [50].

Bu yöntemde, bir çok kalıntı analizinde yaygın olarak gözlemlenen tuzlanma etkisini arttırmak için tuzlar ilave edilir. Partisyon adımıyla kullanılan çözücünün

yapısına bağılı olarak, ortamdaki tuzların varlığı sulu fazdaki bileşiklerin çözünürlüğünü azalttığından dolayı, polar analitler için iyi geri kazanım yüzdeleri elde edilebilir. Bu aşamada asetonitril ile ekstraksiyonun çok uygun olduğu görülmüştür. Çünkü örnek ekstraktını seyreltmez, organik ve sulu fazların ayrılmasını sağlar. Ayrıca son ekstraktın düşük polariteli olmasını sağlar. Kurulduğu günden bu yana yöntem, farklı matrikslerden farklı bileşiklerin ekstraksiyonunu sağlayacak şekilde modifiye edilmiş ve geliştirilmiştir.

UHPLC-MS/MS ile sütteki veteriner ilaçların belirlenmesi için örnek hazırlama aşamasında modifiye edilmiş bir QuEChERS yöntemi kullanılmıştır. Doksisiklin dahil ilaçların ekstraksiyonu daha fazla bir ekstraksiyon aşamasına asetonitril ile basit bir sıvı ekstraksiyonuna dayandırılmıştır. Geleneksel yöntemlerin aksine, ekstraksiyon işlemi sırasında asetik asit, Na₂EDTA ve sodyum asetat eklenmiştir. Bu modifikasyon türüne QuEChERS tamponlama denilir. UHPLC-MS/MS kullanımı analiz süresini azaltır, hassasiyeti ve çözünürlüğü artırır. Bu teknik, birkaç dakika içerisinde farklı sınıflardan veteriner ilaçların tayin ve tespitine olanak sağlar [48].

QuEChERS yönteminin farklı modifikasyonları ile LC-MS/MS tekniğinin kombinasyonları kullanılarak, yumurta numunelerinde tetrasiklin veya diğer veteriner ilaç kalıntılarının eş zamanlı analizlerini yapmışlardır. Literatürlerde bildirilen bir çalışmada, sekiz farklı örnek temizleme şemasının değerlendirilmesinin ardından ekstraksiyon çözeltisi olarak EDTA içeren sulu asetonitril-formik asit çözeltisi kullanılmıştır. Bugüne kadar, tetrasiklinler için zirkonya kaplı silika bazlı HybridSPE kartuşları kullanılarak en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Yinede %80'in üzerinde geri kazanımlar elde etmek için dispersif sorbentlerle ilave bir temizleme işleminin yapılması gerekir. Son adım numunenin hazırlanması için gereken süreyi uzatmıştır fakat daha iyi geri kazanımlar elde edilmiştir. Başka araştırmacılarda, ekstraksiyon çözeltisi olarak sulu metanol-asetik asit karışımını optimize etmişlerdir. Yumurta ekstraktlarından lipitleri ve apolar maddeleri çıkarmak için iki farklı temizleme yöntemini test etmişlerdir. Yöntemlerden birinde silika C₁₈ kullanılan dispersif SPE, diğerinde ise n-heksan ile sıvı sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu gibi örnek hazırlama basamaklarının uygulanması matriks etkisini azaltmıştır.

HPLC-DAD kullanılarak su ve süt matrikslerinden tetrasiklinlerin analizi için modifiye edilmiş bir QuEChERS yönteminin uygulanmasının ardından örnek

temizleme yöntemi olarakta dispersif katı faz mikroekstraksiyonu (DSPME) kullanılmıştır. Hazırlanan süt örnekleri, ekstraksiyon karışımına % 70-72 perklorik asit ilave edilerek modifiye edilmiştir. Ek olarak, analit deorpsiyonu asetonitril:perklorik, asit:su karışımı kullanılarak elde edilirken ortamın alkalileşmesini sağlamak için % 14 NH₄OH çözeltisi eklenmiştir [48, 50].

QuEChERS gibi teknikler ile tetrasiklinlerin ekstraksiyonu için, Mg²⁺ ve Ca²⁺ gibi metal iyonlar ile bu bileşiklerin şelatlanmasını önlemek için ekstraksiyon karışımına McIlvaine ya da EDTA tamponları eklenir. EDTA, analitlerin ekstraksiyonunu kolaylaştıran bir şelatlaştırma ajanı olarak görev yapar ve böylece yüksek geri kazanımların elde edilmesini sağlar. Bu bağlamda, EDTA ekstraksiyon tamponu olarak ve birden fazla örnek hazırlama aşamasında kullanılır. QuEChERS ekstraksiyonu rutin laboratuarda kolayca uygulanabilen hızlı ve basit bir yöntemdir [48, 50].

3.5.5. Matriks katı faz dispersiyonu (MSPD)

Matriks katı faz dispersiyonu, çeşitli katı, yarı katı ya da oldukça viskoz analitlerin ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan bir örnek hazırlama yöntemidir. MSPD, daha hızlı bir genel analiz süresine ve az miktarda solvent kullanımına neden olan, tek adımda ekstraksiyon ve temizleme sağlayan bir yöntemdir [51].

Bu yöntem, tam bir bozulma sağlamak için katı destek üzerine matriksin mekanik olarak bağlanmasını, örnek matriksin katı destek bağlı bir faz ile örnek matriksin etkileşimine ve daha sonra uygun elüsyon çözeltisi kullanılarak hedef analitlerin ekstraksiyonuna olanak sağlar.

Son yıllarda, gıda maddelerinden antibiyotiklerin ekstraksiyonu için az sayıda MSPD yöntemi kullanılmıştır. Sütteki antibiyotiklerin eş zamanlı belirlenmesi için bir matriks katı faz dispersiyonu-kılcal elektroforezi (MSPD-CE) yöntemi geliştirilmiştir. Önerilen bu MSPD yönteminin örneklerin temizlenmesinde basit ve etkili olduğu kanıtlanmıştır. Matriks katı faz dispersiyonunda, C₁₈ zincirlerinin bağlı olduğu silika gibi birkaç katı destek maddesinde sorbent olarak kullanılmıştır. C₁₈ zincirlerinin bağlı olduğu silika destek maddesi ile yapılan çalışmalarda yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir [48].

3.5.6. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE)

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu; hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu (ASE), basınçlı akışkan ekstraksiyonu (PFE), basınçlı sıcak solvent ekstraksiyonu (PHSE), subkritik solvent ekstraksiyonu (SSE) ve sıcak H₂O ekstraksiyonu (HWE) gibi çeşitli isimler almaktadır. HWE, düşük maliyet ve toksisiteye neden olduğundan ve bertaraf edilmesi kolay olduğu için kalıntı analizlerinde giderek daha fazla kullanılmaktadır. Oda sıcaklığı ve basıncında H₂O polar bir çözücüdür, fakat sıcaklık ve basınç artarsa polarite önemli ölçüde azalır ve bu yüzden düşük ve orta polariteli analitleri çıkarmak için H₂O kullanılabilir [50].

PLE, katı örneklerden analitleri hızlı ve etkili bir şekilde ekstrakte etmek için kritik noktalara ulaşmayan sıcaklık ve basınçta geleneksel solventler kullanılarak yapılır. Genel olarak katı bir numune paslanmaz çelik bir ekstraksiyon hücresine doldurulur. Yüksek sıcaklık (40-200 °C) ve basınç (500-3000 psi) koşullarında kısa bir süre içerisinde uygun bir çözücü ile ekstrakte edilmiştir. Son olarak, numune ekstraktı sıkıştırılmış gazın yardımı ile bir toplama şişesine alınır. Atmosferik kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklarda solventlerin kullanılması analitlerin çözünürlüğünü artırır. Dahası analitin kütle transfer özelliklerini de artırır ve buda numunenin daha iyi ıslanması, daha iyi solvent penetrasyonu ve daha yüksek difüzyon oranı sağladığından dolayı ekstraksiyon verimini artırır.

Yapılan çalışmanın birinde, yumurta numunelerinde tetrasiklin kalıntılarının analizi için PLE ile yöntemi ile ekstraksiyon işlemi yapılmıştır ve UHPLC-MS ile analizlenmiştir. Tetrasiklinler 70°C’ de birebir oranında süksinik asit tamponu (pH=6.0) ve asetonitril karışımı kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise yumurta numunelerinden tetrasiklin kalıntılarının analizi için PLE ile yöntemi ile ekstraksiyon işlemi yapılmıştır ve HPLC-UV ile analizlenmiştir. Ekstraksiyon prosedürü için yüksek sıcaklıkta (60°C) ve basınçta (65 bar) ayarlanan bir triklorasetik asit-metanol karışımı kullanılmıştır. Her iki yöntemde hedeflenen amaca ulaşmada etkiliyken, her birinden elde edilen tayin limiti ve geri kazanım değerlerinin sınırları göz önüne alındığında ikinci çalışmada daha iyi sonuçların elde edildiği görülmektedir. HPLC-MS/MS tekniği, HPLC-UV’ye kıyasla nispeten daha hassas ve spesifik olduğundan dolayı birinci yöntemin daha iyi sonuçlar vermesi beklenmekteydi. Fakat ikinci yöntemde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç

olarak ikinci yöntemde birinci yönteme göre daha iyi bir PLE prosedürünün ortaya konulduğu gözlemlenmiştir [48, 49].

3.5.7. Mikro ekstraksiyon teknikleri

Mikroekstraksiyon teknikleri, klasik örnek hazırlama tekniklerindeki otomasyon zorluğu, fazla miktarda örnek ve organik sıvının kullanılması, karmaşık ve zaman alıcı olması, gibi sorunları bertaraf etmek için geliştirilmiştir [48].

Katı faz mikroekstraksiyonu (SPME)

Katı faz mikroekstraksiyonu solventsiz bir numune hazırlama tekniğidir ve geleneksel SPE tekniğinin minyatürleştirilmesinden oluşmuştur. SPME’de analitler, uygun bir sabit faz ile kaplanmış silika lifi yüzeyine sorbentlenir. Bu yöntem partitasyon dengesiyle kontrol edilir ve katı, sıvı, gaz halindeki örneklerle uygulanabilir. Ekstraksiyonun maksimum hassasiyeti denge noktasında elde edilirken, iyi sonuçlar almak için bu noktaya ulaşmak gerekli değildir. Böylece, ekstraksiyonlar belirli bir süre içerisinde gerçekleşir.

SPME iki temel adımda gerçekleşir. Birinci adım, sorbent tabakası ve örnek matriksi arasındaki analitin dağılım dengesini içerir. Bu adım, ayırma için analitler uygun mobil faza desorplanmasıyla gerçekleşir ve genellikle GC yada HPLC ile yapılır. SPME-GC analizinde, analitler termal olarak kolona desorplanır ve buda genellikle uçucu ve termal olarak kararlı bileşiklerle sınırlıdır. Ayrıca, bazı uygulamalar için örnek matriksin türevlendirilmesi gereklidir. SPME-GC analizleri yaygın olarak, bitki ekstraktlarında, gıdalarda, çevresel ve biyolojik örneklerde metabolitlerin analizi için uygulanır. SPME-HPLC analizinde ise desorpsiyon, statik veya dinamik bir mod kullanılarak uygun bir ara yüzde gerçekleşir. Desorpsiyon, bir organik çözücü veya mobil faz vasıtasıyla gerçekleştirilir. Yüksek sıcaklıktaki termal desorpsiyon, polimerlerin bozulmasına ve uçucu olmayan bileşiklerin tamamen desorplanmamasına neden olur. Sonuç olarak SPME cihazları genellikle LC otomasyonu için daha uygundur [48].

- ***Dispersif katı faz mikroekstraksiyonu (DSPME):***

Dispersif katı faz mikroekstraksiyonu, SPME’ninkine benzer bir fikirle geliştirilmiştir ve karıştırma çubuğu sorptif ekstraksiyon (SBSE) yöntemine dayanır. Bu ekstraksiyonda, analitlerin ekstraksiyonu ve zenginleştirilmesi, örnek çözeltisine sadece az miktarda dispersif katı sorbent ilave edilmesiyle gerçekleştirilir.

Ekstraksiyondan sonra alıkonan analitleri içeren çözücüler santrifüjlenir ve filtrelendir. Daha sonra analit desorpsiyonu için az miktarda bir çözücü ile yıkanır ve kurutularak sıvının fazlası atılır. Bu tür bir işlemde, hedef analitler adsorbanlarla daha kolay etkileşime girer ve bu nedenle de elde edilen adsorpsiyon kapasiteleride, geleneksel SPE'den daha yüksektir. Keşfedildiğinden beri DSPME, gıda analizlerinde çok az uygulanmış olmasına rağmen gelecek vadede bir örnek hazırlama tekniği olarak kabul edilir [48, 49].

Sıvı faz mikroekstraksiyonu (LPME)

Sıvı faz mikroekstraksiyonu, analitik ekstraksiyonlar için küçük hacimli sıvılara uygulanma ihtiyacından doğmuştur yani geleneksel sıvı sıvı ekstraksiyonunun minyatür bir uygulamasıdır. Bu yöntem, az miktarda uygun bir çözücü ile analitleri içeren sulu bir faz arasındaki dağılımına dayanır. Bu alandaki ilk araştırma 1996 yılında, mikro şırınga ucundan askıya alınan organik damlacıkların kullanılmasıyla yapılmıştır ve tekniğe tek damla ekstrüzyon (SDME) adı verilmiştir. Daha sonra bu teknoloji, ekstraksiyon sıvılarının korunması için gözenekli içi boş oyuk fiberlerin kullanılması ile geliştirilmiştir. Bu da 1999 yılında oyuk fiber sıvı faz mikroekstraksiyonun (HF-LPME) gelişmesine yol açmıştır. 2006 yılında bir grup araştırmacı, minimalleştirilmiş sıvı sıvı ekstraksiyonun değiştirerek dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyonu (DLLME) geliştirilmiştir. Son iki yöntemde, hayvansal gıdalarda tetrasiklin kalıntılarının analizinde kullanılmıştır [48].

3.6. Kromatografik Ayırma Yöntemleri

Kromatografi, kompleks karışımlarda bulunan ve diğer yöntemlerle ayrılması zor olan, birbirine yakın özellikteki maddeleri ayırmak için, çevre, biyoloji, gıda, kimya, tıp eczacılık vd. pek çok alanda yaygın olarak kullanılan oldukça etkin ayırma tekniğidir [52].

Kromatografik ayırmalar, biri sabit öteki hareketli olan iki faz (ortam) arasında gerçekleştirilir. Ayrılması istenen madde veya maddeler çözünmüş halde hareketli faza ilave edilir. Hareketli faz, katı bir fazdan geçirilerek ayırım sağlanır. Hareketli faz sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir. Sabit faz ise katı bir yüzey üzerine veya kolana doldurulmuş, hareketli faz ile karışmayan, katı bir duran faz veya katı destek maddesine tutundurulmuş sıvı bir duran faz olabilir. Sabit faz tarafından değişik derecelerde alıkonulan bileşenler hareketli fazla sürüklenecilerdir. Sabit faz

tarafından bağıl olarak kuvvetle alıkonulan bileşenler, hareketli faz ile yavaş ilerlerken zayıf alıkonulanlar hızlı ilerleyecektir. Bu şekilde birbirinden ayrılarak kalitatif ve kantitatif tayinleri mümkün olacaktır.

Kromatografik metotlar, iki şekilde sınıflandırılabilir. İlk sınıflandırma yöntemi, fazların fiziksel olarak birbiri ile etkileşimine (uygulama biçimine) göre yapılır ve kolon kromatografisi veya düzlemsel kromatografi olmak üzere ikiye ayrılır [53-55].

İkinci sınıflandırma yöntemi ise, fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine (ayırma mekanizmasına) göre yapılır ve üçe ayrılır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Genel Sınıf	Yöntem	Sabit Faz	Denge Türü
1. Sıvı Kromatografisi	Sıvı-Sıvı	Katı üzerine sabitlenmiş sıvı	Dağılma
	Sıvı-Katı	Katı	Adsorpsiyon
	İyon değişimi	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	Boyut eleme	Polimer bir katının gözenekleri arasındaki sıvı	Dağılma/Eleme
	Affinite	Katı yüzeye bağlı organik türler	Dağılma
2. Gaz Kromatografisi	Gaz-Sıvı	Katıya absorplanmış sıvı	Dağılma
	Gaz-Katı	Katı	Adsorpsiyon
3. Süperkritik Akışkan Kromatografisi		Katı bir yüzeye bağlı organik türler	Dağılma

3.6.1. Ayırma mekanizmalarına göre sıvı kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisinde ayırım temel olarak, ayrılması istenilen maddelerin bulunduğu karışımın hareketli faza ilave edilip, katı fazdan geçirilmesi ile yapılır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması, katı fazda farklı adsorplanma derecelerine sahip olmaları ile gerçekleşir. Bu metotta sabit faz olarak ince öğütülmüş kalsiyum karbonat, alüminyum oksit, talk, silikajel ve alümina gibi maddeler kullanılır. Hareketli faz olarakta, su, alkol, aseton, kloroform, nitrobenzen, tolüen, benzen gibi çözücüler kullanılır [56].

Dağılma kromatografisi

Birbiriyle karışmayan iki sıvı arasında örnek bileşenlerinin dağılması temeline dayanır. Sıvılardan biri katı destek maddesinin porları içinde adsorbe edilerek tutulur ve duran faz işlevi görür. Duran faz ile doyurulmuş olarak kullanılan diğer sıvı ise hareketli faz işlevi görür. Dağılma kromatografisi en yaygın kullanılan sıvı kromatografisidir.

Dağılma kromatografisinin uygulama ve gelişiminin ilk aşamasında sıvı-sıvı kolonlar kullanılmıştır. Daha sonraki gelişim aşamalarında bağlı faz kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Bu teknikler arasındaki fark destek katısına durgun fazın tutunmasına dayanır. Sıvı-sıvı kromatografide, sıvı bir durgun faz dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla tutulmuştur. Bağlı faz kromatografi yönteminde ise sıvı, durgun faza kimyasal olarak bağlanmıştır ve hareketli fazda çözünmeyen yüksek kararlılıkta dolgular elde edilmiştir.

Dağılma kromatografisi, hareketli ve durgun fazların bağıl polarlığına bağlı olarak normal faz ve ters faz olmak üzere ikiye ayrılır [54-57].

Normal faz kromatografi: Bu yöntemde, durgun faz olarak, kuvvetli polar olan silika jeller veya bir alkil nitril ya da bir alkil amin gibi polar bir bileşik kullanılırken, hareketli faz olarak n-hekzan veya tetrahidrofuran gibi bir polar olmayan solventler kullanılır. Böylece kolona yüklenmiş olan örnek molekülleri arasında polar olanlar, kolon materyali üzerinde adsorblanarak daha az polar olan moleküllere göre, kolon içerisinde daha uzun kalacaklardır.

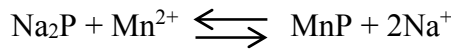
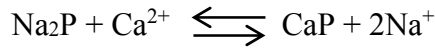
Ters faz kromatografi: Bu kromatografi yöntemi ise normal faz kromatografisinin tersidir. Bu nedenle, ters faz kromatografide durgun faz olarak oktasilan (OS) veya oktadesilsilan (ODS) gibi bir polar olmayan (hidrofobik) bileşik kullanılırken; hareketli faz olarak ise su/asetonitril veya su/metanol gibi polar bir çözücü kullanılır. Bu durumda ise kolona yüklenmiş olan örnek materyalindeki polar olmayan moleküllerin elüsyonu, polar olanlara oranla daha sonra gerçekleşecektir.

İyon değiştirme kromatografisi

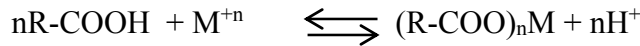
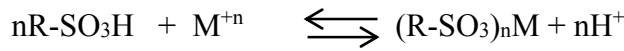
İyon değiştirme kromatografisi, bir katı maddenin yapısında bulunan iyonları, temasta bulunduğu çözelti içindeki aynı cinsten yüklü (pozitif iyonların pozitif iyonlarla, negatif iyonların da negatif iyonlarla) başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi esasına dayanır. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, çözelti ortamında

hiç çözünmeyen büyük moleküllü doğal ve yapma maddelerdir. Bunlar inorganik ve organik olmak üzere ikiye ayrılır. İnorganik olanlar killer ve zeolitlerdir. Organik olanlar ise sentetik iyon değıştircilerdir [52, 58].

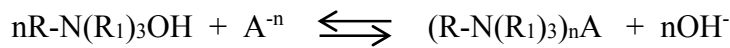
İnorganik iyon değıştirciler: En çok bilinen inorganik değıştirciler zeolitlerdir. Bunlar genel olarak $\text{Na}_2\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12}$, formülündedir. Zeolitler yapılarında bulunan sodyum iyonlarını Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} iyonlarla değıştirme özelliğine sahiptir. Zeolitler kısaca Na_2P şeklinde gösterilir ve sulu ortamda aşağıdaki gibi denge oluştururlar.



Organik iyon değıştirciler: Organik iyon değıştirciler suda ve birçok organik çözücünde hiç çözünmeyen, yapılarında sayılamayacak kadar çok anyon ve katyon taşıyan büyük moleküllü polimerlerdir. Bunlar hem anyon hem de katyon değıştirmede kullanılır. Katyon değıştirici reçinelerin en genel aktif bölgeleri, kuvvetli bir ait olan sülfonik asit grubu ($\text{R-SO}_3\text{H}$) ve zayıf bir asit olan (R-COOH) dur. Sülfonik asit tipi bir iyon değıştirici, M^{+n} katyonu içeren bir sulu çözelti ile temas ettiğinde, aşağıdaki gibi bir yer değıştirme dengesi meydana gelir.



Anyon değıştirici reçineler, kuvvetli bir baz olan tersiyer amin gruplarını ($\text{R-N(R}_1)_3\text{OH}$) veya zayıf bir baz olan primer amin gruplarını ($\text{R-NH}_3\text{OH}$) içerir. Temasta bulunduğu anyonlarla aşağıdaki gibi denge oluşturur. Her bir anyon sağa doğru oluşan tepkimeler gereği anyon değıştiriciye tutunurken, ters yöndeki tepkimelerle anyon değıştiriciden ayrılırlar [58].



Boyut eleme kromatografisi

Boyut eleme kromatografisi, karışımındaki maddelerin molekül büyüklüklerine göre ayrımını yapan bir yöntemdir. Özellikle yüksek mol kütleli türlerin ayrımını yapan bir tekniktir. Bu yöntem için kullanılan dolgu malzemeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine düfzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren yaklaşık 10 μm boyutunda, silis veya polimer partiküllerden meydana gelmiştir. Gözenekler içinde moleküller, etkin bir şekilde yakalanır ve hareketli faz akımı ile

uzaklaştırılır. Moleküller etkin büyüklüklerine göre gözeneklerde farklı sürelerde kalırlar. Gözenekten daha büyük olan moleküller gözeneklere giremez ve dolayısıyla dolgu maddesi tarafından tutulamazlar. Bu nedenle hareketli fazda kolayca sürüklenirler ve kolunu ilk terkedenler bunlardır. Diğer taraftan çapı gözenek çapından çok daha küçük olan moleküller, gözenek içinde sağa sola yalpaladıklarından, gözeneklerde kalma süreleri artar ve kolonu en son terk ederler. Bu iki sınır değer arasındaki büyüklükte olan moleküller birbirlerinden ayrılarak kromatogram verirler. Boyut eleme kromatografisinde sabit faz ve hareketli faz arasında kimyasal ve fiziksel bir etkileşim yoktur [56, 59].

Affinite kromatografisi

Affinite kromatografisi ile saflaştırma, diğer kromatografi tekniklerinin çoğunda, elektroforezde ve santrifüj tekniklerinde olduğu gibi ayrıştırılacak olan moleküllerin fiziksel özelliklerine dayanmaması nedeniyle, bu tekniklere benzemez. Bu tekniklerin aksine affinite kromatografisinde, saflaştırılacak olan biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarından veya kendilerine özgü kimyasal yapılarından yararlanılmaktadır. Bunun bir sonucu olarak da affinite kromatografisi teoride, kompleks biyolojik karışımlardan dahi tek bir işlemle, homojen saflıktaki materyallerin elde edilmesini sağlama özelliğindedir. Bu nedenle affinite kromatografisi, biyomoleküllerin saflaştırılmasında önemli bir konuma sahiptir.

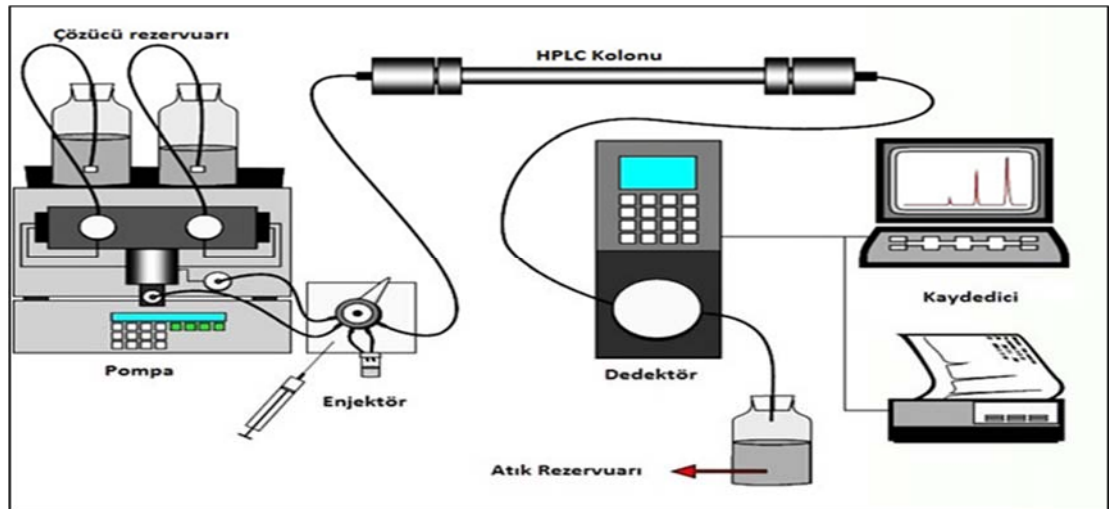
Affinite kromatografisi, adsorbsiyon kromatografisinin bir tipidir. Affinite kromatografisi, hedef biyomolekülün, çözünmeyen bir destek materyali (matriks) üzerine immobilize edilen ve hedef molekülü tamamlayıcı bağlanma uçları içeren ligandlar tarafından spesifik ve geri dönüşümlü olarak adsorbe edilmesine dayalı bir yöntemdir. Ligand ile hedef molekül arasındaki biyolojik etkileşimler, elektrostatik veya hidrofobik interaksiyonlar, van der Waals veya hidrojen bağları ile gerçekleşebilmektedir. Hedef molekülün ortamdan elüsyonu ya yarışmacı bir ligandın kullanılması ya da ortamın (mobil faz) pH, iyonik kuvvet veya polaritesinde değişimler yapılması ile sağlanmaktadır [60]. Bileşiğin kolondan elüsyonu sırasında kullanılan mobil faz, bileşiği denatüre etmemeli ve bileşiğin spesifik aktivitesinde veya fonksiyonunda herhangi bir değişime de neden olmamalıdır [53].

Bu yöntemde saflaştırma genellikle tek bir adımda, birkaç bin kat artırılmakta ve saflaştırılmak istenen molekülün geri kazanımıysa, oldukça yüksek verimlilikte olmaktadır [56].

3.6.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan HPLC yönteminde, sabit faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının önemli ölçüde küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği arttırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir basınç uygulanması gerekir. Bu yüksek verimdeki kolonların ve oldukça yüksek basınçların kullanıldığı HPLC, kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Özellikle diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. HPLC, çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikleri ve yüksek polarlıktaki bileşikleri, herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir [52, 53].

Poröz bir materyal içeren kolona örnek çözeltisi pompalanır ve bir mobil faz yardımıyla kolon boyunca yürür. Maddeler, kolondan geçerken farklı dağılıma davranışlarına bağlı olarak farklı göç oranlarına sahip olduklarından, farklı tutunma zamanlarına sahip olacaklardır ve bu süreye bağlı olarak kolondan yine ayrı sürelerde çıkacaklardır [57].



Şekil 3.5. HPLC sisteminin şematik gösterimi

Şekil 3.5'te görüldüğü gibi standart bir HPLC donanımı temel olarak 5 bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler sırasıyla; pompa, enjektör, kolon (sabit faz), dedektör ve bunların kaydedildiği bir ekrandır.

3.6.3. Sıvı kromatografisinde kullanılan dedektörler

UV/Vis Spektrofotometrik dedektörler

Kimyasal bileşiklerin çoğu, elektromanyetik alan ile bir etkileşim göstermektedirler. Elektromanyetik radyasyonun ışınları dedektörün akışlı küvetinden geçtiğinde, akışlı küvette bulunan bileşikler ile ışın arasındaki etkileşim nedeni ile ışının yoğunluğunda bir değişiklik meydana gelmektedir. HPLC sistemlerinde kullanılan optik dedektörlerin çoğunun çalışma prensibi ise ışının yoğunluğunda meydana gelen bu değişikliğin şiddetinin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu dedektörler istenilen dalga boyuna ayarlanarak, bileşiklerin belirlenmesine izin verirler. Uygun dalga boyu seçilerek, absorpsiyon özelliğine sahip bir bileşiğin en duyarlı şekilde belirlenmesine olanak sağlar [56, 61].

Fotodiyot dizisi dedektörleri

Bu dedektörler, elüsyon sıvısı akışlı küvetlerden geçerken, değişik dalga boylarındaki absorbans taramalarının ve istenilen dalga boylarındaki absorbans değerlerinin hassas olarak ölçülmesine izin vermektedirler. Fotodiyot dizisi dedektörleri, 0,01 saniyede birçok dalga boyunda ya da bütün dalga boylarında elüsyon sıvısının absorbansının sürekli olarak ölçülmesine olanak sağladıklarından, analitlerin elüsyon zamanlarına bağlı olarak tanımlanmasının yanı sıra, analitlere ait kalitatif bilgilerin elde edilmesini de sağlamaktadırlar [56, 61]. Bu dedektörlerin en önemli avantajı, ayrımı yapılmak istenen analitlerin, analizinde seçilmesi gereken en doğru dalga boyunun seçilmesini sağlamasıdır. Özellikle belirli bir analitin, farklı dalga boylarındaki molar absorbtivitelere ait bilgi yoksa fotodiyot dizisi dedektörlerden elde edilen veriler, analiz için çok önemlidir.

Floresans dedektörler

Sıvı kromatografi sistemleri ile birlikte kullanılan modern dedektörler arasında en hassas detektörlerden biridir. Floresans dedektörler ile örnek küveti içerisinde bulunan ve floresans özellik gösteren, tek bir molekülün dahi belirlenebilmesi mümkündür. Tipik olarak UV'yi kuvvetli absorbe eden bir bileşiğin belirlenmesinde floresans dedektörlerin duyarlılığı, UV dedektörlerin duyarlılığına oranla 10-1000 defa daha hassastır. Floresans dedektörler, diğer optik dedektörlere göre oldukça özgül ve seçicidirler. Bu nedenle, örnek materyalleri içindeki özgül bir floresans

bileşiğin belirlenmesinde, floresans dedektörlerin kullanılması, bir avantaj oluşturmaktadır [62].

Kondüktivite (iletkenlik) dedektörleri

Elektrolitik kondüktivite dedektörlerinde, kolon elüsyon sıvısının iletkenliği sürekli olarak ölçülmekte ve akışlı kuvvet içerisinde analitin bulunması, kondüktivitenin değişmesi ile belirlenmektedir. Kondüktivite dedektörlerinde kullanılan akışlı kuvvetler ise oldukça küçük hacimli kapillerden oluşmakta olup, bu kapillere iki elektrot bağlanmıştır.

Akışlı kuvvet içerisinde akmakta olan kolon elüsyon sıvısı ile birlikte analitler kuvete girdiğinde, elüsyon sıvısının kondüktivitesi değişmekte ve bu değişiklikler sürekli olarak kaydedilmektedir. Kondüktivite dedektörlerinin tepkimesi ise oldukça geniş bir aralıkta derişim ile doğru orantılı olduğundan, uygun kalibrasyonların önceden yapılması durumunda dedektör çıkış sinyalinin belirlenmesine de izin vermektedirler. Bu dedektörlerle en iyi sonuçlar ise izokratik elüsyonların yapıldığı kromatografik çalışmalarla sağlanmaktadır. Kondüktivite dedektörleri iyon değiştirme kromatografisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [56].

Elektrokimyasal dedektörler

Elektrokimyasal dedektörler, indirgenebilen ve yükseltgenebilen maddelerin analizinde kullanılan çok hassas dedektörlerden biridir. Bu dedektörlerde akışlı kuvete, birisi kararlı bir yer değiştirici (karşıt) elektrotu (Ag/AgCl veya calomel) diğeri ise polarlaşabilirliği oldukça yüksek olan bir hareket (çalışma) elektrotu olmak üzere iki elektrot bağlanır.

Hareket elektrotuna, analit akışlı kuvet boyunca geçtikçe, elektrot yüzeyindeki moleküllerin oksitlenmesini veya redüklenmesini ve sonuçta iki elektrot arasında bir akım akışının oluşumunu sağlayacak seviyede sabit bir gerilim (potansiyel) uygulanır. Yer değiştirici elektrota uygulanan gerilim (potansiyel) ise oluşan akımın kaydedicide tam ölçekli bir sapma meydana getirmesine yeterli olmaktadır. Hidrokarbonlar, aminler, amidler, fenoller, fenotiazinler, kateşolaminler ve kuinolinler oksitlenebilen bileşiklerdir. Olefinler, esterler, ketonlar, aldehitler, eterler, azo ve nitro bileşikleri ise redüklenen bileşiklerdir. Hareketli fazda ise tâbi ki dedektörde tepkime oluşturacak bileşikler bulunmalıdır. Elektrokimyasal dedektörler

ise özellikle kateşolaminlerin, vitaminlerin ve antioksidantların analizinde kullanılmaktadır [61].

Kırılma indisi dedektörleri

Kırılma indisi dedektörleri, saf haldeki hareketli faz ile örnek bileşenlerini içeren hareketli fazın kırılma indisi farkını ölçme prensibi ile çalışır. En önemli avantajı neredeyse bütün maddelerin tespitinde kullanabilir olmasıdır. Ancak diğer dedektörlere oranla daha düşük hassasiyete sahiptirler. Bu dedektörlerle çalışılırken sıcaklığın sabit olması çok önemlidir. Mobil faz oranı değişimine çok duyarlı oldukları için, gradient elüsyon sistemi uygulanamaz [54, 56].

Kütle spektrometre dedektörleri

Kütle spektrometre dedektörü, kromatografi ve spektroskopi sistemlerinin bir araya getirilmesi ile oluşmuş bir sistemdir. Yüksek performanslı sıvı kromatografi sayesinde moleküller, fizikokimyasal özelliklerine göre kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Moleküller normalde yüklü değildir, fakat kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler [61]. Bu tip dedektörlerde, yüksek hassasiyette seçici filtrelerden iki adet bulunmaktadır. Birinci filtrede ‘kütle/yük’ oranına göre ayrılan moleküller, parçalanma hücresinde yüksek saflıkta azot gazına çarptırılarak parçalanmaya tabi tutulmaktadır. Oluşan parçalanma iyonları, ikinci filtreye girerler. İkinci filtrede parçalanma sonucu oluşan iyonların üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılır. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekülün mevcut olmasına karşın aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10000 dır. Bu nedenle çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır [53]. Ölçüm hassasiyeti, µL örnek hacimlerinde ng, pg düzeyinde bir duyarlılığa sahiptir. Çoklu analit tespitinde, karmaşık matrislerde bulunan eser seviyedeki analitlerin hassas miktar tayini analizi için kullanılır [55].

3.6.4. Sıvı kromatografisinde sistem uygunluk parametreleri

Sistem uygunluk parametreleri, kromatografik metodun, numunelerin ve kullanılan ekipmanların doğru ve kesin sonuçlar verdiğinin değerlendirilmesi için gerekli olan kavramlardır.

Kapasite Faktörü (k')

Kapasite faktörü, bir bileşimin kolon içerisindeki kalma süresinin bir ölçüsüdür. Her bir bileşen için ayrı ayrı hesaplanmalıdır. Standartların kapasite faktörlerini belirlemek için kullanılan t_0 değeri kolanda tutulmayan bileşenin alıkonma zamanıdır. İyi bir kromatografi metodunda, her bir standartın kapasite faktör değerinin, $2 < k' < 10$ aralığında olması gerekmektedir [63].

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

t_r = Bileşimin alıkonma zamanı

t_0 = Kolanda tutulmayan bileşimin alıkonma zamanı

Teorik Plaka Sayısı (N)

Teorik plaka sayısı, kolonun etkinliğini belirleyen, sıvı ve katı faz arasında tam bir denge oluşturabildiği yeterli alanlara sahip ve birbirine bitişik çok sayıdaki plakadan oluştuğu kabul edilen kuramsal bir kavramdır. İyi bir kromatografik sistem için, kolon performansını ve etkinliği belirleyen teorik plaka sayısı 2000'den büyük olmalıdır [63].

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

Kuyruklanma ve Pik Simetri Faktörleri

Pik kuyruklanma faktörünün 1 olması pikin simetrik olduğunu gösterir. Kuyruklanma faktörü $0.5 \leq T \leq 2$ aralığında ve pik simetri faktörü ise $0.5 \leq T \leq 1.5$ aralığında olmalıdır [63].

Seçicilik (α) ve Ayırma Faktörü (R)

Seçicilik faktörü (α), bir kromatografi sisteminin, yapısal olarak birbiri ile ilgili olan bileşikler (A ve B bileşikler) ayırma yeteneğinin bir ölçüsüdür. İyi bir kromatografi metodunda seçicilik faktörü $\alpha > 1$ olmalıdır.

$$\alpha = \frac{t_{rB} - t_0}{t_{rA} - t_0}$$

Ayırma faktörü, iki bileşik arasındaki kromatografik ayrımının, kantitatif bir değeridir. Ayırma faktörünün hesaplanmasında, teorik plaka sayısı, kapasite faktörü ve seçicilik faktörleri kullanılmaktadır. Ayırma faktörünün 1,5 olması iki bileşimin tamamen ayrıldığı anlamına gelmektedir [63].

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{k_b}{1+k_b} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right)$$

3.7. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, yöntemin amaçlanan analitik uygulamanın tüm gereklerini karşıladığının, laboratuvar çalışmaları ile kanıtlanması işlemidir.

3.7.1. Seçicilik (matriks etkisi)

Seçicilik, analiz edilen karışımda, ayrılmak istenen maddenin, diğer maddelerden veya safsızlıklardan spesifik olarak (girişim yapmadan) ayrılmasını ifade eder. Bir analitik metodun seçiciliği, çalışılan karışım çözeltisinde analiz edilecek maddenin sinyalinin; safsızlık, yardımcı madde ve kullanılan çözelti sinyalleri ile girişim yapıp yapmadığının kontrolü ile belirlenir.

Validasyonun en önemli parametresidir, metod geliştirilirken ilk yapılması gereken testtir [64-69].

3.7.2. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, aynı örnekten alınan aynı koşullarda hazırlanan çoklu numunelerin analiz sonuçlarının birbirlerine yakınlığını gösteren parametredir. Kesinlik rastgele hatanın bir ölçüsüdür ve aynı numuneden yapılan tekrar analiz sonuçlarının, standart sapmasının, varyansının ve bağıl standart sapmasının hesaplanması ile belirlenir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik (sistem kesinliği) ve tekrar elde edilebilirlik (metot kesinliği) olmak üzere iki farklı çalışma ile yapılır [64-69].

Tekrarlanabilirlik (Sistem Kesinliği)

Tekrarlanabilirlik parametresi, kullanılan ekipmanın performansının ölçüsüdür. Aynı araştırmacı tarafından, aynı ölçüm koşullarında (aynı cihaz ve ekipmanlar, aynı laboratuvar şartları), aynı günde yapılan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını değerlendirmek amacıyla standart sapmasının hesaplanmasıdır. Ölçüm aralığında farklı derişimlerde (en az 3) yapılmalıdır. Her derişim seviyesinde en az 6 tekrar uygulanmalıdır. Ardından her derişim için standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplanır.

Tekrar Elde Edilebilirlik (Metot Kesinliği)

Bir metodun farklı ölçüm koşullarında (farklı cihaz, ekipman ve kimyasallar ile farklı çalışma şartlarında), geniş zaman aralığında farklı günlerde yapılan ölçüm

sonuçlarının birbirine yakınlığını değerlendirmek amacı ile standart sapmasının belirlenmesidir. Denemeler ölçüm aralığı içinde farklı derişimlerde yapılır.

3.7.3. Doğruluk

Analitik metodun doğruluğu, bu metot ile test edilen analiz sonuçlarının gerçek sonuçlara yakınlığıdır. Doğruluk, geri kazanım olarak da adlandırılır. Analitik metodun, belirlenmiş aralık boyunca doğruluğu kanıtlanmış olur. Numune ortamı içindeki analitin tayini ile elde edilen miktarın, saf analitin çözeltisine göre ne kadar geri kazanıldığının analiz edilmesi gerekir.

Bilinen üç farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler matrikse eklenir, varsa bir ayırma metodu ile geri elde edilir ve tayin edilerek bilinen miktarla karşılaştırılarak hesaplanır [64-69].

3.7.4. Ölçüm alt limiti (LOD) ve Tayin alt derişimi (LOQ)

Bir analitik yöntemin alt tayin limiti, analizi yapılan maddenin dedekte edilebildiği ve kantitatif olarak tayinin zorlaştığı en düşük derişimdir. LOD değerini hesaplamak için birkaç metot olsada, genel olarak etken maddelerin analizleri için sinyal/gürültü (S/N) oranının 3 olması gerektiği yaklaşımları kullanılmaktadır. Her bir etken maddenin, çalışma standartlarından ayrı ayrı seyreltmeler yapılarak, geçerli yöntemle analizleri yapıp ve sinyan/gürültü oranının 3 olduğu derişimler belirlenerek, hesaplanır.

Bir analitik metodun, alt derişim limiti (LOQ) test edilen maddelerin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile sayısal olarak ölçüm yapılabilen en düşük derişimidir. Genel olarak, LOQ değerini belirlemek için S/N oranının 10 olması gerektiği yaklaşımları kullanılmaktadır. Her bir etken maddenin, çalışma standartlarından ayrı ayrı seyreltmeler yapılarak, geçerli yöntemle analizleri yapıp ve sinyan/gürültü oranının 10 olduğu derişimler belirlenerek, hesaplanır [64-69].

3.7.5. Çalışma aralığı

Analitik test metodunun doğru, kesin ve lineer sonuç verdiği alt ve üst derişim aralığının belirlenmesi için yapılan çalışmalardır. Bir analitik yöntemin çalışma aralığı doğrusallık çalışmaları ile oluşturulur. Doğrusallık çalışmaları, alt ve üst derişim dahil en az 5 farklı derişim ile belirlenmelidir. Her bir derişim, sistem ile en az 3 kez analizlenmelidir. Doğrusallık çalışmaları 3 ayrı günde tekrar edilmelidir [64-69].

3.7.6. Çözelti stabilitesi

Çözelti stabilitesi çalışmasında, analitik metotta hazırlanan standart ve numune çözeltilerinin stabil olduğu koşullar ve süre belirlenir. Standart ve numune çözeltileri oda sıcaklığı ve buzdolabında bekletilerek farklı zaman aralıklarında analiz edilir ve başlangıç değerleri ile karşılaştırılır. Standart ve numune çözeltilerinin stabil olduğu süre saat veya gün olarak tayin edilir. Seçilecek bekletilme süresi analize özgüdür. Eğer etken madde bu süre ve saklama şartlarında bozulacak olursa bu şartlar limitlendirilir ve metotta belirtilir [64-69].

3.7.7. Sağlamlık

Analitik bir metodun sağlamlığı, metot parametrelerinde yapılan kasıtlı ve küçük değişiklikler ile normal kullanım süresince metot güvenilirliğini sağlamayı amaçlayan, metot kapasitesinin ölçümüdür. Dayanıklılık parametresinin değerlendirilmesinin birinci sonucu, analitik yöntemin ne zaman kullanılırsa kullanılsın geçerliliğinden emin olmak için sistem uygunluk parametresinin oluşturulmasıdır. Sonuçlar başlangıç değerleri (değişim öncesi) ile karşılaştırılır ve sistem uygunluk parametreleri sağlanmalıdır. Sağlamlık çalışması için aşağıdaki parametrelerde değişim yapılabilir [64-69].

- Hareketli fazın pH'ındaki değişimlerin etkisi (± 0.2 pH)
- Hareketli faz tampon derişimindeki değişimin etkisi ($\pm\%10$)
- Hareketli faz kompozisyonu (organik çözücü yüzdesi)
- Farklı kolonlar (farklı lot ve/veya üretici)
- Kolon sıcaklığı ($\pm\%10$)
- Akış hızı ($\pm\%50$)

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Materyal

Bu tez çalışmasında; tavuk çiftliği atık sularında bulunan veteriner ilaç atıklarının analizi için uygun örnek hazırlama basamaklarının geliştirilmesi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi–diod array dedektör (HPLC-DAD) ile analizi amaçlanmıştır. Materyal olarak Malatya ili çevresinde faaliyet gösteren tavuk çiftliklerinden alınan atık sular kullanılmıştır. Atık suların alınacağı tavuk çiftliğine karar vermek için 6 farklı tesis gezilmiştir. Yapılan ziyaretler esnasında, tesise hizmet veren veteriner hekimlerle ve çalışanlarla görüşülmüştür. Bu tesislerde kullanılan ilaçlar, tavuk yetiştirme periyodu, tesisin yıkanması ve yıkama sularının tesisten nasıl uzaklaştırıldığı, hakkında bilgi edinilmiştir. Edinilen bilgilere göre; her tavuk yetiştirme döneminin sonunda, tesis yıkama işlemini düzenli periyodlarla yapan, yıkama sularını tesisten kayıp yaşamadan toplama noktasına ulaştırabilen fiziki alt yapıya sahip tavuk yetiştirme çiftliğinden numune alınmasına karar verilmiştir. Ayrıca tesisin konumunun laboratuvara yakın olması, tesis çalışanlarının her yıkama işlemine başlamadan önce haber verecek olmaları ve tesis yıkama işlemini gözlemlene imkanı, tesisin seçilmesinde önemli olmuştur.

Numune alınan tesiste, ilaçlar; tavukların hastalanması durumunda ve yetiştirme rutininde gerekli oldukları zaman kullanılmaktadır. Kullanılan ilaçlar hayvanlara, içme sularına ve yemlerine katılarak, uygulanmaktadır. Tesisin yıkanma işlemi, hayvanlar kesime gönderildiği zaman, tavukların yemlik ve su içme bölmeleri dahil bütün alanı kapsayacak şekilde yapılmaktadır. Yıkama suları üç ayrı çıkıştan tesisi terk ederek toplama alanına ulaşmaktadır. Gözlemlenen yıkama işleminin sonunda toplama havuzundan, karıştırılarak alınan atık suya kaba bir süzme işlemi yapılarak numuneler hızlıca laboratuvara getirilmiştir. Ard arda üç tavuk yetiştirme periyodunun sonunda yapılan tesis yıkama işleminde oluşan atık sulardan numuneler alınmıştır. Her bir yıkama sezonunda 5 paralel numune alınmıştır. Alınan her numune, alışı tarihleri yazılarak etiketlenmiştir. Numune alma tarihleri; 07 Ağustos-04 Ekim-10 Aralık 2017 dir. Atık sularda bulunması muhtemel veteriner ilaçları olarak; Türkiye’de tavuk yetiştiriciliğinde sıklıkla kullanılan enrofloksasin, tilosin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve amoksisilin incelenmek üzere seçilmiştir. Sahadan alınan atık su örnekleri bölüm 4.2.3’de verilen şekilde analize hazırlanmıştır.

4.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan reaktifler

Çizelge 4.1. Kullanılan kimyasallar ve özellikleri

Kimyasal	Molekül Formülü	Firma Adı	CAS No
Metanol, $\geq$ % 99.9	CH ₃ OH	Sigma-Aldrich	67561
Asetonitril, $\geq$ % 99.9	C ₂ H ₃ N	Sigma-Aldrich	75058
Formik asit, % 99	CH ₂ O ₂	Carlo Erba	64186
Oksalik asit, $\geq$ % 99.9	C ₂ H ₂ O ₄	Sigma-Aldrich	144627
Enrofloksasin	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	Fluka	93106606
Tilosinm	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	Sigma-Aldrich	4752152
Seftiofur Hidroklorür	C ₁₉ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₃ .HCl	Fluka	103980445
Oksitetrasiklin Dihidrat	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ .2H ₂ O	Sigma-Aldrich	6153646
Doksisiklin Monohidrat	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ .2H ₂ O	Sigma-Aldrich	1786281
Trimetoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	Sigma-Aldrich	738705
Sülfadimidin	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	Sigma-Aldrich	57681
Amoksisilin trihidrat	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S.3H ₂ O	Sigma-Aldrich	61336707
Oasis HLB SPE kolon	C ₁₀ H ₁₀ , C ₆ H ₉ NO	Waters	186000116

4.1.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Çalışmalar sırasında kullanılan cihazların markaları ve hangi amaçla kullanıldıkları Çizelge 4.2’te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihazın Adı	Markası	Kullanım Amacı
Analitik Terazı	Sartorius AX224	Kimyasalların miktar olarak ölçülmesinde kullanıldı.
Magnetik Karıştırıcı	Torrey Pines Scient	Magnetik karıştırma işlemlerinde kullanıldı.
Ultrasonik Banyo	Kudos SK2210HP	Hazırlanan çözeltilerin homojenize edilmesinde kullanıldı.
Santrifüj Cihazı	Hettich zentrifugen universal 320R	Atık su numunelerinin, katı-sıvı ayrımının yapılmasında kullanıldı.
pH Metre	Ohaus Starter3100	pH ölçümünde kullanıldı.
HPLC-DAD	Thermo Finnigan	Kromatografik teknikle ilaçların tayininde kullanıldı.
Manifold	Macherey-Nagel	Atık suların ilaçların ayrılması ve ön deriştirilmesinde kullanıldı.
Rotary Evaporatör	IKA RV10 Basic	Atık sudan ekstrakte edilen ilaçların, sıvı kısmını uzaklaştırmada kullanıldı.

4.2. Yöntem

4.2.1. İlaç stok çözeltilerinin hazırlanması

Deneylerde kullanılan bütün ilaç çözeltileri, analitik saflıktaki kimyasallardan ultra saf su ($18,3 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ elektrik direnci, $0,055 \text{ }\mu\text{S/cm}$ 25°C için iletkenlik değeri) kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan stok ve standart çözeltiler koyu renkli cam şişelerde veya koyu renkli polietilen saklama kapları içerisinde buzdolabında muhafaza edildi. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan tüm cam malzemeler, seyreltik HNO_3 çözeltisi ve ardından 3-5 kez saf su ile çalkalandıktan sonra deneylerde kullanılmıştır.

Analizleri yapılan seftiofur, tilosin, trimetoprim, oksitetrasiklin, enrofloksasin, sülfadimidin ve doksisisiklin ilaçlarının ayrı ayrı 500 mg/L olacak şekilde stok çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler 4°C ve karanlıkta 1 ay süreyle kullanılmak üzere saklandı. Bu amaçla her bir ilaçtan ayrı ayrı 0.005 g tartılıp, bir behere alındı ve 9 mL metanol eklendi. Çözülme tamamlanıncaya kadar ultrasonik banyoda yaklaşık 5-10 dk süreyle bekletildikten sonra tüm çözeltiler 10 mL 'lik balon jöjelere alındı ve toplam hacim yine metanolla 10 mL 'ye tamamlandı. Hazırlanan bu stok çözeltilerden, yine ayrı ayrı ara stok çözeltileri 10 mg/L olacak şekilde günlük olarak hazırlandı. Bu amaçla; tüm ilaç stok çözeltilerinden $200 \text{ }\mu\text{L}$ alınıp, ultra saf su ile 10 mL 'ye seyreltme yapıldı ve $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ membran filtreden süzüldü. Hazırlanan ara stok çözeltileri, HPLC metot geliştirme çalışmalarında standart çözeltilerinin hazırlanmasında ve çalışma derişiminin belirlenmesinde kullanıldı.

4.2.2. Kalibrasyon grafiğı için standart çözeltilerin hazırlanması

- **0,10 mg/L lik standart karışım çözeltisinin hazırlanması:**

Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimetoprim, sülfadimidin ve tilosin stok çözeltilerinin ($C=500 \text{ mg/L}$) her birinden $2 \text{ }\mu\text{L}$ alınıp, balon jöjeye aktarıldı ve hacim deiyonize saf su ile 10 mL 'ye tamamlandı.

- **2,50 mg/L lik standart karışım çözeltisinin hazırlanması:**

Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimetoprim, sülfadimidin ve tilosin stok çözeltilerinin ($C=500 \text{ mg/L}$) her birinden $50 \text{ }\mu\text{L}$ alınıp, balon jöjeye aktarıldı ve hacim deiyonize saf su ile 10 mL 'ye tamamlandı.

- **5,00 mg/L lik standart karışım çözeltisinin hazırlanması:**

Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin stok çözeltilerinin (C=500 mg/L) her birinden 100 µL alınıp, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacim deiyonize saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

- **10,00 mg/L lik standart karışım çözeltisinin hazırlanması:**

Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin stok standart çözeltilerinin (C=500 mg/L) her birinden 200 µL alınıp, balon jojeye aktarıldı ve hacmi deiyonize saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

- **15,0 mg/L lik standart karışım çözeltisinin hazırlanması:**

Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin stok standart çözeltilerinin (C=500 mg/L) her birinden 300 µL alınıp, balon jojeye aktarıldı ve hacmi deiyonize saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

- **20,0 mg/L lik standart karışım çözeltisinin hazırlanması:**

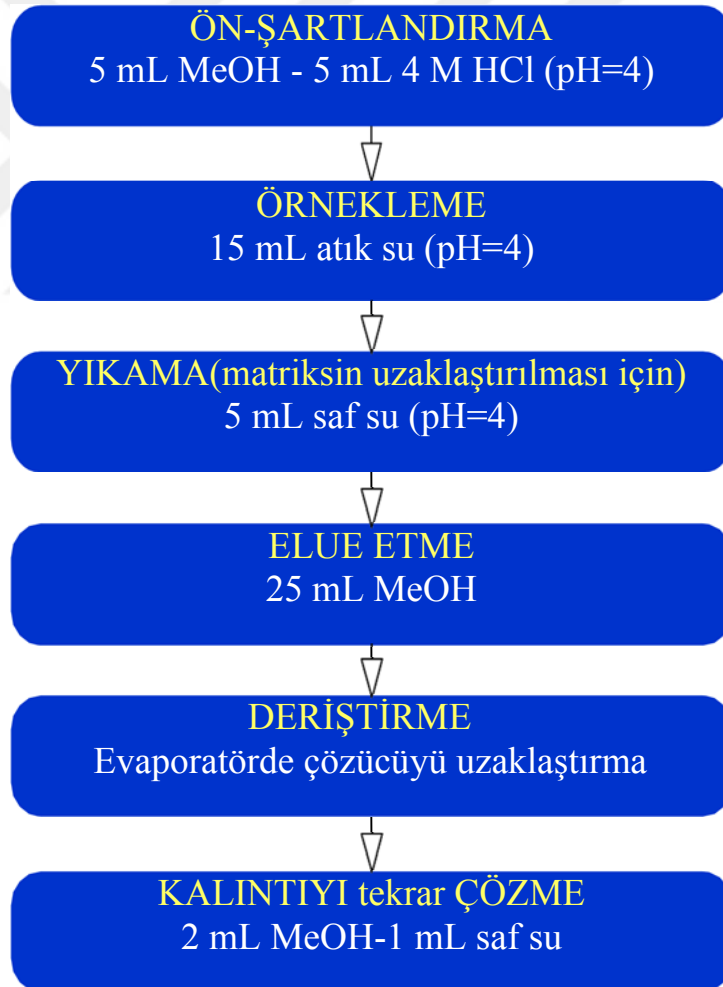
Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin stok standart çözeltilerinin (C=500 mg/L) her birinden 400 µL alınıp, balon jojeye aktarıldı ve hacmi deiyonize saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

4.2.3. Atık su örneklerinin analiz için hazırlanması

Tavuk çiftliğinden alınan atık sular, laboratuvara getirildikten sonra bekletilmeden kaba bir süzme işleminden geçirilerek içerisindeki çamur, ince kum, vb. bileşenlerden ayrıldı. Analiz öncesinde atık sular santrifüjlendi ve daha sonra aşamalı 5µm-1,2µm-0,8µm-0,45µm naylon mikro membran filtreler kullanılarak süzüldü. Süzülen örneklerin pH'sı 7 olarak ölçüldü. Sıcağa ve ışığa bağlı olarak her hangi bir degradasyondan kaçınmak için atık su örnekleri buzdolabında -5°C' de ve karanlıkta, renkli reaktif şişeler içerisinde bekletildi. Atık suların pH'sı 2, 4 ve 7 olarak ayarlandı. Çizelge 4.17'de görüldüğü gibi en yüksek geri kazanım pH 4'de elde edildiği için, her analiz öncesi buzdolabında saklanan atık suyun pH'sı 4 olarak ayarlanmıştır.

4.2.4. Katı faz ekstraksiyonu ile yapılan önderiştirme işlemleri

Katı faz ekstraksiyon işlemleri bir SPE manifoldu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla Waters Oasis HLB, 500 mg'lık mini kolonlarından, sırasıyla 5 mL MeOH ve HCl ile pH'sı 4'e ayarlanmış 5 ml deiyonize saf su geçirildi. Bu şekilde şartlandırılan mini kolonlardan 15 mL'lik atık su (pH=4) örneği 1,25 ml/dk akış hızıyla geçirildikten sonra, kolonlar pH'ı 4 olan 5 mL deiyonize su ile yıkanarak istenmeyen bileşenler kolondan uzaklaştırıldı. Kolonda tutulan analitler ise, 25 mL MeOH ile elue edilerek alındı ve örneklerden çözücüyü uzaklaştırmak amacıyla evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırma işlemi yapıldı. Kalıntı, tekrar 2 mL MeOH ve 1 mL su içeren karışım içerisine çözülerek alındı ve 0,45 µL filtreden geçirildikten sonra HPLC' ye verildi. Uygulanan işlem basamakları kısaca Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Uygulanan SPE yönteminin şematik gösterimi (HLB kolondan akış hızı 1,25 mL/dk)

4.2.5. HPLC-DAD analiz koşullarının belirlenmesi

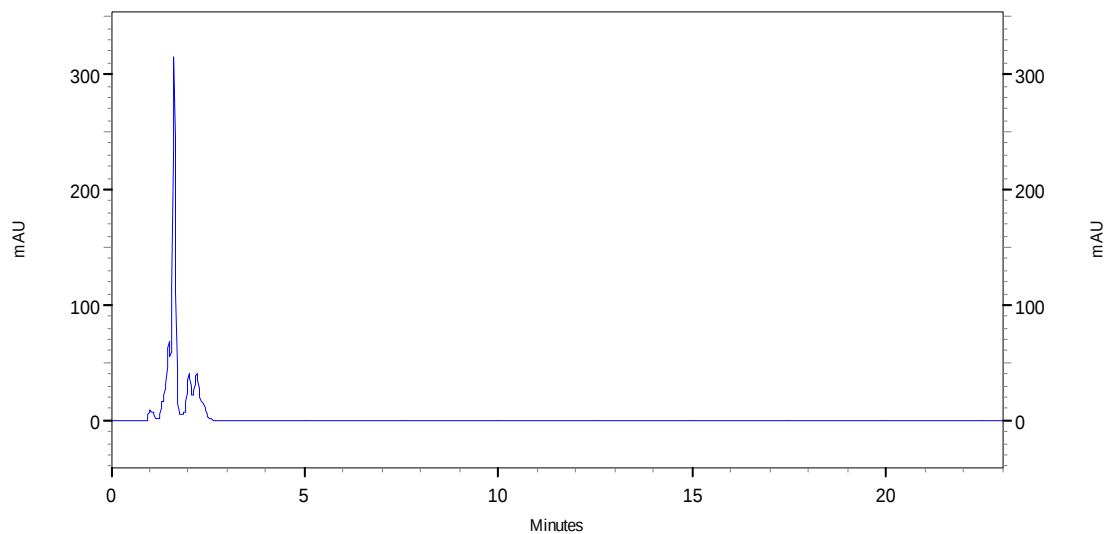
Örnek analizlerine geçmeden önce, veteriner atık sularında bulunması muhtemel yedi veteriner ilacını içeren karışım halindeki standart çözeltiler için kromatografik ayırma koşulları belirlenmeye çalışıldı. Kromatografik çalışmalarda öncelikle isokratik elüsyon uygulanmış ancak analitlerin rezölüsyonu iyi olamadığından gradient ayırma programı uygulanmıştır. Bu amaçla farklı gradient programları uygulanarak kromatografik analiz için yöntem oluşturulmuştur. Kromatografik analizler için uygulanan ayırma yöntemleri numaralandırılarak aşağıda verilmiştir. Bu uygulamalardan sonra optimum kromatografik koşullar belirlenmiş ve örneklerle uygulanmıştır.

• HPLC-DAD Yöntem 1

Mobil Faz A : 0,01M Oksalik Asit (pH= 2,17)
Mobil Faz B : Asetonitril (%100)
Kolon : ACE5 CN 125 x 4,0 mm, 5 µm
Örnek Hacmi : 20 µL
Dedektör : 280 nm
Basınç : 145 Bar
Sıcaklık : 25 °C
Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C: 10 mg/L)

Çizelge 4.3. Yöntem 1 için uygulanan izokrotik elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı mL/dk
0-25	70	30	1



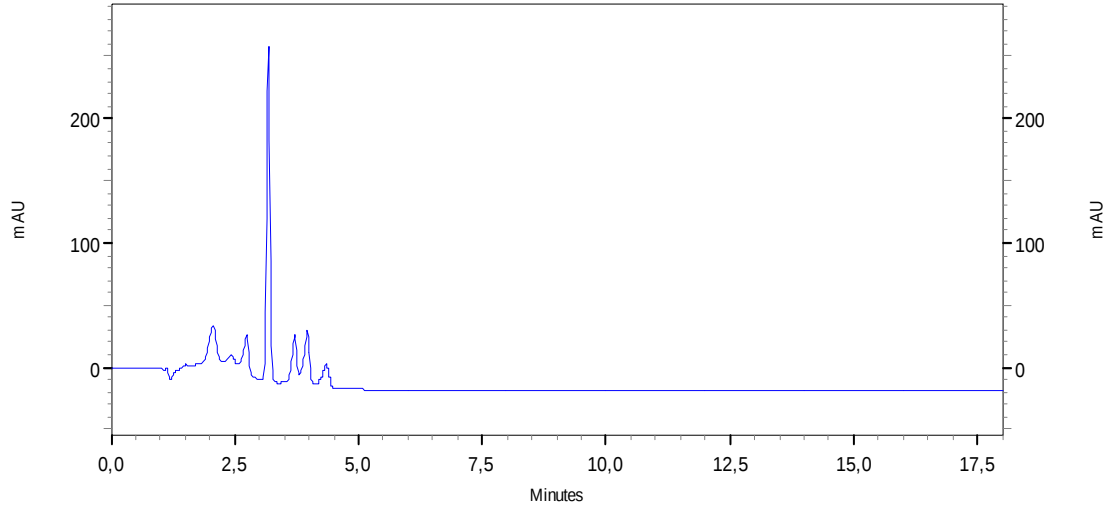
Şekil 4.2. Yöntem 1 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

• HPLC-DAD Yöntem 2

Mobil Faz A : 0,01M Oksalik Asit (pH= 2,17)
Mobil Faz B : Asetonitril (%100)
Kolon : ACE5 CN 125 x 4,0 mm, 5 µm
Örnek Hacmi : 20 µL
Dedektör : 280 nm
Basınç : 145 Bar
Sıcaklık : 25°C
Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C: 10 mg/L)

Çizelge 4.4. Yöntem 2 için uygulanan izokrotik elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı, mL/dk
0-25	90	10	1



Şekil 4.3. Yöntem 2 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

Yöntem 1' de uygulanan isokratik elüsyon sisteminin mobil faz oranları değiştirilerek, polarite farkının, kromatografik ayırmaya etkisi kontrol edildi. Sonuç olarak Yöntem 2' de uygulanan metotta daha iyi ayırım elde edilmiştir.

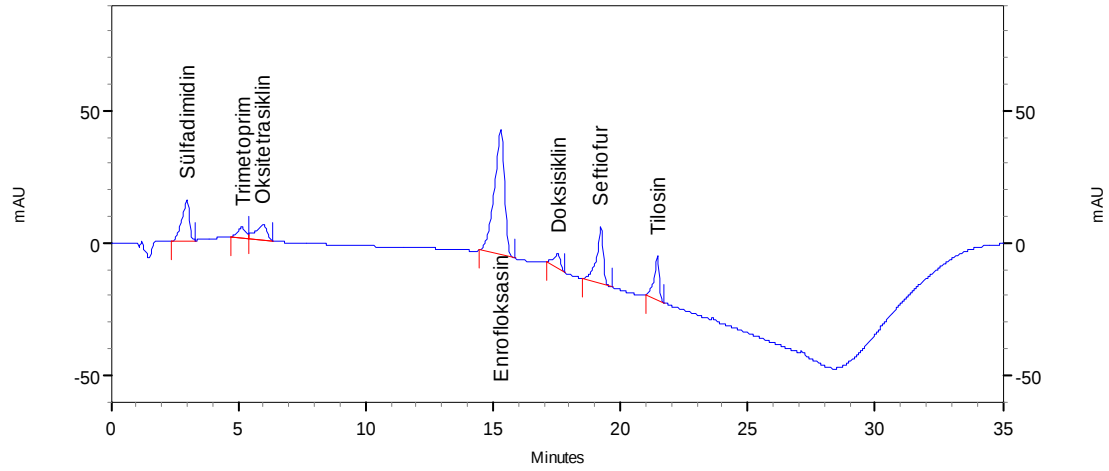
Yapılan ilk iki deneme sonucunda elde edilen bilgilerle, elüsyon sisteminde kademeli ve anlık değişiklikler yapabilme imkanı sunan gradient elüsyon sistemi ile, daha iyi ayırım yapılacağı belirlendi.

• **HPLC-DAD Yöntem 3**

Mobil Faz A : 0,01M Oksalik Asit (pH = 2,17)
 Mobil Faz B : Asetonitril (%100)
 Kolon : ACE 5 CN 125 x 4,0 mm, 5 µm
 Örnek Hacmi : 20 µL
 Dedektör : 280 nm
 Basınç : 145 Bar
 Sıcaklık : 25 °C
 Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C: 10 mg/L)

Çizelge 4.5. Yöntem 3 için uygulanan gradient elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı, mL/dk
0-10	95	5	1
10	95	5	1
25	50	50	1
30	100	0	1
35	100	0	1



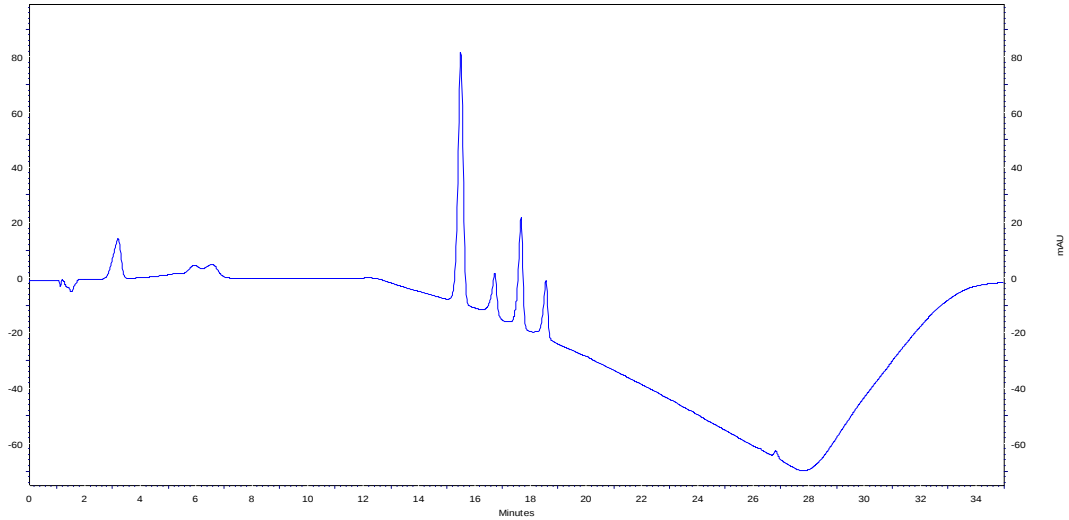
Şekil 4.4. Yöntem 3 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

• HPLC-DAD Yöntem 4

Mobil Faz A : 0,01M Oksalik Asit (pH = 2,17)
Mobil Faz B : Asetonitril (%100)
Kolon : ACE5 CN 125 x 4,0 mm, 5 µm
Örnek Hacmi : 20 µL
Dedektör : 280 nm
Basınç : 145 Bar
Sıcaklık : 25 °C
Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C: 10 mg/L)

Çizelge 4.6. Yöntem 4 için uygulanan gradient elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı mL/dk
0-8	100	0	1
25	30	70	1
30	100	0	1
35	100	0	1



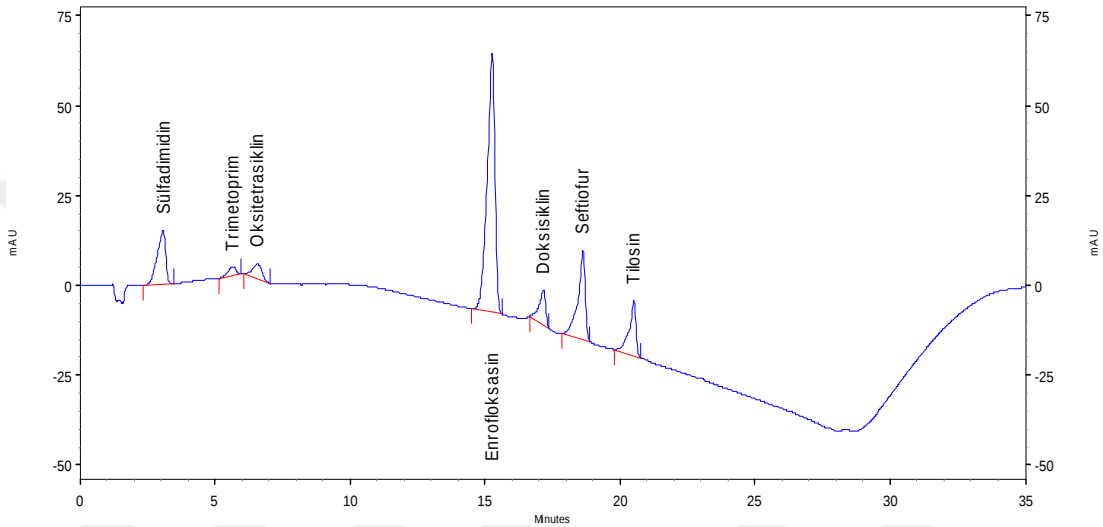
Şekil 4.5. Yöntem 4 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

• HPLC-DAD Yöntem 5

Mobil Faz A : 0,01M Oksalik Asit (pH = 2,17)
Mobil Faz B : Asetonitril (% 100)
Kolon : ACE5 CN 125 x 4,0 mm, 5 µm
Örnek Hacmi : 20 µL
Dedektör : 280 nm
Basınç : 145 Bar
Sıcaklık : 25 °C
Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C: 10 mg/L)

Çizelge 4.7. Yöntem 5 için uygulanan gradient elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı, mL/dk
0-8	100	0	0,7
25	50	50	1
30	100	0	1
35	100	0	1



Şekil 4.6. Yöntem 5 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

Yöntem 3’de uygulanan gradient elüsyon sistemi ile polaritesi daha düşük olan, enrofloksasin, doksisiklin, seftiofur ve tilosin standartlarının kromatografik ayrımları yapılmıştır. Ancak daha polar olan ve polariteleri birbirine yakın olan trimetoprim ve oksitetrasiklin standartlarının ayrımı sağlanamamıştır.

Yöntem 4’de uygulanan gradient elüsyon sisteminde ise, enrofloksasin, doksisiklin, seftiofur ve tilosin standartlarının kromatografik ayrımları yapılmıştır, ayrıca bu standartların pik simetrisi Yöntem 3’e göre daha iyidir.

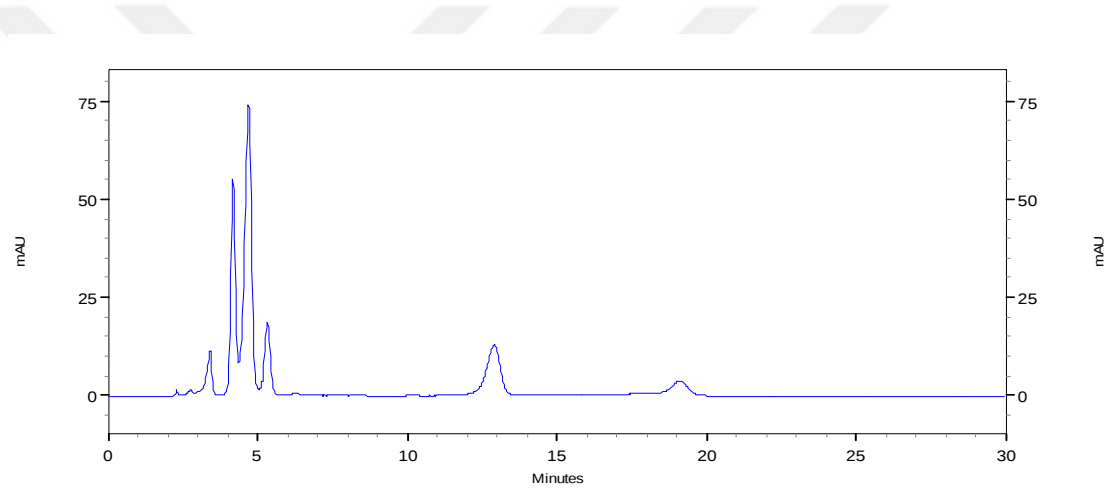
Yöntem 5’de uygulanan gradient elüsyon sisteminde ise, Yöntem 3 ve Yöntem 4’ e göre, trimetoprim ve oksitetrasiklin standartlarının ayrımı sağlanmıştır. Ancak uygulanan yöntemlerin tamamında, gradient program başladığı andan itibaren oluşan zemin (baseline) kaymasından dolayı, sabit faz olan kolon değiştirilmiştir.

• **HPLC-DAD Yöntem 6**

Mobil Faz A : Tampon (pH= 3, Na₂HPO₄)
 Mobil Faz B : Metanol (% 100)
 Kolon : ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm
 Örnek Hacmi : 20 µL
 Dedektör : 280 nm
 Basınç : 145 Bar
 Sıcaklık : 25 °C
 Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C:10 mg/L)

Çizelge 4.8. Yöntem 6 için uygulanan izokratik elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı, mL/dk
0-30	60	40	1



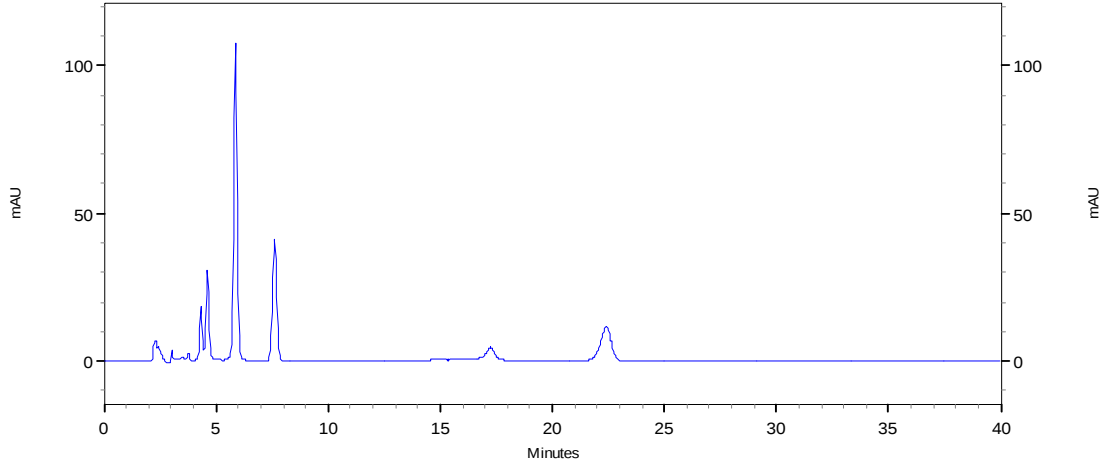
Şekil 4.7. Yöntem 6 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

• **HPLC Yöntem 7**

Mobil Faz A : Tampon (pH = 3, Na₂HPO₄)
 Mobil Faz B : Asetonitril (%100)
 Kolon : ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm
 Örnek Hacmi : 20 µL
 Dedektör : 280 nm
 Basınç : 145 Bar
 Sıcaklık : 25 °C
 Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C:10 mg/L)

Çizelge 4.9. Yöntem 7 için uygulanan izokratik elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı, mL/dk
0	80	20	1
40	80	20	1



Şekil 4.8. Yöntem 7 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC kromatogramı

Yöntem 6 ve Yöntem 7 de Tampon-Metanol ve Tampon-Asetonitril mobil faz çiftleri denemeleri yapılmıştır. Tampon ve organik çözüldiden oluşan sistemlerde kolonu ilk terk eden trimethoprim ve oksitetrasiklin standartlarının birbirinden ayrılamadığı gözlemlenmiştir.

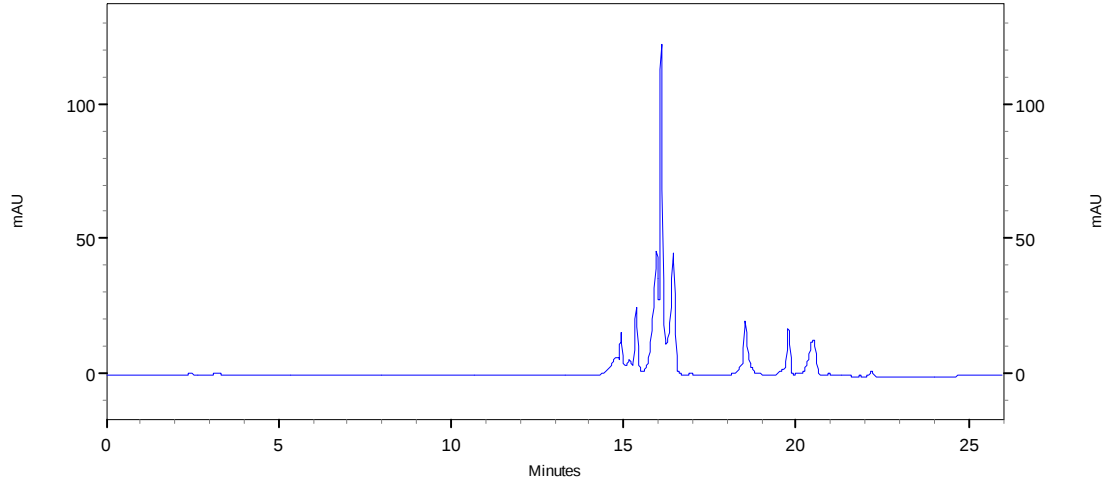
Ayrıca bu sistemlerle doksisiklin ve tilosin standartlarının pik simetri ve asimetri faktörlerinin uygun olmadığı ve seftiofur standartının ise pik vermediği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda formik asit çözeltisi ile denemelere devam edilmiştir.

• HPLC-DAD Yöntem 8

Mobil Faz A : % 0,1 Formik Asit (pH= 2,71)
 Mobil Faz B : Asetonitril (%100)
 Kolon : ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm
 Örnek Hacmi : 20 µL
 Dedektör : 280 nm
 Basınç : 145 Bar
 Sıcaklık : 25 °C
 Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C:10 mg/L)

Çizelge 4.10. Yöntem 8 için uygulanan gradient elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı, mL/dk
0-5	95	5	1
20	50	50	1
20-26	95	5	1



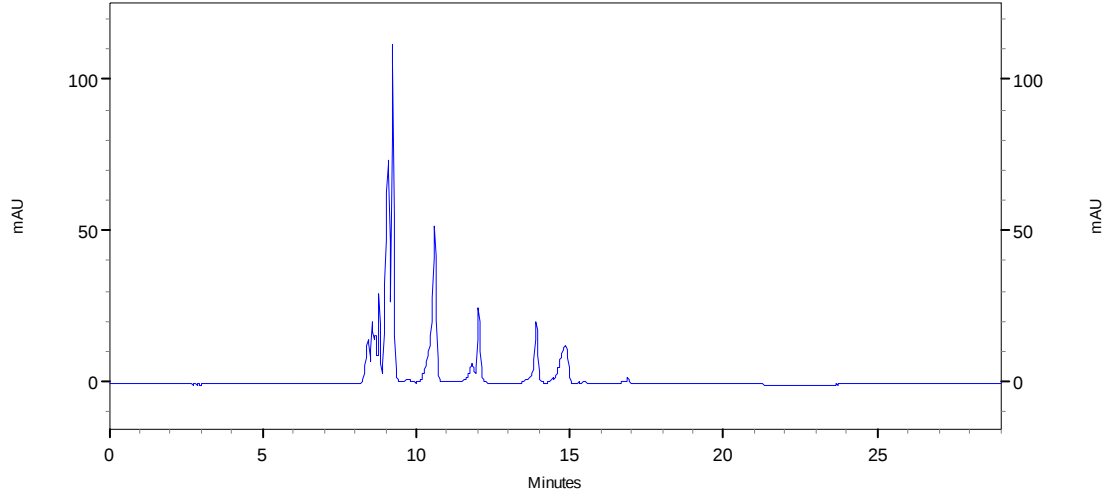
Şekil 4.9. Yöntem 8 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

• **HPLC-DAD Yöntem 9**

Mobil Faz A : % 0,1 Formik Asit (pH = 2,71)
 Mobil Faz B : Asetonitril (%100)
 Kolon : ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm
 Örnek Hacmi : 20 µL
 Dedektör : 280 nm
 Basınç : 145 Bar
 Sıcaklık : 25 °C
 Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C: 10 mg/L)

Çizelge 4.11. Yöntem 9 için uygulanan gradient elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı, mL/dk
0-2	96	4	1
2,5	80	20	1
8	70	30	1
14	55	45	1
16	30	70	1
19	96	4	1
29	96	4	1



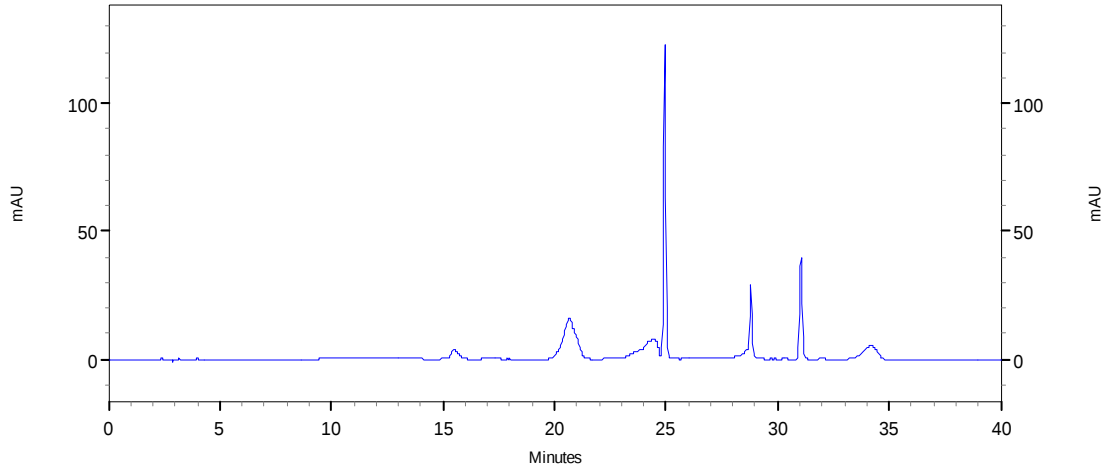
Şekil 4.10. Yöntem 9 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

• **HPLC yöntem 10**

Mobil Faz A : % 0,1 Formik Asit (pH = 2,71)
 Mobil Faz B : Asetonitril (%100)
 Kolon : ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm
 Örnek Hacmi : 20 µL
 Dedektör : 280 nm
 Basınç : 145 Bar
 Sıcaklık : 25 °C
 Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C:10 mg/L)

Çizelge 4.12. Yöntem 10 için uygulanan gradient elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı mL/dk
0-15	90	10	1
25	70	30	1
33	70	30	1
34	90	10	1
40	90	10	1



Şekil 4.11. Yöntem 10 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

Yöntem 8 ile yapılan metot geliştirme çalışmalarında, ayrımı yapılmak istenen yedi ilaç etken maddelerinin pikleri, 14 - 21 dakika aralığında elde edilmiştir (Şekil 4.9). Bu metotta kolonu ilk terk eden trimethoprim, oksitetrasiklin standartları ve kolonu en son terkeden doksisiklin, seftiofur ve tilosin standartlarının ayrımı yapılmıştır. Ancak enrofloksasin ve sülfadimidin standartlarının ayrımı çok iyi yapılamamıştır.

Bu yüzden Yöntem 9 ile yapılan çalışmada, mobil faz A oranında kademeli değişiklik yapılarak piklerin topluca 8 - 15 dakika aralığına getirilmesi sağlanmıştır (Şekil 4.10). Bu metot ile elde edilen sonuçlarda kolonu ilk terk eden, üç madde birbirinden ayıramamıştır. Yapılan bu iki yöntemde çalışılan maddeler 8-21 dakika aralığında gözlemlendi.

Yöntem 10 ile yapılan denemelerde, çalışılan maddelerin 21. dakikadan sonraki durumunu gözlemlemek için gradient sistemin apolarlığı arttırıldı. Elde edilen sonuçlardan, piklerin ayrıldığı ancak alıkonma zamanlarının uzun olmasından dolayı pik simetrilerinin uygun olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).

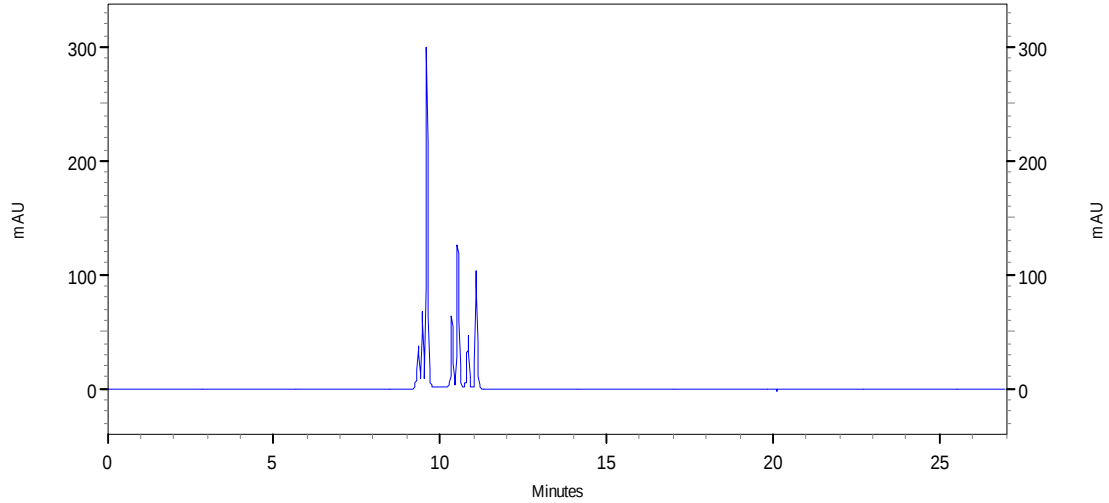
Yapılan ön denemeler sonucunda elüsyon sisteminde mobil faz A oranını yüksek tutarak metodu başlatıp, sonraki 20 dakikada bu oranı kademeli olarak azaltacak denemeler yapılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla yöntem 11 geliştirilmiştir.

• **HPLC-DAD Yöntem 11**

Mobil Faz A : % 0,1 Formik Asit (pH = 2,71)
Mobil Faz B : Asetonitril (% 100)
Kolon : ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm
Örnek Hacmi : 20 µL
Dedektör : 280 nm
Basınç : 145 Bar
Sıcaklık : 25°C
Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C: 10 mg/L)

Çizelge 4.13. Yöntem 11 için uygulanan gradient elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı, mL/dk
0-10	98	2	1
10-16	25	75	1
16	25	75	1
17-27	98	2	1



Şekil 4.12. Yöntem 11 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

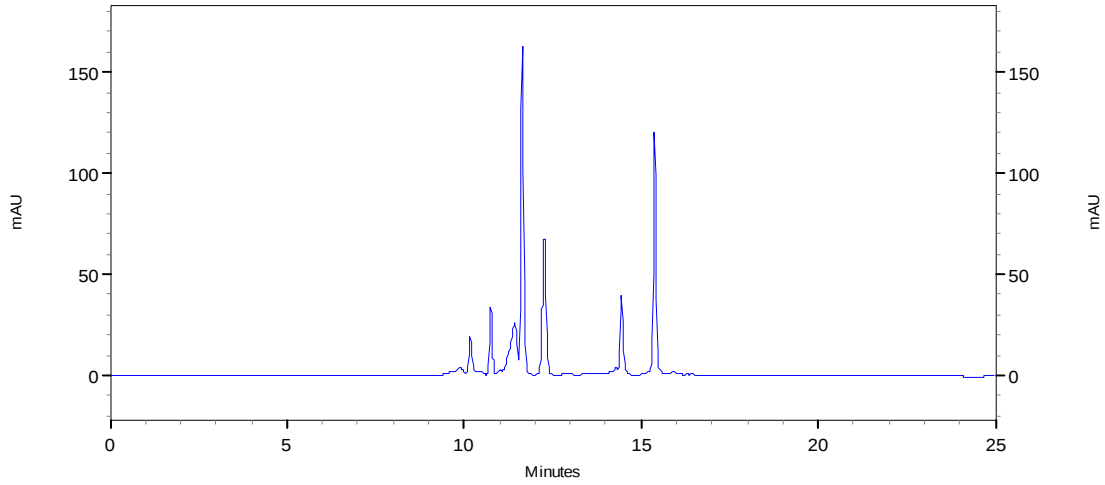
Yöntem 11’de uygulanan gradient elüsyon sistemi ile elde edilen sonuçlara göre, ilaç etken maddelerinin tamamı 3 dakika içinde kolunu terk ettikleri için, piklerde ayırım gerçekleşmemiştir.

• **HPLC-DAD Yöntem 12**

Mobil Faz A : % 0,1 Formik Asit (pH = 2,71)
 Mobil Faz B : Asetonitril (% 100)
 Kolon : ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm
 Örnek Hacmi : 20 µL
 Dedektör : 280 nm
 Basınç : 145 Bar
 Sıcaklık : 25 °C
 Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C: 10 mg/L)

Çizelge 4.14. Yöntem 12 için uygulanan gradient elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı, mL/dk
0	95	5	1
10	70	30	1
15	5	95	1
20	5	95	1
21	95	5	1
25	95	5	1



Şekil 4.13. Yöntem 12 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

Yöntem 11’de tüm piklerin 3 dakika içinde gelmiş olmasından kaynaklı problemi gidermek için, Yöntem 12’de, analizin ilk 15 dakikasında mobil faz oranları değiştirilerek iki farklı polaritede çözgen karışımı oluşturulması öngörülmüştür. Bu amaçla 0-10 dakika aralığında mobil faz A oranı %95’den %70’e yavaş bir şekilde azaltılmış, 10-15 dakika aralığında ise mobil faz A oranını %70’den %5’e hızlı bir şekilde azaltılmasıyla, piklerin ayrımı yöntem 11’e göre daha iyi

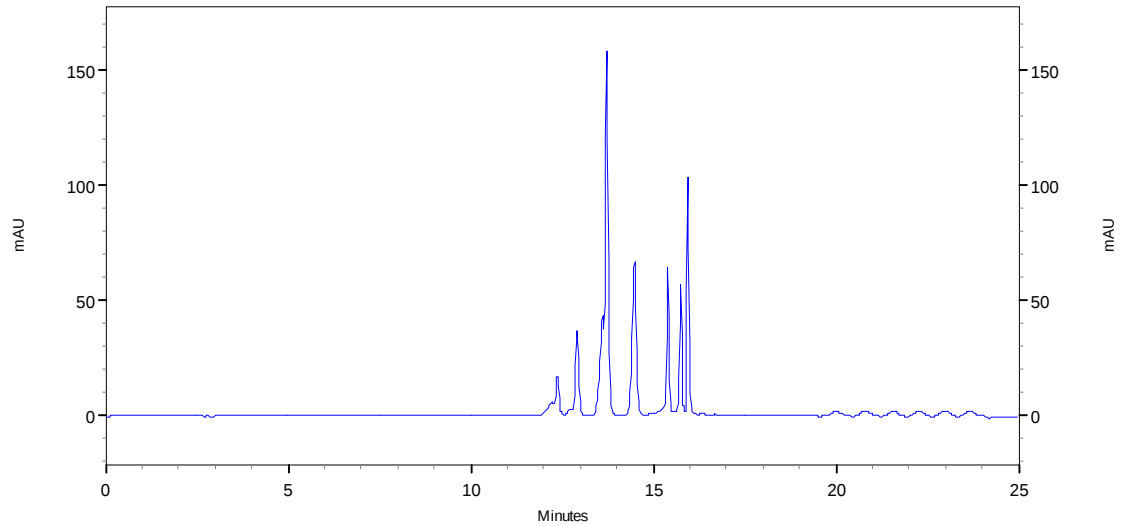
sağlanmıştır. Ancak enrofloksasin ve sülfadimidin standartlarının kromatografik ayrımı iyi sağlanamamıştır.

• **HPLC-DAD Yöntem 13**

Mobil Faz A : % 0,1 Formik Asit (pH = 2,71)
Mobil Faz B : Asetonitril (% 100)
Kolon : ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm
Örnek Hacmi : 20 µL
Dedektör : 280 nm
Basınç : 145 Bar
Sıcaklık : 25°C
Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C: 10 mg/L)

Çizelge 4.15. Yöntem 13 için uygulanan gradient elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı mL/dk
0-10	100	0	1
10-15	75	25	1
15-21	5	95	1
21-25	100	0	1



Şekil 4.14. Yöntem 13 ile elde edilen standart karışımına ait HPLC-DAD kromatogramı

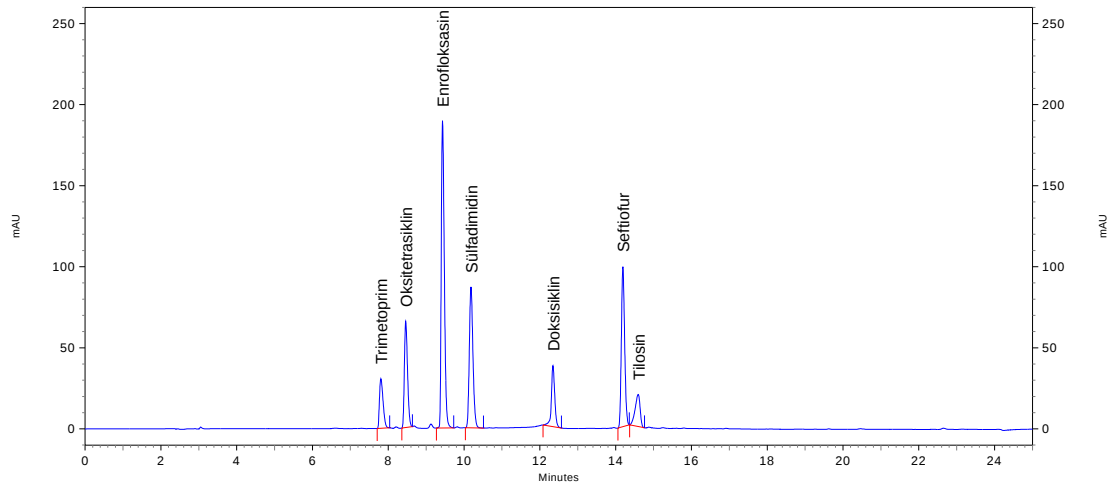
Yöntem 13’de hedeflenen, enrofloksasin ve sülfadimidin standart piklerinin ayrımı sağlanmıştır. Geliştirilen metot ile çalışılan yedi ilaç etken maddelerinin ayrımı yapılmıştır. Metotta küçük değişiklikler yapılarak pik şekillerin düzeltilmesi amaçlanmıştır.

• **HPLC-DAD Yöntem 14**

Mobil Faz A : % 0,1 Formik Asit (pH= 2,71)
 Mobil Faz B : Asetonitril (%100)
 Kolon : ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm
 Örnek Hacmi : 20 µL
 Dedektör : 280 nm
 Basınç : 145 Bar
 Sıcaklık : 25°C
 Standart karışım : Enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin (C: 10 mg/L)

Çizelge 4.16. Yöntem 14 için uygulanan gradient elüsyon programı

Zaman, dk	Mobil Faz A, %	Mobil Faz B, %	Akış Hızı, mL/dk
0-10	90	10	1
10-15	65	35	1
15-21	5	95	1
21-25	90	10	1

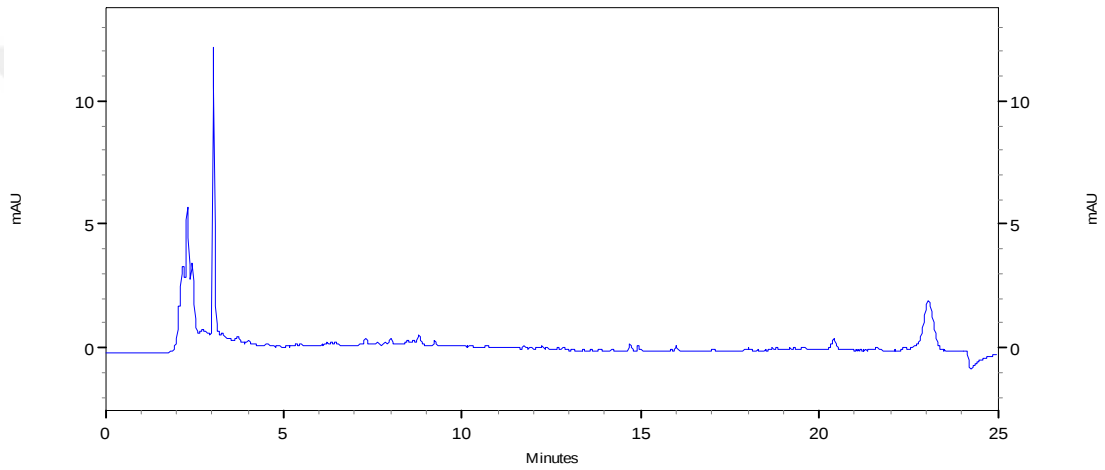


Şekil 4.15. Yöntem 14 ile elde edilen standart karışıma ait HPLC-DAD kromatogramı

Geliştirilen Yöntem 14 ile hedeflenen analitlerin rezölüsyonu sağlanmıştır. HPLC-DAD ile kromatografik ayırımına ilişkin optimum koşullar, Yöntem 14 ile belirlenmiş ve örneklerle uygulanmıştır. Bu nedenle örneklerin analizine ait bulgularda, Yöntem 14 “**geçerli yöntem**” olarak adlandırılmıştır.

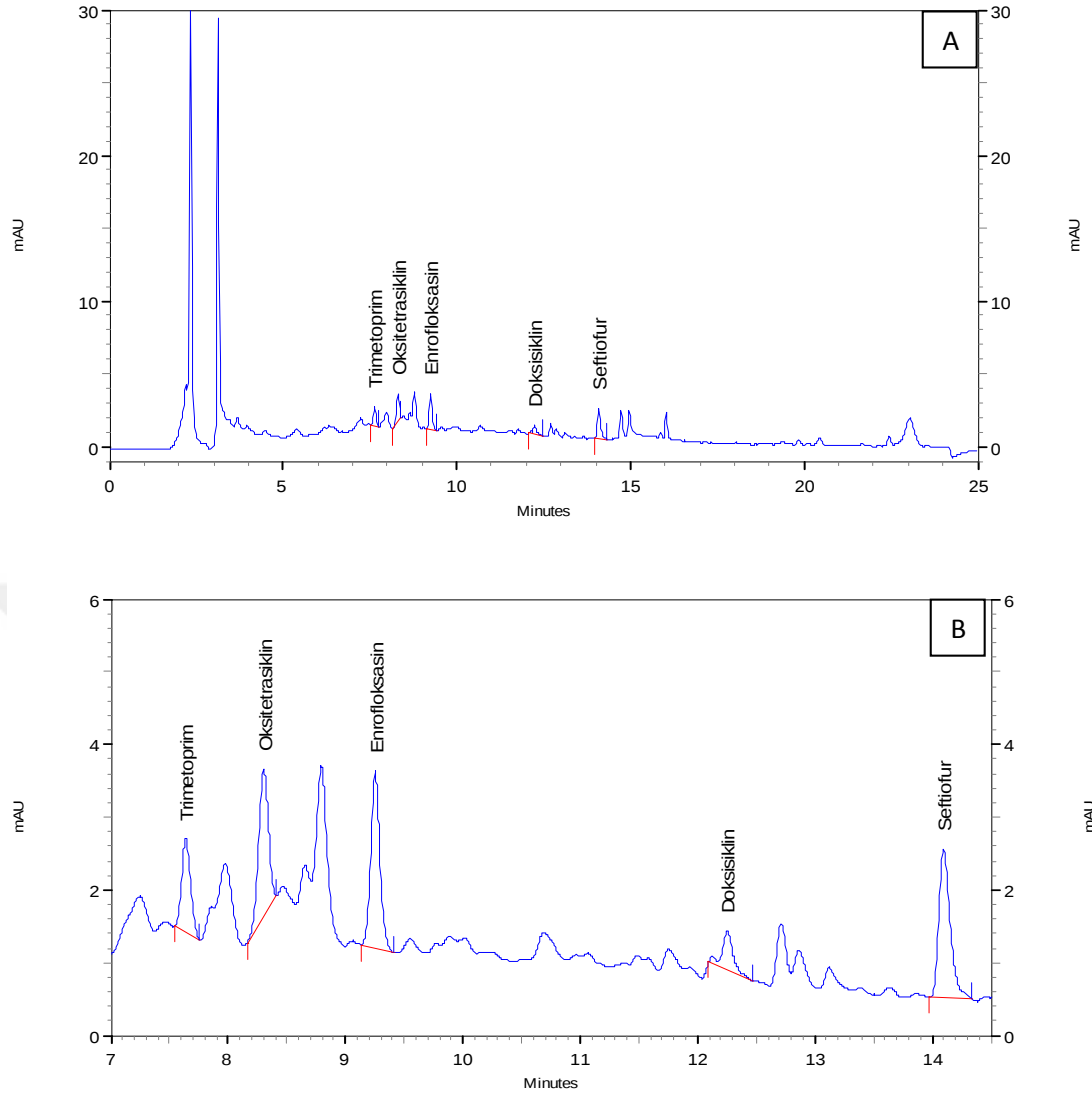
4.2.6. Tavuk çiftliğinden alınan örneklerin analizleri

Tavuk çiftliklerinden alınan atık su örnekleri, laboratuvara getirildikten sonra Bölüm 4.2.3’de verildiği gibi analiz için hazırlandı. Atık sularda bulunması muhtemel yedi veteriner ilaç etken maddesinin HPLC-DAD ile kromatografik ayırımına ilişkin optimum koşullar “Yöntem 14” ile sağlandı. Bu örnekler, ön deriştirme işlemi uygulanmadan doğrudan geçerli yöntemde verilen optimize edilmiş kromatografik koşullarda analizlendiğinde Şekil 4.15’de verilen HPLC-DAD kromatogramı ele edildi.



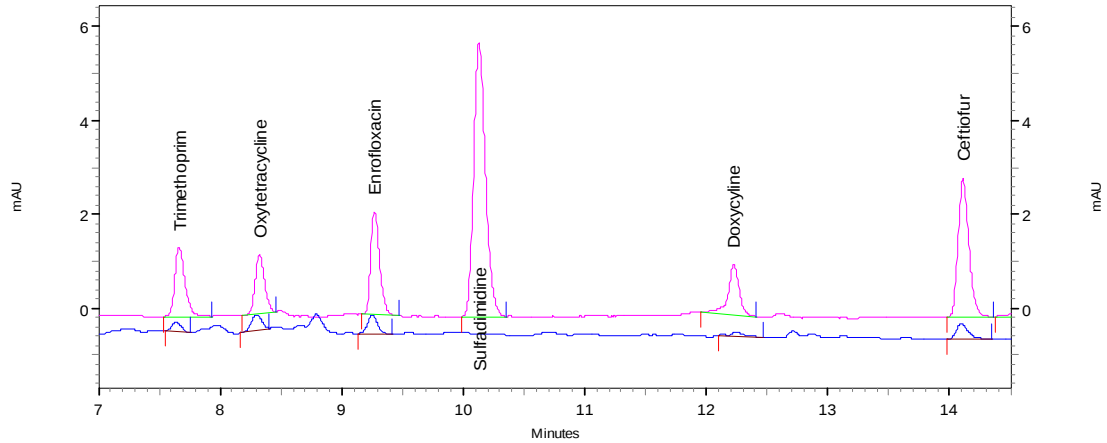
Şekil 4.16. Önderiştirme yapılmamış atık su örneğine (pH=4) ait HPLC-DAD kromatogramı.

Atık su örnekleri, Bölüm 4.2.4’de verilen katı faz ekstraksiyonu işlemlerinden geçirildikten sonra yani önderiştirme işlemlerinden sonra yine geçerli yöntemle analizlendiklerinde Şekil 4.16’da verilen kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 4.17. SPE ile önderiştirme işlemi uygulanmış örneğe (pH=4) ait HPLC-DAD kromatogramı (A geniş, B dar skalada kromatogram)

Şekil 4.15’de görüldüğü gibi önderiştirme işlemi uygulanmadan doğrudan örneklerin analizinde ilaç etken maddeleri belirlenemezken; ön deriştirme işlemi uygulandıktan sonra etken maddeler tayin edilebilir hale gelmiştir. Yedi ilaç etken maddesini içeren standart karışım çözeltisi ve önderiştirme sonrası örnek suyuna ait kromatogramların çakıştırılmış şekilleri Şekil 4.17’de görülmektedir.



Şekil 4.18. İlaç etken maddesini içeren standart (pembe) ve SPE ile önderiştirme uygulanmış örnek suyuna (pH=4) ait (mavi) çakıştırılmış kromatogram.

4.2.7. Katı faz ekstraksiyonu için koşulların optimizasyonu

pH'in etkisi

Tez çalışmasında analizi yapılan ilaçların çoğu amfoterik özellik gösterdiğinden, analitleri ayırmak için hidrofobik ve polar özelliğe sahip; hidrofilik-lipofilik balans (HLB) SPE kolonların kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla, ticari olarak satılan Oasis HLB 500 mg SPE kolonları kullanılmıştır. Gerek ilaç etken maddelerinin pH'a bağlı çözünme dengelerini ve gerekse SPE çalışmalarında ayırma ve önderiştirmeyi etkilediği için öncelikle uygun pH belirlenmiştir. Uygun pH'ı belirlemek amacıyla, bölüm 4.2.3'de verilen ön işlemler yapıldıktan sonra, örnek çözeltilerinin pH'ı 2, 4 ve 7 olarak ayarlandı. Her bir pH daki atık su örneklerine ayrı ayrı, ilaç etken maddelerinin standart çözeltilerinden belirli derişimlerde eklendi. Gerçek atık su örnekleri, Bölüm 4.2.4'de verilen SPE işlemlerinden geçirildikten sonra HPLC-DAD ile geçerli yöntemle göre (Yöntem 14) analizlenmişlerdir. Farklı pH' larda ele geçen sonuçlar Çizelge 4.17'de verilmiştir.

Çizelge 4.17'den görüldüğü gibi farklı pH' lara ayarlanmış atık su örneklerine eklenen iki farklı derişimlerdeki ilaç etken maddelerinin en iyi geri kazanım oranı pH 4 ile sağlanmıştır.

Çizelge 4.17. pH'ı farklı atık su örneklerine eklenen ilaç etken maddelerinin SPE ile geri kazanım oranları

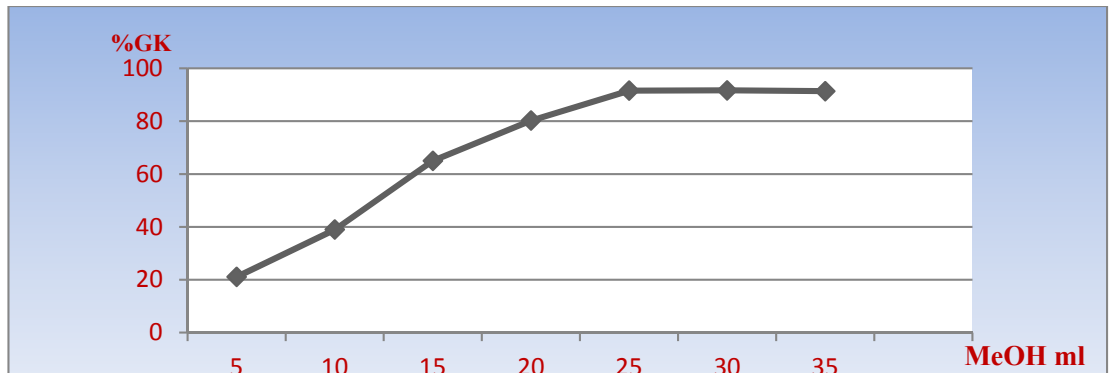
Etken madde	Eklenen, mg/L	% Geri kazanım		
		pH=2	pH=4	pH=7
Enrofloksasin	10,00	71,12±1,21	88,92±0,67	75,40±1,09
Seftiofur	10,00	87,63±0,89	95,92±0,74	78,12±0,88
Oksitetrasiklin	10,00	68,05±0,57	91,98±0,14	89,74±0,72
Doksisiklin	10,00	71,43±0,97	84,53±0,77	68,37±1,12
Trimethoprim	10,00	59,74±0,71	81,22±0,28	78,82±0,87

n=3, ($X_{ort} \pm sd$)

Etken madde	Eklenen, mg/L	% Geri kazanım		
		pH=2	pH=4	pH=7
Enrofloksasin	0,25	70.45±0.98	93.78±0.61	75.40±1.09
Seftiofur	0,25	80.23±0.92	94.32±0.80	76.10±0.78
Oksitetrasiklin	0,25	63.08±0.60	92.08±0.22	87.64±0.76
Doksisiklin	0,25	68.51±0.98	88.70±0.67	61.37±1.09
Trimethoprim	0,25	52.01±0.23	84.85±0.32	60.09±1.05
Sulfadimidine	0,25	81.24±0.90	92.07±0.89	70.08±0.98
Tylosin	0,25	68.04±0.71	86.42±0.71	69.94±0.87

n=3, ($X_{ort} \pm sd$)

Ekstraksiyon metodunun yıkama adımında, kolonda tutulan ilaç etken maddelerinin yıkama suyuna geçip geçmediği (pH'ı 4 olan saf su) kontrol edilmiştir. Bu amaçla Bölüm 4.2.4'de uygulanan işlemlerde, yıkama adımından ele geçen çözelti, geçerli yöntemle HPLC-DAD ile analizlenmiş ancak kolon yıkama suyunda çalışılan etken maddeler tespit edilmemiştir. Bu sonuç yıkama ile kayıpların olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.19. Katı faz ekstraksiyonunun elüsyon aşamasında kullanılan solvent miktarına karşı geri kazanım grafiği

Örnek geçirildikten sonra, kolonda tutulan ilaç etken maddelerinin metanol ile elüsyonunda, kademeli olarak elüsyon hacmi artırılmış ve en yüksek geri kazanım oranı 25 mL metanol hacmi ile sağlanmıştır (Şekil 4.19).

4.2.8. Atık su numunelerinde tespit edilen ilaç derişimleri

Tavuk yetiştirme çiftliğinden, ağustos, ekim ve aralık ayları olmak üzere, üç tavuk yetiştirme periyodu sonrası, tesis yıkama suyundan numuneler alınmıştır. Alınan numuneler laboratuvara getirildikten sonra, Bölüm 4.2.3’de anlatıldığı gibi analize hazırlanıp, Bölüm 4.2.4’de verilen SPE işlemlerinden geçirildikten sonra HPLC-DAD ile geçerli yönteme göre analizlenmişlerdir. Farklı dönemlerde alınan atık sulardaki ilaç kalıntılarının miktarları Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Atık sulardaki ilaç kalıntı derişimleri

Etken madde	Atık suda bulunana ilaç derişimleri, mg/L		
	Ağustos-2017	Ekim-2017	Aralık-2017
Enrofloksasin	0,13274 ± 0,00178	0,14223 ± 0,00208	0,14150 ± 0,00199
Seftiofur	0,02264 ± 0,00192	0,03456 ± 0,00181	0,04605 ± 0,00171
Oksitetrasiklin	0,05562 ± 0,00268	0,08167 ± 0,00187	0,08030 ± 0,00252
Doksisiklin	0,14457 ± 0,00074	0,14314 ± 0,00092	0,17199 ± 0,00089
Trimethoprim	0,17567 ± 0,00398	0,17981 ± 0,00457	0,20482 ± 0,00438

n=5, ($X_{ort} \pm Sd$)

4.3. Kromatografik Analizlerin Validasyonu

Bölüm 4.2.1’de hazırlanışı anlatılan, ara stok çözeltilerinden elde edilen (10 mg/L) seftiofur, tilosin, trimetoprim, oksitetrasiklin, enrofloksasin, sülfadimidin ve doksisiklin maddelerini içeren standart çözelti karışımına, geçerli yöntemin uygulanması ile elde edilen validasyon sonuçları aşağıda verilmiştir.

Kapasite Faktörü (k')

Standartların kapasite faktörlerini belirlemek için kullanılan t_0 değeri 2,1056±0,0198 olarak belirlenmiştir. İyi bir kromatografi metodunda, herbir standartın kapasite faktör değerinin, $2 < k' < 10$ aralığında olması gerekmektedir [USP monograf]. Buna göre, her bir standart için manuel hesaplanan ve cihaza hesaplatılarak belirlenen, kapasite faktörleri Çizelge 4.19’ de verilmiştir.

Teorik Plaka Sayısı (N)

İyi bir kromatografik sistem için, kolon performansını ve etkinliği belirleyen teorik plaka sayısı 2000'den büyük olmalıdır. Buna göre, herbir standart için manuel hesaplanan ve cihaza hesaplatılarak belirlenen, teorik plaka sayıları Çizelge 4.19' de verilmiştir.

Kuyruklanma ve Pik Simetri Faktörleri

Pik kuyruklanma faktörünün 1 olması pikin simetrik olduğunu gösterir. Kuyruklanma faktörü $0,5 \leq T \leq 2$ aralığında ve pik simetri faktörü ise $0,5 \leq T \leq 1,5$ aralığında olmalıdır. Herbir standart için cihaza hesaplatılarak belirlenen, kuyruklanma ve pik simetri faktörleri Çizelge 4.19' de verilmiştir.

Çizelge 4.19. Optimize edilen HPLC-DAD analiz yöntemi için validasyon parametreleri

Standartlar	Kuyruklanma Faktörü	Pik Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Kapasite Faktörü (k')
Enrofloksasin	1,299	1,344	74512	3,414
Seftiofur	1,188	1,218	118056	5,720
Oksitetrasiklin	1,140	1,132	51622	2,964
Doksisiklin	0,887	0,831	103912	4,821
Trimethoprim	1,287	1,355	41716	2,649
Sülfadimidin	1,194	1,227	51205	3,824
Tilosin	0,863	0,836	87534	5,973

Seçicilik (α) ve Ayırma Faktörü(R)

Her bir standart için manuel hesaplanan ve cihaza hesaplatılarak belirlenen, seçicilik ve ayırma faktörleri Çizelge 4.20' da verilmiştir.

Çizelge 4.20. Optimize edilen HPLC-DAD analiz yöntemi için seçicilik ve ayırma faktörleri

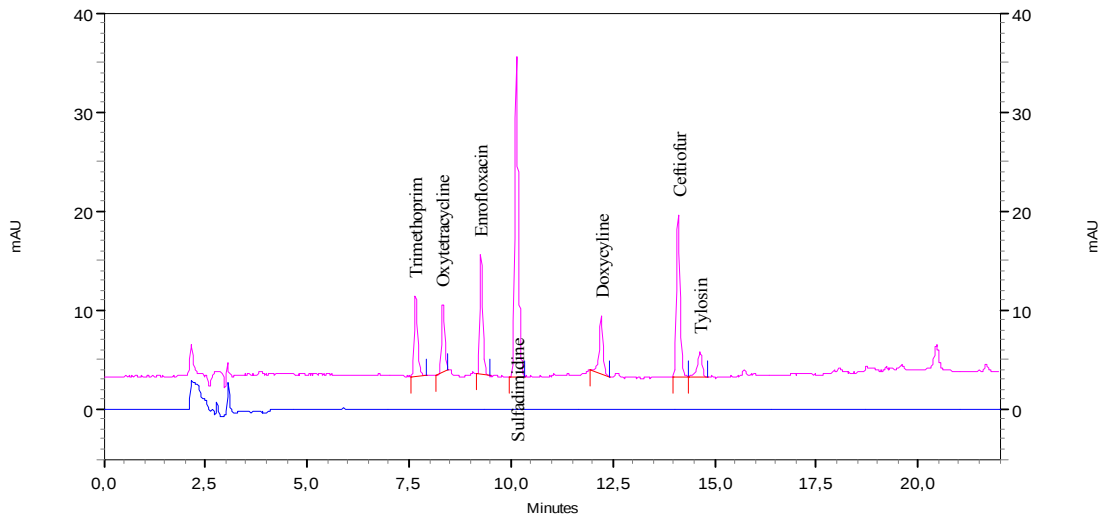
Standartlar	Seçicilik (α)	Ayırma Faktörü(R)
Trimethoprim- Oksitetrasiklin	1,121	4,584
Oksitetrasiklin- Enrofloksasin	1,152	6,964
Enrofloksasin- Sülfadimidin	1,120	4,805
Sülfadimidin- Doksisiklin	1,262	13,856
Doksisiklin- Seftiofur	1,186	11,476
Seftiofur- Tilosin	1,044	2,670

Ayırma faktörünün 1,5 olması iki bileşiğin tamamen ayrıldığı anlamına gelmektedir. İyi bir kromatografi metodunda seçicilik faktörü $\alpha > 1$ olmalıdır, ki uygulanan gradient program ile Tablo 4.20’den de görüldüğü gibi bu sağlanmıştır.

4.4. Uygulanan Analiz Yöntemine Ait Parametreler

Matriks etkisi

İçerisinde ilaç analizi yapılacak olan atık su, başta inorganik çözünmüş iyonlar olmak üzere farklı organik bileşenler de içerebilir. Bu bileşenler gerek SPE analizinde geri kazanma verimini ve gerekse HPLC-DAD analizlerinde kromatografik ayırmaları etkileyebilirler. Bu nedenle analizlerde matriks etkisine mutlaka bakılmalıdır. Bu çalışmada; atık su örneklerinin alındığı tavuk çiftliğinde bulunan kuyu suyu (veteriner ilaçları içermeyen), matriks etkisini gözlemlemek için kullanılmıştır. Matriks etkisini gözlemlemek için, analit içermeyen kuyu suyu ve belli derişimlerde ilaç etken maddelerinin eklendiği kuyu suyu, ayrı ayrı SPE işleminden geçirilmiş ve ardından kromatografik analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.20. Doğrudan kuyu suyunun (pH=4) ve 10 mg/L derişimlerinde standart eklenmiş kuyu suyunun SPE işleminden sonra HPLC-DAD kromatogramları

Şekil 4.19’de görüldüğü gibi, gerek etken maddelerin SPE’den elde edilen geri kazanım verimlerinde ve gerekse standart maddelerin kromatografik analizlerinde alıkonma zamanında veya bağıl alıkonma zamanlarında, kuyu suyu içerisinde bulunan matriks bileşenlerinin etkisi gözlenmemiştir.

Ölçüm alt limiti (LOD)

Bir analitik yöntemin alt tayin limiti, analizi yapılan maddenin dedekte edilebildiği ve kantitatif olarak tayinin zorlaştığı en düşük derişimdir. Etken maddelerin analizi için geliştirilen, HPLC-DAD analiz yönteminin LOD değerini belirlemek için sinyal/gürültü (S/N) oranının 3 olması gerektiği yaklaşımı kullanılmıştır. Her bir etken maddenin, 10 mg/L' lik çalışma standartlarından ayrı ayrı seyreltmeler yapılarak, geçerli yöntemle HPLC-DAD analizleri yapılmış ve sinyan/gürültü oranının 3 olduğu derişimler belirlenmiştir. Belirlenen LOD değerleri Çizelge 4.21'de görölmektedir.

Tayin alt derişimi (LOQ)

Bir analitik metodun, alt derişim limiti (LOQ) test edilen maddelerin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile sayısal olarak ölçüm yapılabilen en düşük derişimidir. Etken maddelerin analizi için geliştirilen, HPLC miktar tayini metodunun, LOQ değerini belirlemek için sinyal/gürültü (S/N) oranının 10 olması gerektiği yaklaşımı kullanılmıştır. Herbir etken maddenin, 10 mg/L' lik çalışma standartlarından ayrı ayrı seyreltmeler yapılarak, geçerli yöntemle HPLC-DAD analizleri yapılmış ve sinyan/gürültü oranının 10 olduğu derişimler belirlenmiş ve Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Geçerli yöntemle çalışma aralığının belirlenmesi

Çalışılan ilaç etken maddelerinin belirli derişimlerde standart çözeltilerinden oluşan standart karışım çözeltilerinin, geçerli yöntemle HPLC-DAD analizi için lineer çalışma aralığı Çizelge 4.21'de verilmiştir. Ayrıca HPLC-DAD analizleri için optimize edilen ayırma koşullarına göre, çalışılan veteriner ilaçlarının 0,10, 2,50, 5,0 10,0 15,0 20,0 mg/L derişim aralığında standart çözeltileri her bir ilaç için ayrı ayrı hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri her derişimin verdiği pik alanları dikkate alınarak oluşturulmuştur. Standart çözeltiler HPLC-DAD sistemine 3 kez enjekte edilmiş ve doğrusalılık çalışması 3 gün süreyle tekrar edilmiştir. Standartların kalibrasyon eğrileri ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.22 ve Şekil 4.23' de verilmiştir.

Çizelge 4.21. İlaç etken maddelerinin HPLC-DAD analizi için doğrusal kalibrasyon aralığı, LOD ve LOQ değerleri

İlaç etken maddesi	Derişim, mg/L	X _{ort} LOD, mg/L	X _{ort} LOQ, mg/L
Enrofloksasin	0,04-20	0,017	0,046
Seftiofur	0,01-20	0,005	0,017
Oksitetrasiklin	0,09-20	0,032	0,093
Doksisiklin	0,07-20	0,025	0,072
Trimethoprim	0,08-20	0,027	0,089
Sülfadimidin	0,05-20	0,012	0,056
Tilosin	0,09-20	0,048	0,098

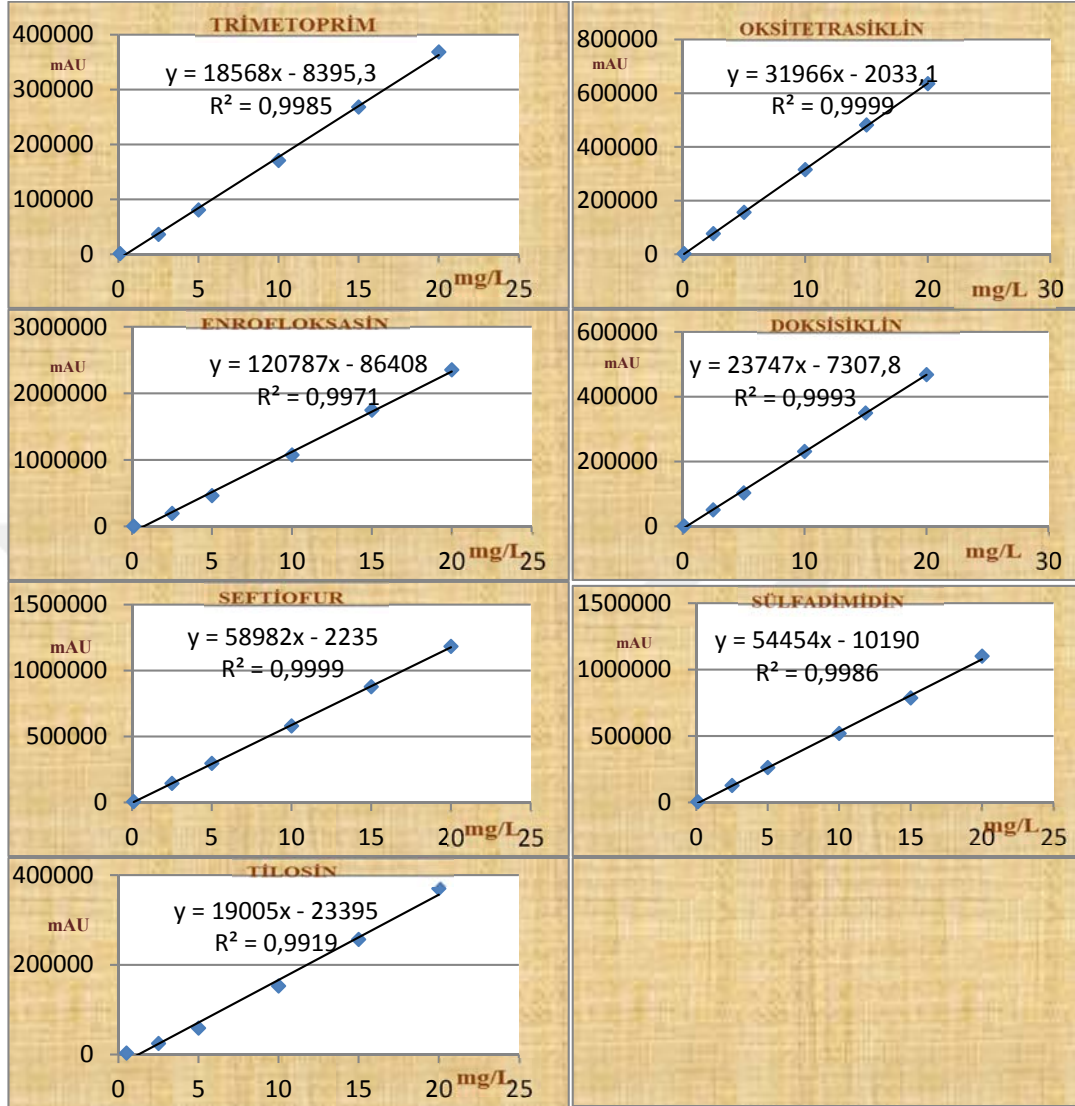
n=6

Çizelge 4.22. İlaç etken maddelerinin kalibrasyon grafiklerine ait veriler

İlaç	Kalibrasyon Denklemi (y=mx+n)	R ²	% CV (Eğim)
Enrofloksasin	120787x-86408	0,9971	1,79
Seftiofur	58982x-2235	0,9999	0,45
Oksitetrasiklin	31966x-2033,1	0,9999	1,27
Doksisiklin	23747x-7307,8	0,9993	2,55
Trimethoprim	18565x-8395,3	0,9985	0,42
Sülfadimidin	54454x-10190	0,9986	0,56
Tilosin	19005x-23395	0,9919	0,60

n=9

Çizelge 4.23. Standart karışım çözeltisindeki her bir bileşene ait kalibrasyon grafikleri



n=9

4.5. Uygulanan Analiz Yönteminin Doğruluğunun Belirlenmesi

Uygulanan SPE yönteminin doğruluğu, atık su örneklerine belirli derişimlerde standartların eklenmesi ve geri kazanım (recovery) çalışmaları ile belirlenmiştir. Geri kazanım çalışması için öncelikle atık su numunesine, katı faz ekstraksiyonu uygulanmıştır. Daha sonra 500 mg/L'lik standart stok çözeltilerin her birinden 60 µL alınarak 15 ml'lik atık suyun içerisine 2 mg/L derişimi olacak şekilde ilave edilmiştir. Standartların eklendiği atık su numunesi SPE kolonlarından Bölüm 4.2.4'de verilen işlemlerden geçirildikten sonra HPLC-DAD ile ilaçların analizleri yapılmıştır. Bu şekilde ele geçen geri kazanım verimleri Çizelge 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.24. İlaç eklenmiş atık su örneklerinden SPE sonrası ilaçların geri kazanımı

Eklenen ilaç	Geri Kazanım, % n=3, ($X_{ort} \pm sd$)	RSD, % ($sd/X_{ort} * 100$)	Güven Aralığı, 95% ($X_{ort} \pm t_{n-1} \times s/\sqrt{n}$)
Enrofloksasin	95,06 $\pm$ 0,59	0,67	93,58 - 96,54
Seftiofur	96,37 $\pm$ 0,71	0,74	94,60 - 98,14
Oksitetrasiklin	92,35 $\pm$ 0,13	0,14	92,03 - 92,67
Doksisiklin	88,70 $\pm$ 0,65	0,77	87,08 - 90,32
Trimethoprim	84,93 $\pm$ 0,23	0,28	84,36 - 85,50

5. SONUÇ

5.1. HPLC-DAD Kromatografik Metot Geliştirme Çalışmaları Sonuçları

Yaptığımız bu çalışmada, Türkiye’de tavuk yetiştiriciliğinde sıklıkla kullanılan; enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin ilaçlarının, eş zamanlı analizini hassas bir şekilde sağlayan, düşük dedekte edilebilme sınırlarına sahip, analiz süresi kısa ve yüksek pik seçiciliği sunan “Ters Faz-HPLC-DAD Miktar Tayini Metodu” geliştirilmesine odaklanılmıştır.

Bu amaçla, kromatografik ayırmalar için birbirinden farklı iki sabit faz (HPLC Kolonu) ile çalışılmıştır. Kullanılan sabit fazlar, ACE5 CN 125 x 4,0 mm, 5 μ m ve ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 μ m dir. Yöntem geliştirmek amacıyla öncelikle “ACE CN” kolonda, 0,01 M Oksalik Asit (pH=2,17) - Asetonitril mobil faz çifti ile izokrotik ve gradient elüsyon sistemleri denenmiştir. Bu denemeler kapsamında HPLC yöntem 1, yöntem 2, yöntem 3, yöntem 4 ve yöntem 5 sistemleri geliştirilip, değerlendirilmiştir. Yöntem 5’de, çalışılan analitlerin rezölüsyonu sağlanmıştır, ayrıca sistemin doğru olduğunu gösteren sistem uygunluk parametrelerinin sonuçları da uygundur. Ancak “ACE CN” kolon ile denen 5 HPLC metodun tamamında, gradientin sistemindeki değişimin başlangıç anından itibaren baseline kayması yaşanmıştır. Çalışılan analitlerin tamamını daha düzlemsel bir baseline da elde etmek amacı ile “ZORBAX Eclipse XDB” kolonu ile denemelere devam edilmiştir.

Çalışmaların devamında kullanılan ‘‘ZORBAX Eclipse XDB’’ kolunda, mobil faz sistemi olarak 0,02 M Na₂HPO₄ (pH=3) – metanol ve 0,02 M Na₂HPO₄ (pH=3) – asetonitril, mobil faz sistemleri denenmiştir. Kullanılan bu tampon sistemleri hassas ve anlık polarite farkı yaratmaya izin vermediği için, hedeflenen yedi analiti, istenilen alıkonma zamanında görünmesine olanak sunmamıştır. Daha sonra aynı kolanla okzalik asit – asetonitril mobil faz sisteminin kullanılmasına karar verildi.

‘‘ZORBAX Eclipse XDB’’ kolunda, Okzalik asit – Asetonitril mobil faz sistemi Yöntem 8’ den itibaren kullanılmıştır. Yöntem 8 ile yapılan metot geliştirme çalışmalarında, ayrımı yapılmak istenen, yedi ilaç etken maddelerinin pikleri, 14 - 21 dakika aralığında elde edilmiştir. Bu metotta kolonu ilk terk eden trimethoprim, oksitetrasiklin standartları ve kolonu en son terkeden doksisisiklin, seftiofur ve tilosin standartlarının ayrımı yapılmıştır. Ancak enrofloksasin ve sülfadimidin standartlarının ayrımı yapılamamıştır. Yöntem 8’de elde edinilen mobil faz sistemi üzerinden değişiklikler yapılarak metodun geliştirilmesine devam edildi. Enrofloksasin ve sülfadimidin standartlarının rezölüsyonunu sağlamak için yöntem 8’ de kullanılan mobil faz çiftinin oranları ile oynanarak ani polarite farkı oluşturulup, yedi ilaç etken madde piklerinin 8 - 15 dakika aralığına getirilmesi sağlandı (Yöntem 9). Daha sonra gardient sistemin apolorlığı arttırılarak piklerin 21. dakikadan sonraki durumları gözlemlendi (Yöntem 10).

Yapılan ön denemeler sonucunda elüsyon sisteminde mobil faz A oranını yüksek tutarak metodu başlatıp, sonraki 20 dakikada bu oranı kademeli olarak azaltacak denemeler yapılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla yöntem 11 geliştirilmiştir.

Yöntem 11’de yapılan değişiklikler ile geçerli metot olan yöntem 14 geliştirilmiş ve hedeflenen analitlerin rezölüsyonu sağlanmıştır. Geçerli yöntemin doğru ve geçerli olduğunu göstermek amacıyla yöntem valide edilmiştir.

5.2. Yöntem Validasyon Sonuçları

Elde edilen validasyon sonuçlarına göre, enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin analitlerine ait piklerin kuyruklanma faktörleri, pik simetri faktörü, teorik plaka sayısı ve kapasite faktörleri Çizelge 4.25’de verilmiştir. Her bir standart için hesaplanan, **seçicilik faktörleri 1,044-1,262** aralığında ve **ayırma faktörleri ise 2,670-13,856** aralığında bulunmuştur.

Çizelge 4.25. Yöntem 14 ile yapılan validasyon sonuçları

Standartlar	Kuyruklanma Faktörü	Pik Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Kapasite Faktörü (k')
Enrofloksasin	1,299	1,344	74512	3,414
Seftiofur	1,188	1,218	118056	5,720
Oksitetrasiklin	1,140	1,132	51622	2,964
Doksisiklin	0,887	0,831	103912	4,821
Trimethoprim	1,287	1,355	41716	2,649
Sülfadimidin	1,194	1,227	51205	3,824
Tilosin	0,863	0,836	87534	5,973

Bu çalışmanın validasyonunda öncelikle **matriks etkisine** bakıldı. Atık su örneklerinin alındığı tavuk çiftliğinde bulunan kuyu suyu (veteriner ilaçları içermeyen), matriks etkisini gözlemlemek için kullanılmıştır. Matriks etkisini gözlemlemek için, analit içermeyen kuyu suyu ve belli derişimlerde ilaç etken maddelerinin eklendiği kuyu suyu, ayrı ayrı SPE işleminden geçirilmiş ve ardından kromatografik analizleri yapılmıştır. Gerek etken maddelerin SPE'den elde edilen geri kazanım verimlerinde ve gerekse standart maddelerin kromatografik analizlerinde alıkonma zamanında veya bağıl alıkonma zamanlarında, kuyu suyu içerisinde bulunan matriks bileşenlerinin etkisi gözlenmemiştir.

Her bir etken maddenin, 10 mg/L' lik çalışma standartlarından ayrı ayrı seyreltmeler yapılarak, geçerli yöntemle HPLC-DAD analizleri yapılmış ve sinyan/gürültü oranının 3 olduğu derişimler, 6 tekrar ile belirlenmiştir. Belirlenen **LOD değerleri**; enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin analitleri için sırasıyla; **0,017, 0,005, 0,032, 0,025, 0,027, 0,012 ve 0,048 mg/L**'dir.

Her bir etken maddenin LOQ değerlerini belirlemek için sinyan/gürültü oranının 10 olduğu derişimler, 6 tekrar ile belirlenmiştir. Belirlenen **LOQ değerleri**; enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisiklin, trimethoprim, sülfadimidin ve tilosin analitleri için sırasıyla; **0,046, 0,017, 0,093, 0,072, 0,089, 0,056, 0,098 mg/L**'dir.

Çalışılan ilaç etken maddelerinin belirli derişimlerde standart çözeltilerinden oluşan standart karışım çözeltilerinin, geçerli yöntemle HPLC-DAD analizi için **lineer çalışma aralığı** herbir etken madde için sırasıyla; **0,04-20, 0,01-20, 0,09-20, 0,07-20, 0,08-20, 0,05-20 ve 0,09-20 mg/L** olarak bulunmuştur.

Metot validasyonu kapsamında, çalışılan veteriner ilaçlarının 0,10, 2,50, 5,0 10,0 15,0 20,0 mg/L derişim aralığında standart çözeltileri her bir ilaç için ayrı ayrı hazırlanmış ve **kalibrasyon eğrileri** oluşturulmuştur. Standart çözeltiler HPLC-DAD sistemine 3 kez enjekte edilmiş ve doğrusalılık çalışması 3 gün süreyle tekrar edilmiştir. Analitlerin kalibrasyon eğrileri ile elde edilen **R² değerleri, 0,9919 - 0,9999** aralığında bulunmuştur.

5.3. Katı Faz Ekstraksiyonu Metot Geliştirme Çalışmaları

İlaçların çoğu amfoterik özelliğe sahip olduğu için, yöntem geliştirmedeki en önemli adım örnek hazırlama prosedürüdür. Literatürlerde SPE ters fazdan bahsedilmektedir, fakat serbest silanol gruplarına kuvvetli bir şekilde bağlı olan amfoterik ilaçlar standart organik solventlerle elüe edilemezler. İncelediğimiz çoğu ilacın amfoterik doğasından kaynaklı problemlerin üstesinden gelmek için işlevsel SPE metaryeli kullanıldı. Analitleri ayırmak için hidrofobik ve polar özelliğe sahip hidrofilik-lipofilik balans (HLB) kartüşler kullanmak avantajlı olmuştur [70].

İncelenen sülfonamid, en az iki nitrojen gruba sahiptir. Sülfüre bağlı amit N¹ olarak belirtilir ve pH 6.5-7.4 arasında deprotonlanır. Aromatik halkaya bağlı amit N⁴ olarak belirtilir ve pH 2.5'te protonlanır. Bu nedenle sülfonamid asidik koşullarda pozitif olarak yüklenir, pH 2.5 ve 6 arasında nötraldir ve alkali koşullarda negatif olarak yüklenir. Trimethoprim için iki heterosiklik nitrojen atomunu (N¹ ve N³) protonlayan iki pKa değeri vardır. Florokinonlar (Enrofloksasin), piperazinil amino gruplarından (N⁴) protonazosyanundan ve karboksilik asit gruplarının deprotonazosyanından dolayı asidik koşullarda katyoniktir (pKa₁= 5.86, pKa₂= 8.24). Tetrasiklinler üçten daha küçük pH'larda katyoniktir ve bu pH'nın yukarısında zwitter iyonudur [71]. Sülfonamidler ve tetrasiklinler amfoterik bileşiklerdir ve tetrasiklinler kuvvetli asit koşulları altında kararsızdırlar [72].

Örnek çözeltinin pH'ı kontrol edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir. Bu amaçla örnek çözeltilerinin pH'sı 2, 4 ve 7 olarak ayarlandı. pH kontrolünün yanısıra, çeşitli organik çözücüler elüentler olarak test edildi (asetonitril, metanol ve etanol). Farklı pH'lara ayarlanmış atık su örneklerine eklenen belli derişimlerdeki ilaç etken maddelerinin, en iyi geri kazanım oranı pH=4 ve elüent olarak metonol kullanıldığında sağlanmıştır. Ekstraksiyon etkinliği **geri kazanım** deneyleri ile kontrol edildi ve elde edilen sonuçlar; enrofloksasin, seftiofur,

oksitetrasiklin, doksisisiklin ve trimethoprim için sırasıyla; % 95,06 ± 0,59, % 96,37 ± 0,71, % 92,35 ± 0,13, % 88,70 ± 0,65, % 84,93 ± 0,23 olarak bulunmuştur.

5.4. Atık Su Numunelerinde Tespit Edilen İlaç Miktarları

Tavuk yetiştirme çiftliğinden, ağustos, ekim ve aralık ayları olmak üzere, üç tavuk yetiştirme dönemi sonrası, tesis yıkama suyundan numuneler alınmıştır. Alınan numuneler laboratuvara getirildikten sonra, Bölüm 4.2.3’de anlatıldığı gibi analize hazırlanıp, Bölüm 4.2.4’de verilen SPE işlemlerinden geçirildikten sonra HPLC-DAD ile geçerli yönteme göre analizlenmişlerdir.

Farklı dönemlerde alınan atık sulardaki ilaç kalıntılarının miktarları **ağustos ayında**, enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin ve trimethoprim için sırasıyla; **0,13274 ± 0,00178, 0,02264 ± 0,00192, 0,05562 ± 0,00268, 0,14457 ± 0,00074 ve 0,17567 ± 0,00398 mg/L** olarak bulunmuştur.

Ekim ayında ilaç kalıntılarının miktarları, enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin ve trimethoprim için sırasıyla; **0,14223 ± 0,00208, 0,03456 ± 0,00181, 0,08167 ± 0,00187, 0,14314 ± 0,00092 ve 0,17981 ± 0,00457 mg/L** olarak bulunmuştur.

Aralık ayında ilaç kalıntılarının miktarları, enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin ve trimethoprim için sırasıyla; **0,14150 ± 0,00199, 0,04605 ± 0,00171, 0,08030 ± 0,00252, 0,17199 ± 0,00089 ve 0,20482 ± 0,00438 mg/L** olarak bulunmuştur.

6. TARTIŞMA

Türkiye’de tavuk yetiştirme çiftliklerde, yetiştirme sürecinde kullanılan veteriner ilaçlar, direk içme sularına eklenerek tavuklara uygulanmaktadır. Ayrıca oluşan atık sular, herhangi bir arıtım sürecine tabi tutulmadan toprağa verilmektedir. Yetiştirme dönemi sonunda tesisin tamamının yıkanması ile oluşan sularda, kullanılan ilaç kalıntılarının olup olmadığı, yapılan bu çalışmada incelenmek istenmiştir. Çünkü toprağa deşarj edilen atık sularda bulunan ilaçlar ekosisteme zarar vermektedir. Yapılan bu çalışma, ilaçların; birer kimyasal atık olduğu, imha edilmeden bertaraf edilmelerinin mümkün olmadığı ve ekosistem için zararlı olduğu, farkındalıklarını yaratmayı amaçlamıştır. Çevre kirliliğinin farkındalığını vurgulayan bilimsel çalışmaların artması, otoritelerin dikkatini çekip konu ile ilgili yasal düzenlemeler yapmaları yolunu, açabilir.

Yapılan bu çalışmayla, incelenen yedi veteriner ilacın, eş zamanlı analizinin 25 dakika gibi kısa bir sürede ve düşük maliyet ile yapılmasını sağlayan HPLC-DAD metodunun geliştirilmesi, ilaç üretim firmalarının, kalite kontrol laboratuvarları miktar tayini analizleri için de kolaylık sağlayacaktır. Çalışılan ilaçları üreten firmalar her ilaç için farklı bir HPLC metodu uygulamaktadır. Yedi ilaç için, yedi ayrı HPLC metodu kullanmak yerine, tek bir metot kullanmak kolon, kimyasal ve zaman sarfiyatını azaltacaktır. Ayrıca GC-MS/MS ve LC-MS/MS oldukça duyarlı, doğruluğu yüksek ve düşük dedeksiyon limitlerine sahip teknikler olmalarına rağmen pahalı, sofistike, daha donanımlı ve deneyimli kullanıcılar gerektirmeleri ve yaygın kullanım olanakları bulunmamalarından dolayı rutin uygulamalardan çok araştırma amaçlı çalışmalarda kullanılan tekniklerdir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, geliştirilen HPLC-DAD metodu ile, enrofloksasin, seftiofur, oksitetrasiklin, doksisisiklin, trimetoprim, sülfadimidin ve tilosin gibi birbirinden farklı gruptaki ilaçların eş zamanlı tayinde, oldukça düşük dedeksiyon limitleri elde edilmiştir.

Ayrıca çalışmanın bir diğer üstünlüğü de, literatür çalışmaları incelendiğinde, florokinolon (Enrofloksasin), Sefalosporinler, (seftiofur), tetrasiklin (oksitetrasiklin, doksisisiklin), Sülfonamid (sülfadimidin), Sülfonamid sinerjit (trimetoprim), ve Makrolidler (tilosin) gibi farklı gruplardan oluşan ilaçların eş zamanlı analizlerinin yapıldığı çalışma bulunmamaktadır.

Geliştirilen bu yöntemin literatürdeki çalışmalardan en önemli farkı ise, benzer gruplar ile yapılan çalışmalardan daha yüksek geri kazanımlar elde edilmesidir. Sandra Babic ve ark., [4] atık su matriksinde farklı sınıflardan veteriner ilaçların HPLC-DAD ile analizini yapmışlardır. Örnek temizleme adımı Oasis HLB ekstraksiyon kartuşu ile katı faz ekstraksiyonu yapmışlardır. Sülfonamid, sülfonamid sinerjit, tetrasiklin, florokinolon ve B-laktam grubu içeren ilaçları incelemişlerdir. Sülfonamid grubu için elde edilen % 11.2 geri kazanım dışında, geri kazanımları % 68,3 - %89 aralığındadır.

Birbirinden farklı gruptaki ilaçların eş zamanlı tespitini, düşük dedekte edilebilme limiti ile yapan HPLC yöntemin ve yüksek geri kazanım sağlayan katı faz ekstraksiyon yönteminin geliştirilmiş olması, atık su dışındaki matriksler ile yapılabilecek bilimsel çalışmalara da referans olabilir.

7. KAYNAKLAR

- [1] L. Zhao, Y.H. Dong, *Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China*, **Science of the Total Environment**, 408 (2010) 1069-1075.
- [2] L. Tong, P. Li, Y. Wang, K. Zhu, *Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS*, **Chmosphere**, 74 (2009) 1090-1097.
- [3] M.S. Diaz-Cruz, D. Barcelo, *Recent advances in LC-MS residue analysis of vetreinary medicines in the terrestrial environment*, **Trends in Analytical Chemistry**, 26-6 (2007) 637-646.
- [4] S. Babic, D. Asperger, D. Mutavdzic, A.J.M. Horvat, M. Kastelan-Macan, *Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater*, **Talanta**, 70 (2006) 732-738.
- [5] L. Patrolecco, N. Ademollo, P. Grenni, A. Tolomei, A.B. Caracciolo, S. Capri, *Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluoresence detection*, **Microchemical Journal**, 107 (2013) 165-171.
- [6] N. Kemper, *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*, **Ecological Indicators**, 8 (2008) 1-13.
- [7] H. Yu, H. Mu, Y.M. Hu, *Determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracycline multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC-DAD*, **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2012;2(1):76-81.
- [8] R. Hajian, E. Mousavi, N. Shams, *Net analyte signal standard addition method for simultaneous determination of sulphadiazine and trimethoprim in bovine milk anad veterinary medicines*, **Food Chemistry**, 138 (2013) 745-749.
- [9] N. Bilandzic, B.S. Kolanovic, I. Varenina, G. Scortichini, L. Annunziata, M. Brstilo, N. Rudan, *Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia*, **Food Control**, 22 (2011) 1941-1948.

- [10] E. Martinez-Carballo, C. Gonzalez-Barreiro, S. Scharf, O. Gans, *Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria*, **Environmental Pollution**, 148 (2007) 570-579.
- [11] L. Patrolecco, N. Ademollo, P. Grenni, A. Tolomei, A.B. Caracciolo, S. Capri, *Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection*, **Microchemical Journal**, 107 (2013) 165-171
- [12] P. Perez-Lozano, E. Garcia-Montoya, A. Minarro, J.R. Tico, J.M. Sune-Negre, *Stability evaluation of amoxicillin in a solid premix veterinary formulation by monitoring the degradation products through a new HPLC analytical method*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 42 (2006) 192-199.
- [13] R. Wei, F. Ge, S. Huang, M. Chen, R. Wang, *Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China*, **Chemosphere**, 82 (2011) 1408-1414.
- [14] R. Nageswara Rao, N. Venkateswarlu, R. Narsimha, *Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*, **Journal of Chromatography A**, 1187 (2008) 151-164.
- [15] R.W. Han, N. Zheng, Z.N. Yu, J. Wang, X.M. Xu, X.Y. Qu, S.L. Li, Y.D. Zhang, J.Q. Wang, *Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS*, **Food Chemistry**, 181 (2015) 119-126.
- [16] A.G. Frenich, M.M. Aguilera-Luiz, J.L.M. Vidal, R. Romero-Gonzalez, *Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, **Analytica Chimica Acta**, 661 (2010) 150-160.
- [17] M.C.V. Mamani, F.G.R. Reyes, S. Rath, *Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD*, **Food Chemistry**, 117 (2009) 545-552.

- [18] W. Baran, E. Adamek, J. Ziemianska, A. Sobczak, *Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health*, **Journal of Hazardous Materials**, 196 (2011) 1-15.
- [19] H. Yu, Y. Tao, D. Chen, Y. Wang, Z. Yuan, *Development of an HPLC-UV method for the simultaneous determination of tetracyclines in muscle and liver of porcine, chicken and bovine with accelerated solvent extraction*, **Food Chemistry**, 124 (2011) 1131-1138.
- [20] N. Kemper, *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*, **Ecological indicators**, 8 (2008) 1-13
- [21] **European Medicines Agency (EMA)** 2011/238630, Veterinary Medicines and Product Data Management, *Trends in the sales of veterinary antimicrobial agents in nine European countries Reporting period: 2005-2009*
- [22] **World Health Organization (WHO)** 5th revision 2016, *Critically important antimicrobials for human medicine*.
- [23] **Official Journal of the European Union** 2015/C 299/7, *Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine (2015/C 299/04)*.
- [24] *Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013*. **EFSA Journal**, 2015;13(2):4036.
- [25] **European Medicines Agency (EMA)** 2015/387934, Veterinary Medicines Division, *Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2013 Fifth ESVAC report*.
- [26] **World Health Organization (WHO)** Geneva 27, Switzerland 2014, *Antimicrobial resistance global report on surveillance*.
- [27]. **World Health Organization (WHO)** Regional Office for Europe 2015, *Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance Annual report 2014*
- [28] **Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials Rome, Italy 2007**.

- [29] *Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections* 2009, **EFSA Journal**, 7(11):1372.
- [30] J. O'Neill, *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance*. United Kingdom, 2014.
- [31] <http://www.economist.com/news/science-and-technology/21707519-neglected-health-problem-debated-un-other-global-drugs-problem>, (Erişim Tarihi:01.12.2018)
- [32] Infectious Diseases Society of America (IDSA), *The 10X20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020*, **Clinical Infectious Diseases** 50:1081-83
- [33] H. Bai, Y. You, H. Yan, J. Meng, X. Xue, Z. Hou, Y. Zhou, X. Ma, G. Sang, X. Luo, *Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell- penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to rpoD gene*, **Biomaterials**, 33:659-667.
- [34] J. Davies, D. Davies, *Origins and evolution of antibiotic resistance*, **Microbiol Mol Biol Rev.**, 2010, 74(3):417-33.
- [35] A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman, *Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review*, **Journal of Chromatography A**, 1067 (2005) 15-53.
- [36] M.M.L. Aerts, A.C. Hogenboom, U.A.Th. Brinkman *Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products*, **Journal of Chromatography B**, 667 (1995) 1-40.
- [37] S.B. Turnipseed, J.E. Roybal, A.P. Pfenning, P.J. Kijak, *Use of ion-trap liquid chromatography–mass spectrometry to screen and confirm drug residues in aquacultured products*, **Analytica Chimica Acta**, 483 (2003) 373-386.
- [38] D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F.D. Galey, *Screening and Mass Spectral Confirmation of β -Lactam Antibiotic Residues in Milk Using LC-MS/MS*, **J. Agric. Food Chem.**, 50(2) (2002) 406-41.
- [39] Y.Ito, Y.Ikai, H. Oka, H. Matsumoto, Y.Miyazaki, K.Takeba, H. Nagase, *Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis: IV. Confirmatory*

assay of benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin in bovine tissues by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, 911 (2001) 217-223.

[40] C. Leal, R. Codony, R. Compano, M. Granados, M.D. Prat, *Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography*, **Journal of Chromatography A**, 910 (2001) 285-290.

[41] F. Bruno, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, M. Pallagrosi, *An original approach to determining traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry*, **Mass Spectrom.** 14 (2002) 1365-1376.

[42] M.Y. Haller, S.R. Müller, C.S. Mc Ardell, A.C. Alder, M.J. Suter, *Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry*, **Journal of Chromatography A**, 952 (2002) 111-131.

[43] M. Cherlet, S. De Baere, P. De Backer, *Quantitative determination of dexamethasone in bovine milk by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry*, **Journal of Chromatography B**, 805 (2004) 57-65

[44] M.C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. (1999) 856:354.

[45] A. Posyniak, T. Śniegocki, J. Żmudzki, Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamide residues in honey, **Bull. Vet. Inst. Pulawy**. (2002) 46:111-117.

[46] N.H. Snow, Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices, **Journal of Chromatography A**. (2000) 885:445–455

[47] K. Chansik, D.R Hong, G.C Eu, K. Yongseok, K.L Jae, A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry, **Journal of Environmental Management**, 217 (2018) 629-645

- [48] P.R Michael, G.P Roberto, P. Leonardo, R.P Helena, An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination, **Talanta** 182 (2018) 1-21
- [49] K. Brian, O.M. John, M. Edward, M. Mary, C. Helen, F. Ambrose, D. Martin, Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis, **Journal of Chromatography A**. 1216 (2009) 7977–8015
- [50] J.A. Bjorn, A.M. Stolker, W.F. Michel, Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS, Trends in **Analytical Chemistry** (2013) Vol. 43
- [51] A.M. Tara, A.R. Paul, R. Fiona, P.M. Gillian, A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices, **Analytica Chimica Acta** 624 (2008) 1–15
- [52] Gündüz, T. (2005). *İnstrümental Analiz*. Gazi Kitabevi, Ankara, Türkiye, 32 p.
- [53] Skoog, D.A., Holler, F.J., West, D.M., (1997). *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson Broooks/Cole, Kanada, 147 p.
- [54] Cazes, J. (2005). *Ewing's Analitical Instrumentation Handbook*. New York, U.S.A, Marcel Dekker, 175 p.
- [55] Settle, F.A. (1997). *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. New Jersey, Rentice Hall Ptr, Inc., 141 p.
- [56] Tuncer, M. (2008). *Protein Saflaştırma 1 - Kromatografik Teknikler*. Can Matbaacılık, Mersin, Türkiye, 27 p.
- [57] S. Ahuja, H. Rasmussen, (2007) *Hplc Method Development For Pharmaceuticals* (1. Ed.), **Elsevier, Academic Press**, London: Theobald's Road.
- [58] *Ion Exchange Chromatography - Principles and Methods*, Handbooks from GE Healthcare Life Sciences.
- [59] *Size Exclusion Chromatography Principles and Method*, Handbooks from GE Healthcare Life Sciences.

- [60] *Affinity Chromatography - Vol. 1: Antibodies*, Handbooks from GE Healthcare Life Sciences.
- [61] M. Swartz, *Hplc Detectors: A Brief Review*, **Journal of Liquid Chromatography**, Volume 33, (2010) Issue 9-12, 1130-1150.
- [62] H. Lingeman, W. J. M. Underberg, A. Takadate, A. Hulshoff, *Fluorescence Detection in High Performance Liquid Chromatography*, **Journal of Liquid Chromatography**, Volume 8, (2006) Issue 5, 789-874.
- [63] **United State Pharmacopoeia (USP)**, *Chromatography <621>*, USP 40-NF 35
- [64] **EURACHEM Guide**. (1998). *A laboratory guide to method validation and related topics*.
- [65] **International Conference on Harmonization (ICH)** of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures*, Q2A, (1995). Geneva.
- [66] **International Conference on Harmonization (ICH)** of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures: Methodology*, Q2B, 1996.
- [67] **US FDA**, *General principles of validation*, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), (1987). Rockville, Maryland.
- [68] **United State Pharmacopoeia (USP)**, *Validation of Compendial Procedures <1225>*, USP 40.
- [69] **British Pharmacopoeia (BP)**, *Validation of Analytical Procedures*, 2014:SC III F.
- [70] J.S. Millership, L.G. Hare, M. Farry, P.S. Collier, J.C. McElnay, M.D. Shields, D.J. Carson, *The use of hydrophilic lipophilic balanced (HLB) copolymer SPE cartridges for the extraction of diclofenac from small volume paediatric plasma samples*, **Journal Pharma Biomed Anal.** (2001) 871-880

[71] C.A. Anderson, H.S. Rupp, W.H. Wu, *Complexities in tetracycline analysis-chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography*, **Journal of Chromatography A**, 2005, 1075(1-2):23-32.

[72] Y. Wen, Y. Wang, Y.Q. Feng, *Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography*, **Talanta**, 2006, 70(1):153-9.



ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Fatma ÖZER BAHŞI

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya, 19.01.1986

Adres: İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü / Malatya

E-Posta: sotaf.ozar@gmail.com

Lisans: Malatya İnönü Üniversitesi

