

**SÜTTE DOKSISIKLINİN
SIVI KROMATOĞRAFİK
TAYINI**

Mukadder ERDEM

**Yüksek Lisans Tezi
KİMYA ANABİLİM DALI
İSPARTA 2004**

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SÜTTE DOKSİSİKLINİN
SIVI KROMATOĞRAFİK
TAYINI**

MUKADDER ERDEM

Danisman: Prof.Dr. A.Güleren ALSANCAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

ISPARTA, 2004

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma jürimiz tarafından KIMYA ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LISANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Baskan :
Üye :
Üye :

ONAY

Bu tez/...../20.. tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../20...

Prof.Dr.Remzi KARAGÜZEL
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TESEKKÜR	IV
SIMGELER DIZINI	V
SEKİLLER DIZINI	VI
ÇİZELGELER DIZINI	X
1 GİRİŞ	1
1.1 TETRASİKLİNLER HAKKINDA GENEL BİLGİ	4
1.1.1 Tetrasiklinlerin Tayini Hakkında Genel Bilgi	8
1.2 KROMATOĞRAFI HAKKINDA GENEL BİLGİ	10
1.3 POTANSİYOMETRİK YÖNTEMLERLE K_A TAYINI HAKKINDA BİLGİ	16
2 KAYNAK BİLGİSİ	17
3 MATERYAL VE METOT	22
3.1 KULLANILAN CİHAZLAR	22
3.1.1 Yüksek Performans Sivi Kromatografi Cihazı	22
3.1.2 pH/Iyon Metre	22
3.1.3 Santrifüj Cihazı	22
3.2 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	23
3.3 KULLANILAN ÇÖZELTİLER	24
3.3.1 Mobil faz	24
3.3.2 Tetrasiklin çözeltileri	24
3.3.3 Primer Standard pH Referans Çözeltisi	24
3.4 METOT	25
3.4.1 Süt Numunesinin Hazırlanması	26
4 ARASTIRMA BULGULARI	27
4.1 MOBİL FAZ pH'SI İLE KAPASİTE FAKTÖRLERİ DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ	38
5 TARTISMA VE SONUÇ	55
5.1 SÜTTE DOKSİSİKLİNİN TAYINI	66
6 KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	73

ÖZET

Tetrasiklinler veterinerlikte hastalıkların önlenmesi ve kontrol edilmesi amacıyla rutin olarak kullanılmaktadırlar. Geniş antibakteriyel spektrumlu olan ve bakteriyostatik aktiviteye sahip bu antibiyotikler, Gram-pozitif and Gram-negatif bakterilerin sebep olduğu hastalıklara karşı etkilidirler. Bununla birlikte, bu ilaçların kullanılması bulaşıcı hastalıklar gibi ciddi problemlere yol açabilmektedir. Bu maddelerin sütteki kalıntıları toksik etki ya da başka alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir.

LC, sütte bulunan tetrasiklinlerin tayini için oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, tetrasiklinlerin kromatografik ayırımı, C₈ ters-faz kolonda, 25mM fosforik asit içeren asetonitril-su mobil fazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, mobil faz pH'sinin kromatografik ayırmaya etkisi incelenmiştir.

Bu çalışmanın amacı, TC, OTC, MC, DC ve CTC'nin ayırımı için spesifik, hızlı ve basit bir yöntem geliştirmektir. Çalışmada doksisiklinin kantitatif tayininde, dis kalibrasyon grafiği kullanılmıştır. Lineer kalibrasyon eğrisi, 0,999 korelasyon katsayısı ile elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Tetrasiklinler, LC, İyonlaşma Sabiti, Mobil Fazda pH optimizasyonu

ABSTRACT

Tetracyclines are used routinely in veterinary medicine for prevention and control of animal diseases. They are antibiotics with a broad antibacterial spectrum and bacteriostatic activity and have a good activity against acute disease caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, the use of these drugs has become a serious problem as regards infectious diseases, as they are substances that leave residues in milk, which can be directly toxic or else cause allergic reactions.

LC is the chromatographic approach most commonly used for the determination of tetracyclines in milk. Chromatographic separation of the tetracyclines was achieved on a C₈ reversed-phase column, using a consisting of acetonitrile-water (25:75 v/v) including 25mM phosphoric acid. In this study, the effect of mobile phase pH on the chromatographic separation was investigated.

The aim of this work to develop spesific, rapid and simple multiresidue method for separation of TC, OTC, MC, DC and CTC. In the study quantitative determination of DC was investigated with external calibration plot. Linear calibration plot was obtained with correlation coefficient 0,999.

Key words: Tetracyclines, LC, dissociation constant, pH optimization in mobile phase

TESEKKÜR

Bu alışma Yüksek Lisans Tez Projesi olarak, SD Bilimsel Arastırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 720 numaralı proje ile desteklemiştir. Arastırma Projeleri Yönetim birimine ve deneysel çalışmalarımı yaptığım Deneysel ve Gözlemsel ğrenci Arastırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne tesekkür ederim.

Bu çalışmamın hazırlanması sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, danismanım Sayın Prof. Dr. Güleren ALSANCAK'a ve desteklerini her an hissettığım, daima yanımda olan aileme tesekkrlerimi sunarım.

SIMGELER DIZINI

HPLC : Yüksek performansli sivi kromatografisi

k : Kapasite faktörü

t_R : Bilesige özgü alikonma zamani

t_0 : Kolonda tutulmayan türe ait alikonma zamani

a : Seçicilik faktörü

R_s : Ayirma gücü

N : Bir kromatografik ayirmada etkin tabaka sayisi

DAD : Spektral tarama alabilen dedektör

TC : Tetrasiklin

OTC : Oksitetrasiklin

MC : Metasiklin

DC : Doksisiklin

CTC : Klortetrasiklin

SPE : Kati-faz ekstraksiyonu

SEKILLER DIZINI

Sekil 1.1 Tetrasiklinlerin genel yapısı.....	4
Sekil 1.2 Kromatografik ayırımları gerçekleştirilen tetrasiklinler	5
Sekil 4.1 2×10^{-3} M, 20 mL metasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 1. titrasyon grafiği	27
Sekil 4.2 2×10^{-3} M, 20 mL metasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 2. titrasyon grafiği	28
Sekil 4.3 2×10^{-3} M, 20 mL doksisiklinin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 1. titrasyon grafiği	28
Sekil 4.4 2×10^{-3} M, 20 mL doksisiklinin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 2. titrasyon grafiği	29
Sekil 4.5 2×10^{-3} M, 20 mL klortetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 1. titrasyon grafiği	29
Sekil 4.6 2×10^{-3} M, 20 mL klortetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 2. titrasyon grafiği	30
Sekil 4.7 2×10^{-3} M, 20 mL tetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 1. titrasyon grafiği	30
Sekil 4.8 2×10^{-3} M, 20 mL tetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 2. titrasyon grafiği	31
Sekil 4.9 2×10^{-3} M, 20 mL oksitetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 1. titrasyon grafiği	31
Sekil 4.10 2×10^{-3} M, 20 mL oksitetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 2. titrasyon grafiği	32
Sekil 4.11 2×10^{-3} M 20 mL Doksisiklinin 0,025 M KOH ile ilk titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi	33
Sekil 4.12 2×10^{-3} M 20 mL Doksisiklinin 0,025 M KOH ile ikinci titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi	33
Sekil 4.13 2×10^{-3} M 20 mL Metasiklinin 0,025 M KOH ile ilk titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi	34
Sekil 4.14 2×10^{-3} M 20 mL Metasiklinin 0,025 M KOH ile ikinci titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi	34
Sekil 4.15 2×10^{-3} M 20 mL Klortetrasiklinin 0,025 M KOH ile ilk titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi	35
Sekil 4.16 2×10^{-3} M 20 mL Klortetrasiklinin 0,025 M KOH ile ikinci titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi	35
Sekil 4.17 2×10^{-3} M 20 mL Tetrasiklinin 0,025 M KOH ile ilk titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi	36
Sekil 4.18 2×10^{-3} M 20 mL Tetrasiklinin 0,025 M KOH ile ikinci titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi	36
Sekil 4.19 2×10^{-3} M 20 mL Oksitetrasiklinin 0,025 M KOH ile ilk titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi	37
Sekil 4.20 2×10^{-3} M 20 mL Oksitetrasiklinin 0,025 M KOH ile ikinci titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi	37
Sekil 4.21 pH 2,500'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan koşulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonyitril-su ortamı, %25 (v/v);	

- Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 38
- Sekil 4.22 pH 2,500'da, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda tetrasiklinlerin karışımına ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 39
- Sekil 4.23 pH=2,500 ± 0,005, akis hızı 0,8 mL/dakika olan koşulda tetrasiklinlerin karışımına ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 39
- Sekil 4.24 pH 2,750'de, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda oksitetrasiklinine ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 40
- Sekil 4.25 pH 2,750'de, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda tetrasiklinlerin karışımına ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 40
- Sekil 4.26 pH 2,750'de, akis hızı 0,8 mL/dakika olan koşulda tetrasiklinlerin karışımına ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 41
- Sekil 4.27 pH 3,000'de, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda oksitetrasiklinine ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 41
- Sekil 4.28 pH 3,000'de, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda tetrasiklinlerin karışımına ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 42
- Sekil 4.29 pH 3,000'de, akis hızı 0,8 mL/dakika olan koşulda tetrasiklinlerin karışımına ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 42
- Sekil 4.30 pH 3,500'da, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda oksitetrasiklinine ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 43
- Sekil 4.31 pH 3,500'da, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda tetrasiklinlerin karışımına ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon

- sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 43
- Sekil 4.32 pH 3,500'da, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 44
- Sekil 4.33 pH 3,750'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; O C için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 44
- Sekil 4.34 pH 3,750'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 45
- Sekil 4.35 pH 3,750'de, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 45
- Sekil 4.36 pH 4,000'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 46
- Sekil 4.37 pH 4,000'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 46
- Sekil 4.38 pH 4,000'de, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 47
- Sekil 4.39 pH 4,250'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 47
- Sekil 4.40 pH 4,250'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm..... 48
- Sekil 4.41 pH 4,250'de, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon

sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm.....	48
Sekil 4.42 pH 4,500'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda oksitetrasiklinine ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm.....	49
Sekil 4.43 pH 4,500'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm.....	49
Sekil 4.44 pH 4,500'da, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm.....	50
Sekil 4.45 pH 2,500'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda doksisikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %23 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm.....	51
Sekil 4.46 pH 2,750'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda doksisikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %23 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm.....	51
Sekil 4.47 pH 2,500'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %23 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm.....	52
Sekil 4.48 pH 2,750'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda doksisikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %24 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm.....	52
Sekil 4.49 pH 2,500'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda doksisikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %24 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm.....	53
Sekil 4.50 pH 2,750'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %24 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm.....	53
Sekil 4.51 pH 2,750'de, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda süt numunesine ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %24 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C ₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL.....	54
Sekil 5.1 pH 2,75'de polarite parametresi ile log k degerleri arasindaki iliski.....	64
Sekil 5.2 pH 2,50'de polarite parametresi ile log k degerleri arasindaki iliski.....	65
Sekil 5.3 Doksisiklin için dis kalibrasyon grafigi	67

ÇİZELGELER DIZINI

Çizelge 1.1 C7, C6, C6 ve C5 pozisyonlarındaki sübstitüentler.....	4
Çizelge 5.1 Tetrasiklinlerin F-pH sigmoidallerinden belirlenen iyonlaşma sabitleri.....	55
Çizelge 5.2 Tetrasiklinlerin Gran grafiği ile bulunan iyonlaşma sabitleri.....	56
Çizelge 5.3 F-pH grafikleri ve Gran yöntemi ile bulunan pK_{a1} değerleri.....	56
Çizelge 5.4 Tetrasiklinlerin pH 2,500 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	57
Çizelge 5.5 Tetrasiklinler için pH=2,750 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	58
Çizelge 5.6 Tetrasiklinler için pH 3,000 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	58
Çizelge 5.7 Tetrasiklinler için pH 3,500 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	59
Çizelge 5.8 Tetrasiklinler için pH 3,750 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	59
Çizelge 5.9 Tetrasiklinler için pH 4,000 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	60
Çizelge 5.10 Tetrasiklinler için pH 4,250 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	60
Çizelge 5.11 Tetrasiklinler için pH 4,500 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	61
Çizelge 5.12 Tetrasiklinler için pH 2,500 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %23 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	61
Çizelge 5.13 Tetrasiklinler için pH 2,500 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %24 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	62
Çizelge 5.14 Tetrasiklinler için pH 2,750 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %23 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	62
Çizelge 5.15 Tetrasiklinler için pH 2,750 \pm 0,005 koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %24 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri.....	63
Çizelge 5.16 pH 2,50'de tetrasiklinlerin k ve log k değerleri.....	64
Çizelge 5.17 pH 2,75'de tetrasiklinlerin k ve log k değerleri.....	64
Çizelge 5.18 Dis kalibrasyon verileri.....	66

1 GIRIS

Antibiyotikler, mikroorganizmalardan üretilen, diger mikroorganizmalarin gelismesinin engellenmesi ya da bu mikroorganizmalarin öldürülmesi amaciyla kullanılan kimyasal maddelerdir. İnsan ve hayvan hastaliklarinin önlenmesi ve tedavisinde kullanilir. Bu ilaçlar, ürünleri gida maddesi olarak kullanılan hayvanlarda da hastaliklarin önlenmesi, büyümenin hizlandirilmesi amaciyla kullanilmaktadir. Veteriner ilaçlari olarak antibiyotiklerin yaygin olarak kullanilmasi, hayvansal gidalarda ilaç kalintilarina sebep olabileceginden bunlari tüketenlerde potansiyel tehlike olusturmaktadir.

Tetrasiklin grubu antibiyotikler klinik olarak önemli ilaçlardandır. Bu yari sentetik türevler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler içeren patojenik mikroorganizmalara karsi aktivitelerinin iyi olmasıyla taninir. Bu ilaçların kullanimi sırasında antibiyotikler, süte kalinti olarak belirli miktarlarda geçmektedirler. Hayvanin tedavisinin baslangicindan itibaren 7-21 gün süresinde sagilan sütün insanlar tarafından tüketilmesi, insanlarda alerjik reaksiyonlara ve antibiyotiklere karsi bagisiklik kazanilmasina sebep olabilmektedir. Ayrıca, işletmeler açısından teknolojik problemlere neden olabilmektedir. Yogurt, kefir, peynir gibi kültür kullanılarak üretilen fermente süt ürünleri, sütte antibiyotik bulunmasi halinde üretilenmemektedir. Çünkü bu kültürlerde bulunan mikroorganizmalar antibiyotikler tarafından inhibe edilmektedir. Bu durumda ürünün oluşabilmesi için gerekli mikroorganizmalar çalışmamakta ve pH'da beklenen düşme olmamakta, ürün kalitesi düşük olmakta veya hiç ürün elde edilememektedir. Bu nedenle bu grup antibiyotiklerin tayanleri son derece önemlidir.

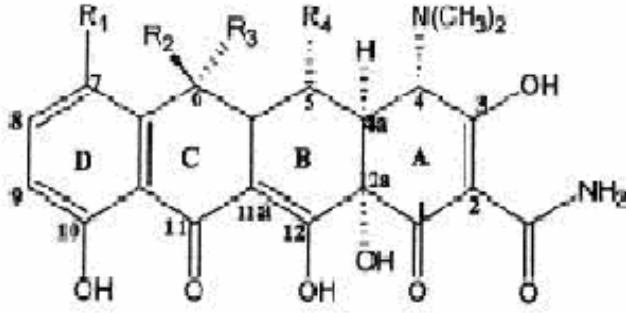
İlaç kalinti analizleri, 1980'lerin basindan itibaren önem kazanmaya başlamıştır. Gidalarda kimyasal kirleticilerin kontrolü için istenilen düzenlemeler son on yilda artis göstermiştir. Bu da, gida maddelerinde kalintilarin tayan edilmesi için gerekli analitik metotlara olan talebi arttırmıştır. Kromatografik teknikler, özellikle de yüksek performansli sivi kromatografi yöntemi, güvenilir ve maksimum kalinti limitinden daha düşük konsantrasyonlari da tayan edebilir olmasindan dolayi kalinti

analizlerinde önem kazanmıştır. Bu çok yönlü teknik, biyolojik numunelerde antibiyotik kalıntılarının tayini amacıyla oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle bozucu türleri azaltmak ve spesifikliğini arttırmak mümkündür.

Bu çalışmada, sütte doksisisiklinin sıvı kromatografik tayini amaçlanmıştır. Sütte mevcut olabilecek diğer tetrasiklinlerin, doksisisiklinin kantitatif tayininde bozucu etki yapabilecekleri düşüncesiyle, metasiklin, klortetrasiklin, tetrasiklin ve oksitetrasiklinin, doksisisiklinden sıvı kromatografik ayırımları optimize edilmeye çalışılmıştır. Bilindiği gibi, ters faz sıvı kromatografide ayırma için uygun koşul $pK_a \pm 1,5$ 'tur. Bu nedenle öncelikle doksisisiklin, metasiklin, klortetrasiklin, tetrasiklin ve oksitetrasiklinin, mobil faz olarak uygun olduğu belirlenen %25 asetonitril-su ortamındaki pK_a değerleri potansiyometrik yöntemle tayin edilmiştir. Daha sonra ise mobil fazın pH'sinin ayırma üzerine etkisi incelenerek ayırma için optimum pH değeri belirlenmiştir.

1.1 Tetrasiklinler Hakkında Genel Bilgi

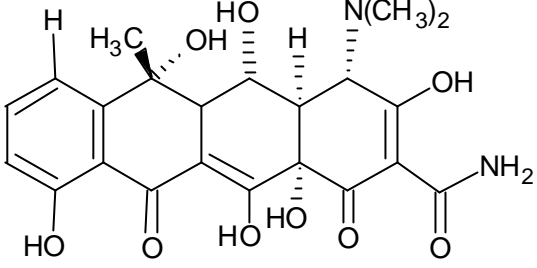
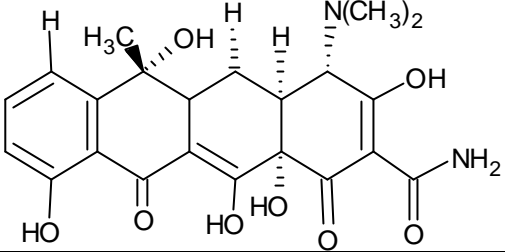
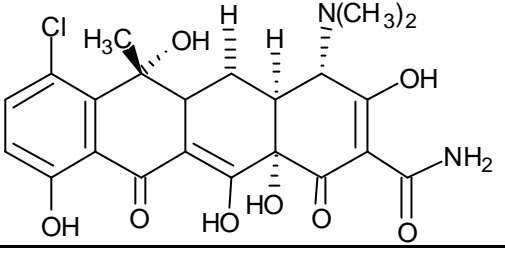
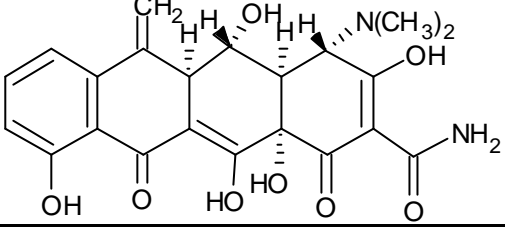
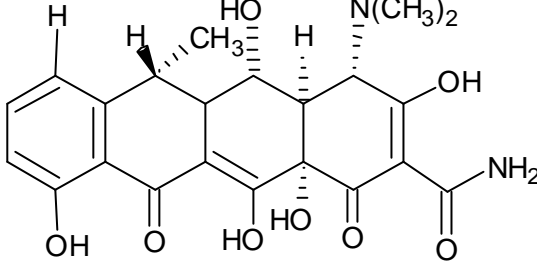
Tetrasiklinler hem asit, hem de bazlarla tuz oluşumu veren amfoterik bileşiklerdir (Schenk vd., 1998). Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin ana yapısında, dört halkalı bir hidronaftasen çekirdeği bulunur. Tetrasiklin analogları, bu çekirdek yapının besinci, altıncı ve yedinci pozisyonlarındaki farklılıklara göre birbirlerinden ayırdedilirler. Şekil 1.1'de tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin, metasiklin ve doksisiklinin genel yapıları ve Şekil 1.2'de de kromatografik ayırımları gerçekleştirilen bu tetrasiklinlerin tam formülleri verilmiştir.



Şekil 1.1 Tetrasiklinlerin genel yapısı

Çizelge 1.1 C7, C6, C6 ve C5 pozisyonlarındaki süstitüentler

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Tetrasiklin	H	CH ₃	OH	H
Oksitetrasiklin	H	CH ₃	OH	OH
Klortetrasiklin	Cl	CH ₃	OH	OH
Metasiklin	H	CH ₂	-	OH
Doksisiklin	H	H	CH ₃	OH

Adi	Yapi Formülü
Tetrasiklin	 <p>The structure shows a tetracycline molecule with a dimethylamino group (N(CH₃)₂) at C-4, a methyl group (H₃C) at C-5, and a primary amide group (NH₂) at C-12. It features four fused rings: a benzene ring, a six-membered ring with a ketone at C-2, a six-membered ring with a ketone at C-6, and a six-membered ring with a ketone at C-11. Hydroxyl groups are present at C-7, C-8, and C-10.</p>
Oksitetrasiklin	 <p>The structure is identical to tetracycline but lacks the methyl group at C-5. It has a dimethylamino group (N(CH₃)₂) at C-4 and a primary amide group (NH₂) at C-12.</p>
Klortetrasiklin	 <p>The structure is identical to tetracycline but has a chlorine atom (Cl) at C-7 instead of a hydroxyl group. It has a methyl group (H₃C) at C-5, a dimethylamino group (N(CH₃)₂) at C-4, and a primary amide group (NH₂) at C-12.</p>
Metasiklin	 <p>The structure is identical to tetracycline but has a methylene group (CH₂) at C-10 instead of a hydroxyl group. It has a methyl group (H₃C) at C-5, a dimethylamino group (N(CH₃)₂) at C-4, and a primary amide group (NH₂) at C-12.</p>
Doksisiklin	 <p>The structure is identical to tetracycline but has a methyl group (CH₃) at C-5 instead of a dimethylamino group. It has a dimethylamino group (N(CH₃)₂) at C-4 and a primary amide group (NH₂) at C-12.</p>

Sekil 1.2 Kromatografik ayirimleri gerçeleştirilen tetrasiklinler

Tetrasiklinler, veterinerlikte, hastaliklarin engellenmesi ve kontrolünde siklikla kullanılan bakteriyostatik aktiviteli ve genel antibakteriyel spektrumlu antibiyotiklerdir. Bunlar, Spirochete, Actinomyces, Rickettsia ve Mycoplasma türlerini içeren, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin neden oldugu akut hastalıklara karsi iyi aktiviteye sahiptirler (Hallworth, 1993; Blanchflower vd., 1997; Cherlet, 2003; Cinquina vd.,2003).

Tetrasiklin grubu antibiyotikler, bakterilerde protein olusumunu engelleyerek, bakterilerin çoğalmasini önlerler. Insanlarda ve hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonların kontrol edilmesinde ve gerektiğinde koruyucu tedavide kullanılmaktadır. Ayrica toplanmis meyve ve sebzelerin korunmasında uygulamaları bulunmaktadır. (Posyniak vd., 1998; Furusawa, 1999; Kühne vd., 2000; Cinquina vd., 2003; Furusawa, 2003; Hernandez vd., 2003).

Mikroorganizmaların tetrasiklinlere karsi dirençlerinin artması uyarilarına ragmen, Avrupa Birliği'nde, veterinerlikte tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin %65'inden fazlası tetrasiklin grubu antibiyotiklerdir (Kühne vd., 2000). Bu ilaçların kullanımı sırasında, ilaç kullanımı uygunsuz bir şekilde devam eder ve tedavi zamanında bırakılmazsa, gıdada TC kalıntıları oluşmaya başlar (Furusawa, 1999; Furusawa, 2003). İnsan patolojisi açısından değerlendirecek olursak, bu bileşimin gıdadaki çok az bir miktarı bile toksik etkilere ve alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Daha da önemlisi, gıda maddelerindeki antibiyotigin, uzun periyotlarda, düşük dozda tüketimi, ilaç-dirençli mikroorganizmaların gelişmesine sebep olur (Boatto vd., 1999; Cinquina vd., 2003). Buna ek olarak, OTC kalıntıları, peynir, tereyağı, yogurt gibi baslatıcı kültürlerin inhibisyonuna da neden olabilmektedirler (Schenk vd., 1998).

Gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla, Avrupa Birliği, hayvansal ürünlerde, birkaç ilaç için tolerans değerleri belirlemiştir. Et, süt ve diğer gıdalarda maksimum kalıntı limitleri (Maximum residue limits, MRLs) tespit edilmiştir (Choma vd., 1999; Cinquina vd., 2003). FAO/WHO (Dünya Sağlık Örgütü), FDA (ABD Gıda ve İlaç Kurulu), EU (Avrupa Birliği), Japan (Japonya Gıda Kanunları), sütteki maksimum

kalinti limitini (MRL) 0,1 µg/mL olarak belirlemislerdir (Boatto vd., 1999; Furusawa, 1999; Furusawa, 2003).

1.1.1 Tetrasiklinlerin Tayini Hakkında Genel Bilgi

Gidalarda antibiyotik kalıntısının varlığı, genellikle immunolojik çalışma ile tayin edilir. Enzim inhibisyonunu temel alan mikrobiyolojik testler gibi biyotayin metotları kullanılır. Ancak bu metotlar spesifik değildirler ve farklı antibiyotiklere seçici davranış göstermezler. Fizikokimyasal metotlar, biyokimyasal metotlara göre daha güvenilirlerdir. Bu nedenle antibiyotik kalıntılarının tayini ve kantitasyonu için hassas ve spesifik analitik tekniklerin uygulanması gereklidir. Önceleri tetrasiklin kalıntılarının analizinde ince tabaka kromatografisi, elektroforez ve gaz-sivi kromatografisi yöntemleri kullanılırken günümüzde bu amaçla tercih edilen teknik HPLC'dir. Sivi kromatografi tekniği ile tetrasiklinlerin analizinde ayırma, ters faz alkilenmiş silika, C₁₈, C₈ kolonları veya katı destekli polimer kullanılarak yapılır (Björklund, 1988; Posyniak vd., 1998; Schenck ve Callery, 1998; Bovanova, 2000; Joshi, 2002). Silika esaslı ters faz HPLC'de tetrasiklinleri tayin ederken karşılaşılan temel problem, tetrasiklinlerin sabit fazdaki artık silanol gruplarına tersinmez olarak bağlanma eğiliminde olmaları ve bunun da pik kuyruklanmasına yol açmasıdır. Bu problemi engellemek için tam kapalı ters faz kolon önerilmektedir. Mobil faza oksalik asit ekleyerek veya polistrendivinilbenzen sivi kromatografi kolonu kullanılarak, bu problemin üstesinden gelinebilir (Furusawa, 1999; Vinas vd., 2004). Polimerik kolonların kullanılmasında, iyon çifti oluşturucu olarak tetrabutil amonyum tuzu ya da EDTA içeren mobil faz kullanımı önerilmektedir (Kazemifard ve Moore, 1997).

Tetrasiklinlerin ters faz sivi kromatografi ile ayırımları, alikonma mekanizmalarındaki farklılıklardan dolayı komplikedir. Sadece hidrofobik etkileşimleri değil, aynı zamanda kolon dolgu materyalindeki metal safsızlıklarını da silat oluşumunu azaltmak için çok düşük düzeyde tutmak gerekir. Ayırmada antibiyotigin iyonlaşmasının etkisi dolayısıyla mobil faz pH'ına dikkat etmek gerekir (DiCorcia ve Nazzari, 2002; Pilorz ve Choma, 2004). Mobil faz pH'sini, tetrasiklinlerin iyonlaşmasını kontrol edecek şekilde değiştirerek, kromatografik ayırmayı etkilemek mümkündür (Skulason, 2003).

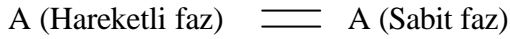
Doksisiklin amfoterik bir bilestir ve sivi kromatografik ayirma fizikokimyasal 6zelliklerinden çok etkilenir. Bu antibiyotik, diger tetrasiklinler gibi 2 ve 3 y6kl6 katyonlarla (Al ve Ca da dahil) selatlar olusturur. Bu selat komplekslerinin olusmasini 6nlemek için fosforik asit, tartarik asit, EDTA ve iyon çifti olusturucu reaktifler mobil faza eklenerek olumsuz etkiler bertaraf edilmeye alisilir (Ruz vd., 2004).

S6tteki antibiyotiklerin kromatografik tayininden 6nce, ekstraksiyon esnasinda antibiyotiklerle birlikte ekstrakte olan bilesikleri uzaklastirmak için numune hazirlama isleminin uygulanmasi gereklidir. Antibiyotikler, tipik polar bilesiklerdir. Polar olmayan organik 6z6c6ler ile ekstraksiyonlari m6mk6n olmayabilir. S6tteki antibiyotiklerin tayini için en 6nemli metotlar, s6t proteinlerinin 6kmesini ve takiben antibiyotiklerin polar organik 6z6c6ler içerisine ekstraksiyonunu gerektirmektedir. Dokudan ve s6tten antibiyotiklerin ekstraksiyonu için esitli ekstraksiyon/protein giderme metotlari kullanilmaktadir.

1.2 Kromatografi Hakkında Genel Bilgi

Kromatografi karışımlardaki bileşiklerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan bir analitik yöntemdir. Karışımındaki bileşenler, akış halinde gaz veya sıvı bir fazla birlikte durgun faz üzerinden geçirilir; ayırma bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak gerçekleşir.

Sıvı kromatografik ayırmalar, çözünenlerin hareketli ve sabit faz arasındaki dağılım katsayılarının farklılığını temel alır. A çözüneni için söz konusu denge, aşağıdaki eşitlikte gösterilebilir.



Bu reaksiyonun denge sabiti k 'ya dağılım katsayısı denir, ilgilenilen türün sabit fazdaki konsantrasyonu (c_s) ve ilgilenilen türün hareketli fazdaki konsantrasyonu (c_h)'na

$$k = \frac{c_s}{c_h}$$

bağıntısıyla bağlıdır.

Bir türün kolona enjekte edilmesinden, dedektördeki pik noktasına kadar geçen zamana, o türün alıkonma zamanı denir ve t_R ile gösterilir. Kolonda hiç alıkonulmayan türün dedektöre kadar ulaşma süresine, ölü zaman denir ve t_0 ile gösterilir. Kapasite faktörü (k), çözünen maddelerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta yaygın olarak kullanılan bir parametredir ve aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Iyi bir kromatografik ayırmada, türler için kapasite faktörlerinin 2-10 olması iyi sonuç verir.

Bir kolonda A ve B gibi iki tür düşünecek olursak, daha kuvvetli olarak tutunan veya daha yavaş olarak kolondan elue edilen B türü için kapasite faktörü k_B , daha az tutunan veya daha hızlı olarak kolondan elue edilen A türü için ise aynı sabit k_A olduğunda, A ve B türleri için seçicilik faktörü;

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t_{RB} - t_{R0}}{t_{RA} - t_{R0}}$$

şeklinde ifade edilir. α daima 1'den büyüktür ve α değerinin 1,15 değerine eşit olması, ayırmanın %98 gerçekleştiğini gösterir.

Bir kolonun ayırma gücü (R_s)'dir ve R_s , etkin tabaka sayısı, kapasite faktörü ve seçicilik faktörüne bağlıdır. Bunlar arasındaki bağıntı;

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

şeklindedir.

Sıvı kromatografide, durgun fazın polar, hareketli fazın apolar olduğu durumda normal faz sıvı kromatografisi, durgun fazın apolar hareketli fazın polar olduğu durumda ise ters faz sıvı kromatografisi ifadeleri kullanılır.

Iyi bir ayırma için, sabit fazın polarlığının, analizi yapılanların polarlığına yakın olması gerekir. Buna karşılık, hareketli fazın polarlığı, analizi yapılanların polarlığından çok farklı olabilir. Sabit fazın polarlığının, bileşenlerin polarlığından çok farklı olması halinde, sabit fazla bileşenler arasında etkileşme olmaz veya çok az olur. Bunun sonucunda bileşenler kolonu kısa zamanda terk ederler. Sabit fazın ve bileşenlerin polarlıklarının birbirlerine çok yakın olması durumunda da elüsyon

süreleri çok uzar. Kromatografide bu da istenmez. İyi bir ayırma isteniyorsa; sabit fazın, hareketli fazın ve analizi yapılan bileşenlerin polarlıklarının kromatografi için uyusum halinde olması gerekir.

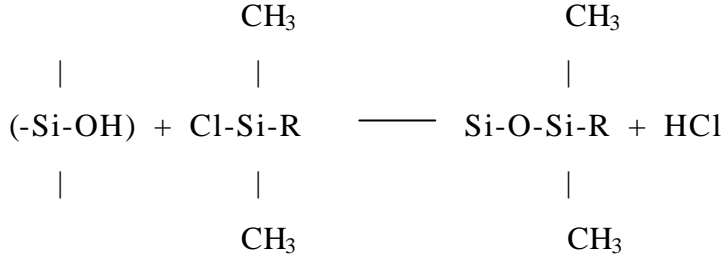
Sıvı kromatografide bir çok durumda su-organik çözücü ikili karışımları hareketli faz olarak kullanılır. Hareketli faz bileşimi, analizcinin sıvı kromatografide ayırmayı optimize etmek için, kolaylıkla değiştirebileceği bir parametredir. Bir sıvı kromatografik ayırmada bir tek hareketli faz ile yapılan ayırma izokratik ayırmadır. Sıvı kromatografi teorilerinin bilinmesi ve kapasite faktörü ile hareketli fazın polaritesi arasındaki lineer bağların kullanılması bir çok koşulda ayırma için yeterlidir. İzokratik ayırmanın yeterli gelmediği koşullarda gradient ayırma kullanılır. Gradient ayırmada çözücü bileşiminin profili zamana göre değiştirilir. Profil, konveks, konkav ya da lineer olabilir. Numune bileşenlerinin polaritelerinde farklılığın artması, gradient elüsyonun etkinliğini artırır. Bir gradient ayırmada hareketli fazın başlangıçta da bir miktar organik çözücü içermesi kolon dengelenmesini daha kısa sürede tamamlayabilir.

Sıvı kromatografide kapasite faktörü k , hareketli fazın polaritesine bağlıdır ve sıklıkla ayırmanın optimizasyonunda $\log k$ ile çözücü polarite parametresi, E_T^N , arasındaki lineer ilişkiden yararlanır. Ancak su-organik çözücü karışımlarında, suyun hakim olduğu, organik çözücünün hakim olduğu veya su-organik çözücü ikilisinin birlikte etkin olduğu bölgelerde farklı lineer ilişkiler olacağı bilinmektedir.

Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri silisyum dioksittir. Mikrondan daha küçük boyutlardaki silisyum dioksit parçacıklarının aglomerasyonu, daha büyük ve yaklaşık aynı boyutlarda parçacıklar elde edilir. Hazırlanan parçacıkların yüzeyi, genellikle bu yüzeye fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanmış ince bir organik filmle kaplanır.

Bağlı faz dolgu maddelerinin çoğu bir organoklorosilanin, sıcak, seyreltik hidroklorik asit çözeltisinde hidrolizlenerek yüzeyine OH grubu bağlanmış silisyum dioksit ile reaksiyona sokulmasıyla hazırlanır. Bu reaksiyon sonucunda

olusan ürün bir organosiloksandır. Kati parçacık yüzeyinde bulunan böyle bir SiOH ile meydana gelen reaksiyon aşağıdaki gibi yazılabilir:



Burada R, genellikle düz zincirli oktil- veya oktildesil- grubudur.

Silis yüzeylerine bağlanan diğer organik fonksiyonlu gruplar alifatik aminler, eterler, nitriller ve aromatik hidrokarbonlardır. Böylelikle çok farklı polaritede durgun faz elde etmek mümkündür. Bağlı faz dolgu maddeleri, fiziksel olarak yüzeye tutturulmuş dolgulara göre daha kararlı olma gibi bir üstünlüğe sahiptir. Yüzeye fiziksel olarak tutturulmuş dolgular, zamanla hareketli fazda çözünerek sürüklendikleri için sık sık yeniden kaplanmaları gerekir. Ayrıca bu dolgularda, hareketli fazdaki çözünme problemi nedeniyle, gradient elüsyon tekniğini uygulamak pratik değildir.

Günümüzde ters faz sıvı kromatografide sıklıkla C₁₈ ve C₈ kolonları kullanılmaktadır. Kolonların uzunluğu 10-30 cm ve iç çapı 4-10 mm civarındadır. Kolon dolgu maddelerinin parçacık boyutu 5-10 µm kadardır. Bu tip kolonların 1 metresinde 40000-60000 kadar etkin tabaka bulunur. Son yıllarda uzunluğu 3-7,5 cm ve iç çapı 1-4,6 mm olan yüksek performanslı mikro kolonlar da imal edilmeye başlanmıştır. Bu kolonların dolgu maddelerinin parçacık boyutları 3-5 µm ve tabaka sayısı 100000 tabaka/m'ye kadar çıkmaktadır. Bu mikro kolonlar kullanılarak çok az miktarda çözücü ile yeterli ayırma kısa sürede yapılabilmektedir. 4 cm uzunluğunda, 4 µm iç çapında ve 3 µm büyüklüğünde dolgu maddesi ile doldurulmuş bir kolonda, 15 saniye gibi çok kısa bir zamanda sekiz farklı madde birbirinden ayrılabilir.

Kilavuz kolonlar, analitik kolonun giriş kısmına takılarak çözücülerden gelebilecek toz ve kirlilikleri tutmak suretiyle kolonun ömrünü uzatırlar. Bunun yanında kilavuz kolonlar yardımıyla durgun faz, hareketli faz ile doyurularak sivi-sivi kromatografisinde durgun fazın süreklilik ile kaybı minimuma indirilir. Kilavuz kolonun dolgusunun bileşimi ile, analitik kolonunki benzer olmalıdır. Ancak basınç düşmelerini azaltmak için, kilavuz kolonun dolgu maddesinin parçacık boyutu analitik kolonunkinden genellikle daha büyüktür.

HPLC’de genel ve özel amaçlı olmak üzere iki tip dedektör kullanılır. Genel amaçlı dedektörler, hareketli fazın kırma indisini, dielektrik sabitini, yoğunluğunu ölçen dedektörlerdir. Bu özellikler çözünenin konsantrasyonuna ve türüne bağlı olarak değişir. Buna karşılık özel amaçlı dedektörler, bir maddenin UV absorpsiyonunu, floresansını ölçer.

Sivi kromatografide en çok kullanılan dedektörler, ultraviyole veya görünür ışığın absorpsiyonuna dayanırlar. Birçok organik madde ultraviyole bölgesinde absorpsiyon gösteren fonksiyonlu gruplar bulundurduğu için, UV dedektörler sıklıkla tercih edilirler. UV dedektörler yüksek hassasiyet (yüksek absorpsiyon yapan bileşikler için dedeksiyon limiti yaklaşık 1×10^{-9} g/mL) ile karakterize edilirler. Akış hızı ve sıcaklık değişimlerine hassas değildir. UV dedektör, genellikle gradient elüsyon çalışması için tercih edilen bir dedektördür.

Günümüzde, çeşitli dalga boylarında dedeksiyon yapabilmek için (210-800 nm) dedektörler üretilmektedir. Böylece daha seçici tayin mümkün olabilmektedir. HPLC’de tek seçici dalga boylu UV dedektörler kullanıldığı halde bunlar yerini hızla çok dalga boyu taraması yapabilen DAD dedektörlere bırakmaktadır. Bu tip dedektörlerle belli dalga boyu aralığına ait spektrumun tamamını elde etmek mümkün olabilmektedir. Toplanan sinyallerden elde edilen spektrum, matrisde yorum yapabilmek için detaylı spektral bilgi sağlamaktadır.

HPLC’de kullanılan floresans dedektörleri, florometre ve spektrofluorometrelerde kullanılan dedektörlerin aynıdır. En basit floresans dedektörlerinde, uyarıcı kaynak

olarak civa lambasi, isinlari süzmek içinde bir veya birkaç filtre kullanilir. Floresans metodunun baslica avantajı, herhangi bir absorbans metodundan en az 10 defa daha hassas olmasidir. Bu metotda, analizi yapılacak maddelerin floresan özellikte olmaları gerekir. Floresan olmayan maddelere de, türevlendirilerek floresan özellik kazandırılır (Yildiz, 1993; Poole ve Poole, 1997; Skoog vd.,1999; Gündüz, 2002).

1.3 Potansiyometrik Yöntemle K_a Tayini Hakkında Bilgi

Potansiyometrik yöntem, pH metre veya elektrot kalibrasyonu yapıldığı durumlarda iyonlaşma sabitlerinin tayininde sıklıkla yararlanılan bir yöntemdir. Bu amaçla kullanılacak uygun düzenek hazırlanır. Kuvvetli asit veya kuvvetli bazların titrasyonları bu çözeltilerin ayarlanması için gereklidir. Takiben zayıf asit veya bazlar kuvvetli karsit türleri ile titre edilirler. Titrasyonda ayarlı kuvvetli asitler ve bazlar kullanılır.

Titrasyon grafiği, x ekseninde V_b ve y ekseninde pH veya mV olacak şekilde hazırlanır. Grafikte sıçrama aralığı genellikle 1 değerini kapsamaz. Grafiği esdeğerlik için oranın 1 olduğu değeri içine alacak şekilde düzeltmemiz gerekir. Deneysel veriler incelenerek pH'nin bariz şekilde değiştiği hacim, dönüm noktası-esdeğerlik hacmi olarak belirlenir. V_b değerleri V_{es} değerine bölünerek ($V_b / V_{es} = V_b / (C_a V_a / C_b) = C_b V_b / C_a V_a$) düzeltilmiş değeri her bir hacim ilavesi için hesaplanır. Bu değerler x ekseninde pH değerleri y ekseninde kullanılarak grafik hazırlandığında esdeğerlik tam 1'e karşılık gelir. $C_b V_b / C_a V_a$ oranının 0,5 olduğu nokta için pH değeri pK_a 'dir.

Deneysel veriler bu sefer Gran fonksiyonunda esdeğerlik öncesi bölge verileri kullanılarak $V_b[H^+] - V_b$ olacak şekilde grafiğe alınır. Elde edilen grafik lineer değildir, grafiğin lineer bölgesi seçilir ve buna özgü lineer kalibrasyon fonksiyonu belirlenir. Eğim, $-K_a$ 'yi verecektir. Bazı bölgede veriler yine grafiksel olarak değerlendirilir. Hem asidik bölgenin hem de bazik bölgenin x eksenini kestiği nokta esdeğerlik hacmini verir.

2 KAYNAK BILGISI

Bu çalışmada, metasiklin, klortetrasiklin, tetrasiklin ve oksitetrasiklinin, doksisisiklinden sıvı kromatografik ayırımları optimize edilmeye çalışılmış ve süt numunesinde doksisisiklinin kantitatif tayini amaçlanmıştır. Aşağıda bu konu ile ilgili literatürler hakkında bilgi verilmiştir.

Vienneau ve Kindberg, HPLC ile, TC analizi için, metod geliştirme üzerinde çalışmışlardır. Kolon olarak C₁₈ kolon (250mm x 4.6mm, 5 µm ID, Alltech Altima), Brownlee New koruyucu kolon RP-18, (7 µm, 15 x 3,2mm) ile birlikte kullanılmıştır. Standart çözeltiler, HPLC safliğinde metanol içinde hazırlanmıştır. Çalışma standart çözeltileri, 50, 100, 200, 500, 2000, 10000 ve 20000 µg mL⁻¹, derişiminde olup, metanoldeki TC stoktan hazırlanmıştır. Bu çalışmada mobil faz, metanol ve 25 mM EDTA ve 35 mM CaCl₂ dihidrat (tampon A, pH 6,5) (40:60, v/v) içeren 0,1 M sodyum asetat tamponundan oluşmaktadır. Akis hızı 1,0 mL/dakikadır. Enjeksiyon hacmi ise 50 µL'dir. Floresans dedektörde uyarılma dalga boyu 375 nm ve emisyon dalga boyu 512 nm'dir. TC ve 4-epi-tetrasiklinin 8 çözeltisi, çeşitli miktarlarda CaCl₂ ve EDTA içeren %40 metanol ve %60 tampon içinde 50 ng mL⁻¹ konsantrasyonunda hazırlanmıştır. CaCl₂ ve EDTA olmadan yalnız TC'nin pik emisyon spektrisi oldukça küçüktür. CaCl₂'nin eklenmesi, TC pikinin şiddetini 5 kez, CaCl₂ ve EDTA'nin her ikisinin de eklenmesi TC pikinin şiddetini yaklaşık olarak 24 kez arttırmıştır. Floresans cevap için EDTA'nin rolü çok önemlidir. TC ile EDTA ve Ca²⁺ 'un üçlü kompleks oluşturacak cevabi arttırmaları mümkündür (Vienneau ve Kindberg, 1997).

Carson ve arkadaşları, sütte TC, OTC ve CTC'nin tayini için, LC-MS sistemini kullanmışlardır. Bu çalışma için, süt numunesi propilen santrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 10 °C'de santrifüj edilerek krem tabakası ayrılmıştır. Supernatan kısmı, 2 mL asetik asit içeren tüpe konulmuştur. Çökmenin tamamlanması için süt yeniden santrifüj edilmiştir. Süt ekstraktının bu süzüntüsü metal-selat afinite kolona uygulanmış ve tetrasiklinler kolondan McIlvaine-EDTA-NaCl tamponu ile elue edilmişlerdir. Bu çalışmada kolon olarak, (PLRP-S, 150 x 3,9 mm, 5 µm) kolon

kullanılmıstır. Ayırmada, metanol-5 mM sulu oksalik asit (58:42, v/v) mobil fazi tercih edilmiştir. Enjeksiyon hacmi ise 100 µL'dir (Carson vd., 1998).

Posyniak ve arkadaşları, hayvan dokularındaki TC kalıntılarının (oksitetrasiklin, tetrasiklin ve klortetrasiklin) HPLC ile tayini üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmanın amacı, gıda üretiminde kullanılan hayvan dokularında, TC kalıntılarının hızlı ekstraksiyonu ve kantitasyonu için pratik olarak doğru ve kesin bir metot geliştirmektir. Basitleştirilen numune ekstraksiyonu ve stiren divinilbenzen SPE kartusu kullanılarak saflastırılan numunenin ekstraktları, sıvı kromatografi analizleri için kullanılmıştır. Biyolojik matrislerden tetrasiklinin izolasyonu, oksalik asit-asetonitril çözeltisi ile işlemin ardından oksalik asit tamponu ile yapılmıştır. SDBI (stiren-divinilbenzen) kartus ile katı faz ekstraksiyon kullanılmıştır. Analiz, polimerik analitik kolonda (PLRP-S 5 µm, 150x4,6 mm) gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak, 0,01 M oksalik asit-asetonitril, 75:25, (v/v) tercih edilmiştir. Kolona 20 µL sulu çözelti enjekte edilmiştir. Kalibrasyon grafiği, 20-1000 ng/g aralığında lineerdir. Tüm kalibrasyon eğrileri için korelasyon katsayıları, $r = 0,9993$ 'dür. Sığır ve domuz kaslarında dedeksiyon limitleri, OTC ve TC için 10 ng/g, CTC için 15 ng/g'dir. Karaciğer ve böbrekte dedeksiyon limitleri, OTC ve TC için 20 ng/g, CTC için 25 ng/g'dir. 50, 100 ve 200 ng/g katkı yapılmış domuz ve sığır kas, karaciğer ve böbrek numunelerinde TC geri kazanımları çalışılmıştır. TC katkısı yapılmış doku numuneleri için, OTC, TC ve CTC'in geri kazanma ortalaması %80 olarak belirtilmiştir (Posyniak vd., 1998).

Boatto ve arkadaşları çalışmalarında, Fletouris ve arkadaşları tarafından tanımlanan HPLC metodu ile White ve arkadaşları tarafından tanımlanan metottaki numune hazırlama işlemini bir arada kullanarak hazırladıkları metodu kullanmışlardır. Kalibrasyon standart numuneleri, tanık süt numunelerinden elde edilen ekstraktlara, primer stok standart çözeltilerin uygun hacimlerde eklenmesi ile hazırlanmıştır. Çalışmada, 10 mL süt üzerine 1 N HCl'den 2 mL ve 48 mL asetonitril eklenmiştir. Süpernatant kısmı, cam yünü bulunduran huni ile ayırma hunisine alınmıştır. 60 mL metilen klorür ve 120 mL hekzan eklenmiştir. Altındaki sulu faz, behere alınmış, kalan organik faz 4 mL su ile yıkanmıştır. Sulu fazlar birleştirilmiş, %5 lik NaHCO_3 ile

nötralize edilmiş ve 50-60 °C'lik su banyosunda, düşük basınç altında evapore edilmiştir. Elde edilen çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilmiştir. UV dedektörle yapılan çalışmada dalga boyu 335 nm'dir. Ters-faz (5 µm; 4,6 mm x 150 mm) kolon kullanılmıştır. Tüm standartların ve süt ekstrakt numunelerinin enjeksiyon hacmi 100 µL'dir. Analizler, izokratik şartlar altında, oda sıcaklığında, pH' si 2,3 olan fosforik asit-asetonitril (76:24,v/v) mobil fazi kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada, ekstraksiyon / deproteinizasyon basamağı basit, hızlı ve geri kazanım yüksektir. Uygulanan numune hazırlama işlemi, süt numunelerinin izokratik şartlar altında kromatografik analizlerini mümkün kılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 1 mg mL⁻¹ – 10 mg mL⁻¹ aralığındaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Korelasyon katsayısı 0,996'dan büyüktür. Geri kazanım % 85,8 ve 98,9 aralığındadır. Dedeksiyon limiti 5,2 ng mL⁻¹'dir. Katı-faz ekstraksiyonu, (SPE) ISOLUTE® C₈ tam kapalı kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Boatto vd., 1999).

Furusawa'nin çalışmasında, sütte OTC kalıntısı tayini için, sıvı kromatografik yöntem kullanılmıştır. Çalışma HPLC-DAD sisteminde yapılmıştır. Ayırma, LiChrospher 100RP-8 (5µm; 250x4mm I.D; Merck) kolonda gerçekleştirilmiştir. 1 mL süt numunesi üzerine 1,5 mL, %20 (v/v) TCA çözeltisi ilave edilmiş ve karışım, süzülmüştür. 20 µL süzüntü HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Mobil faza % 2-4 (v/v) asetik asit ilavesinin, pik kuyruklaşmasının önlenmesinde etkili olduğu çalışmacılarca belirtilmektedir. En iyi pik şekli ve kantitatif sonuç, asetonitril-asetik asit-su (28:4:68, v/v/v) mobil fazının kullanılmasıyla sağlanmıştır. OTC, bazık çözeltide (pH 7,0-8,5) bozduğundan numune hazırlamada TCA çözeltisi kullanılmıştır. Süt numunesi hacminin 1,5 kati kadar TCA çözeltisinin kullanılmasının, ekstraksiyon / deproteinizasyon ve OTC'nin geri kazanımının iyi olması için uygun geldiği belirtilmektedir. Bir numunenin hazırlanması için 3 dakikadan az bir süre gereklidir. OTC tayininde lineer bölge 0,2-20 ng aralığındadır. Korelasyon katsayısı yeterlidir (0,9997). Üç farklı katkı düzeyinde (0,1-0,5-1,0 µg/mL) süttten OTC'in geri kazanımı hesaplanmıştır, ortalama geri kazanımın %89,8'den yüksek olduğu açıklanmaktadır. OTC'in dedeksiyon limiti (LOD), 0,05 µg/mL'dir. Bu değer MRL (0,1 µg/mL) değerinden daha aşağıdadır (Furusawa, 1999).

Axia ve arkadaslari, insan kaninda ve biyolojik dokularda, doksisisiklini tayin etmeye çalismislardir. Bu çalismalarinda yüksek hassasiyeti, spesifiklii ve hizli olmasi nedeniyle HPLC metodunu tercih etmislerdir. %50 (v/v) ACN ve %0,15 trifloroasetik asit içeren mobil fazi kullanmislardir (Axia vd., 2000).

Kühne ve arkadaslari, hayvan kemiklerinde TC kalintilari üzerinde çalismislardir. Bu çalismada, 250 mm x 4.6 mm kartus kolon LiChrospher RP 18 kullanilmistir. Mobil faz olarak, %25 asetonitril ve %75 fosforik asit karisimini tercih etmislerdir. Akis hizi, 0.7 mL/dakika'dir. Tayin UV dedektör ile 360 nm'de gerçeklestirilmistir (Kühne vd., 2000).

Cinquina ve arkadaslari, yaptiklari çalismada, süt ve dokuda oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin ve doksisisiklinin kantitatif tayini için, sivi kromatografik yöntemi kullanmislardir. 5 g süt ve kas, homojenize edilmiş ve %20 triklorasetik asitten 2 mL eklenip çalkalanmistir. McIlvaine tamponundan (11,8 g sitrik asit mononhidrat; 13,72 g disodyum hidrojenfosfat dihidrat; 33,62 g etilendiamin tetraasetikasit disodyum tuzu 1 L su) 20 mL eklenmiş ve karisim santrifüj edilmistir. Süzüntü SPE kartusa uygulanmistir. Numune yüklendikten sonra kartus, 2 mL %5 metanol ile yikanmiş ve tetrasiklinler 3 mL metanol ile elue edilmistir. Çözücü, azot buhari altında uzaklastirilmiş ve kalinti 1 mL metanolde çözülmüş ve 0,45-µm PTFE filtreden filtre edilmistir. Analizler, HPLC-DAD sisteminde tamamlanmistir. Ayirmalar, izokratik sartlar altında, Hypersil C₈ kolon (250 x 4,6 mm I.D.; 5 µm) (Thermo Quest) ve 0,01 M oksalik asit-metanol-asetonitril (60:25:15(v/v)) mobil fazi kullanilarak yapilmistir. Kolon sicakligi 40°C'dir. Dedektör cevabi, 0,1-5,0 mg/L araliginda lineerdir. Oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin ve doksisisiklin için alikonma zamanlari sirasiyla, 5,5-6,2-9,2-11,1 dakikadir. Ilgilenilen bölgede bozucu pikler gözlenmemistir. Korelasyon katsayisi tüm standartlar için, 0,998'den yüksektir. Numunelere, farklı konsantrasyonlarda katkı yapilmistir. Geri kazanma yüzdelerinin %81'den büyük olduğu belirtilmektedir (Cinquina vd., 2003).

Furusawa'nin bir diger çalismasinda, sütte bulunan, TC (OTC, TC, CTC ve DC)'lerin rutin olarak tayini için LiChrospher®100 RP-8 (endcapped 250 x 4,6

mm² i.d; 5 µm; Merck) kolon kullanılmıstır. Mobil faz olarak, asetonitril-%7 (v.v¹) asetik asit (35:65, v.v¹) tercih edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 100 µL'dir. Bir numunenin analizi için gereken toplam süre 40 dakikadan azdır. Inek sütü, hacimce 5 kat saf su ile seyreltilmiştir. Çözeltinin 1 mL'si, ISOLUTE-C₈ (EC) SPE kartusa uygulanmıştır. TC'ler, 3 mL su ile elue edilmiştir. Eluat, buharlastırılmış ve kalıntı 1 mL HPLC mobil fazında çözülmüştür. Çözelti 0,5 µm filtre ünitesinden filtre edilmiştir. 0,1-0,2-0,3-0,5 ve 10 µg mL⁻¹ katkıli süt numuneleri kullanılarak, TC'in geri kazanımı tayin edilmiştir. Ortalama geri kazanım %80'den büyük ve standart sapma %5'ten küçüktür. Bu çalışmada, SPE eluentinde organik çözücü olarak etanol kullanılmıstır. OTC, TC, CTC ve DC standart çözeltilerinin absorpsiyon spektralleri (200-450 nm aralığında) DAD ile ölçülmüştür. OTC ve TC ayrılabilmiştir, fakat CTC ve DC, mobil faz olarak etanol, asetik asit ve su kullanıldığında ayrılmamışlardır. Pik kuyruklanması, mobil faza asetik asit eklemekle önlenmiştir. Katkı yapılmış süt numunelerinden izole edilmiş TC'lerin kalibrasyon eğrisi tüm TC'ler (korelasyon katsayısı > 0,995, P < 0,01) için, 0,1-1,0 µg.mL⁻¹ lineer aralığındadır (Furusawa, 2003).

3 MATERYAL VE METOT

Bu bölümde, tetrasiklinlerin kromatografik analizlerinde mobil faz pH standardizasyonunda ve tetrasiklinlerin pK_a degerlerinin potansiyometrik yöntemle tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

3.1 Kullanılan Cihazlar

3.1.1 Yüksek Performans Sivi Kromatografi Cihazı

Tetrasiklinlerin kromatografik ayırmaları ve tayinlerinde, Shimadzu HPLC cihazı kullanılmıştır. Sistemde, sistem kontrol ünitesi (SCL 10 AVP), pompa (LC10 ADVP), dedektör (SPDM 10A VP Foto Diyod Array), kolon firini (CTO 10 AVP) ve gaz giderme birimi (DGU 14 A) bulunmaktadır. Bu çalışmada, Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ) kolondan yararlanılmıştır.

3.1.2 pH/Iyon Metre

HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde Mettler Toledo MA 235 pH/Iyon analiz cihazı kullanılmıştır. Mettler Toledo in Lab. 420 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık (25°C ± 0,1°C), su banyosu (Heto HMT200 termostat ile birlikte Heto CBN 8-30) kullanılarak sağlanmıştır. Potansiyometrik pK_a tayinleri, azot atmosferinde, sabit sıcaklıkta, çift cidarlı hücrede gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için, Mettler Toledo MPC 227 pH/conductivity cihazı kullanılmıştır.

3.1.3 Santrifüj Cihazı

Süt numunesinin hazırlanması aşamalarında B.Braun International 3K30 model soğutmali santrifüj cihazı kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC safliktadır. Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve bunlar ile ilgili bilgiler, çizelge 3.1’de verilmistir.

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasallar ve özellikleri

Kimyasal	Açıklama
Oksitetrasiklin Hidroklorür (469,90 g/mol)	Sigma (%95)
Klortetrasiklin Hidroklorür (478,89 g/mol)	Aldrich (%80)
Tetrasiklin Hidroklorür (480,91 g/mol)	Aldrich (%80)
Doksisiklin Hidroklorür (480,90 g/mol)	Fluka (%98)
Metasiklin Hidroklorür (478,88 g/mol)	Riedel-de Haën (%99,4)
Asetonitril	Merck
Asetik asit	Riedel-de Haën (%100)
Ortofosforik asit	Merck
Potasyum asit fitalat	Merck
KBr	Merck
KCl	Merck
HCl	Merck, Titrisol
KOH	Merck, Titrisol

3.3 Kullanılan Çözeltiler

3.3.1 Mobil faz

Çalışmada tetrasiklinlerin ayırımı için, ortofosforik asit derisimi, 25 mM olan, %25 (v/v) ACN mobil fazı kullanılmıştır. Ayırmada mobil faz pH'sinin, kapasite faktörü üzerinde etkisini incelemek üzere, mobil fazın pH'i, 2,50; 2,75; 3,00; 3,50; 3,75; 4,00; 4,25; 4,50 değerlerinde olacak şekilde, 0,5 M NaOH ilavesiyle ayarlanmıştır. Bu NaOH çözeltisi %25 (v/v) ACN ortamında hazırlanmıştır. Bu çalışmaların sonucunda optimum pH belirlendikten sonra, bu pH'larda hazırlanan %23 ve %24 derisimlerinde ACN mobil fazı kullanılarak, ayırma üzerinde mobil faz derisiminin etkisi incelenmiştir. Çalışmalarda gerekli çözeltiler günlük hazırlanmıştır.

3.3.2 Tetrasiklin çözeltileri

Stok antibiyotik çözeltileri, 25 mg antibiyotik hidroklorürün, 25 mL suda çözülmesi ile hazırlanmıştır. Buna göre antibiyotiklerin stok derisimleri;

OTC=876 ppm

CTC=739 ppm

TC=739 ppm

DC=906 ppm

MC=918 ppm'dir.

Stok çözeltiler, günlük olarak hazırlanmış ve çalışma çözeltileri bu stok çözeltilerden seyreltilerek kullanılmıştır.

3.3.3 Primer Standard pH Referans Çözeltisi

Potasyum hidrojen fitalat, $C_6H_4(COOK)(COOH)$, 120°C'da, 2 saat kurutulmuştur. pH metrenin ayarlanmasında bu çözeltinin 0,05 mol/kg derisimi kullanılmıştır.

3.4 Metot

Bu çalışmada sıvı kromatografik ayırma koşulları, ilk olarak 25 mM ortofosforik asit içeren, %25 (v/v) ACN mobil fazında incelenmiştir. Mobil faz pH'sinin ayırma üzerine etkisini görmek için mobil faz, farklı pH değerlerinde (2,5; 2,75; 3,0; 3,50; 3,75; 4,00; 4,25 ve 4,50) hazırlanmış ve böylelikle ayırma için optimum pH koşulu saptanmıştır (Barbosa ve Nebot, 1992; Barbosa vd., 1994). Mobil faz pH'si, istenen değere, %25 asetonitrilde hazırlanmış, 0,5 M NaOH ilavesi ile ayarlanmıştır. Bu yaklaşımla pH 2,50 ve 2,75'in ayırma için daha uygun olabileceği dşnlerek, %23 ve %24 asetonitril içeren mobil fazların pH ları, sadece bu iki değere ayarlanmış ve bu mobil fazlar kullanılarak ayırmada asetonitril derisiminin etkisi incelenmiştir.

pH metre kalibrasyonu 0,05 mol/kg potasyum hidrojen fitalat zeltisi kullanılarak ve %25 (v/v) ACN-su mobil fazi için başlangıç değer esas alınarak, kombine pH elektrodu ile 298,15 K'de yapılmıştır. pH standardizasyonunda su-asetonitril ikili karışımında IUPAC kurallarına uyulmuştur.

HPLC çalışmasında kapasite faktörleri, t_0 dikkate alınarak hesaplanır. İyonik bileşiklerin kapasite faktörlerinin belirlenmesinde KBr zeltisi kullanılarak t_0 değeri belirlenir. Bu çalışmada gerek KBr ve gerekse tetrasiklinlerin alikonma zamanları her bir koşul için üçer enjeksiyonla belirlenmiştir. Bu üç ölçümün ortalaması alınarak komsu pikler için bulunan kapasite faktörleri, seçicilik faktörlerinin hesabında kullanılmıştır.

Bu tezde, ayırmada optimum pH aralığını belirlemek üzere, öncelikle tetrasiklinlerin pK_{a1} değerleri, potansiyometrik yöntemle tayin edilmiştir. Her bir titrasyondan önce elektrot, 25 C sabit sıcaklıkta, 0,1 M KCl bulunduran %25 (v/v) ACN ortamına, yine %25 (v/v) ACN ortamında hazırlanmış 0,1 M HCl ilave edilerek, asidik bölgede kalibre edilmiştir. E^0 değeri bulunduktan sonra, 0,1 M KCl bulunduran %25 (v/v) ACN ortamında, 2 mM derisiminde hazırlanan tetrasiklin zeltilerininin 20 mL'si, yine %25 (v/v) ACN ortamında hazırlanmış 0,025 M KOH ile titre edilmiştir. Titrasyondan nce 1M titrisolden seyreltilerek hazırlanan 0,025M KOH zeltisi,

karbonat hatası giderilecek şekilde hazırlanmış ve takiben aynı derisimdeki HCl ile ayarlanmıştır.

Sütte doksisisiklinin sivi kromatografik tayininde dis kalibrasyon grafiği kullanılmıştır.

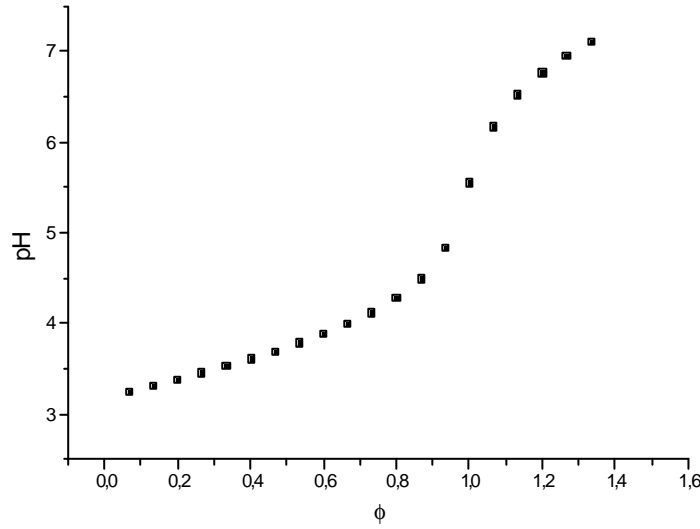
3.4.1 Süt Numunesinin Hazırlanması

Sütte doksisisiklinin sivi kromatografik tayinini yapmak için, 50 mL'lik polipropilen santrifüj tüpüne, analizi yapılacak süt numunesinden 40 mL alınarak 2000 g'de, 10 °C'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerindeki krem tabaka alındıktan sonra 2 mL asetik asit eklenmiştir. Daha sonra yine aynı şartlarda 25 dakika santrifüj yapılarak numune hazırlama işlemi tamamlanmıştır. Her bir numuneden 20 µL süzüntü sivi kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Numuneye belirli derisimlerde doksisisiklin katkısı yapılarak geri kazanma belirlenmiştir.

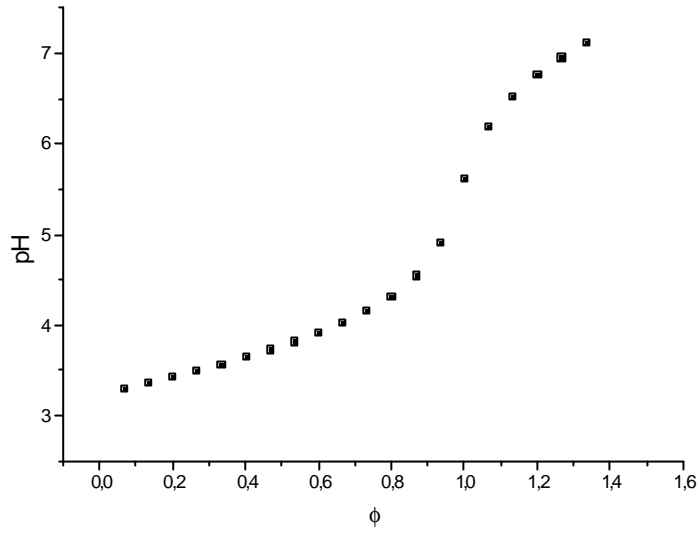
4 ARASTIRMA BULGULARI

4.1. Tetrasiklinlerin İyonlaşma Sabitlerinin Bulunması:

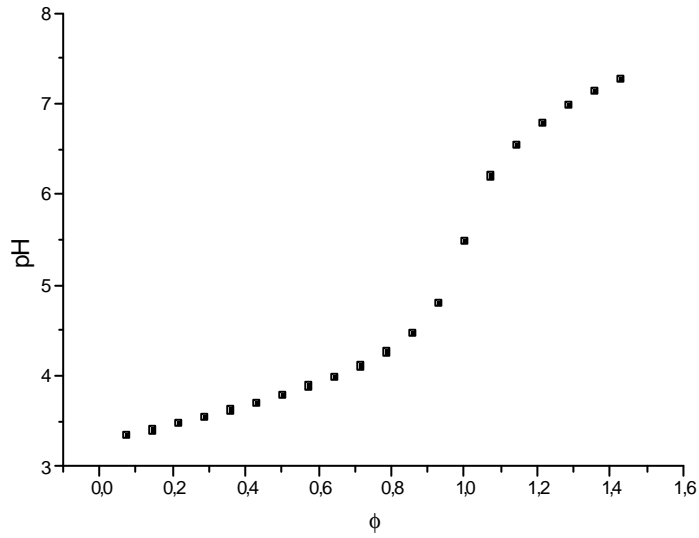
Bu çalışmada doksisiklinin diğer tetrasiklinlerden ayırımı için %25 asetonitril-su karışımının uygun olduğu belirlenmiş, bu ortama özgü 1. iyonlaşma sabitine ihtiyaç duyulmuştur. Tetrasiklinlerin %25 asetonitril-su ikili karışımında, iyonlaşma sabitlerinin bulunması için potansiyometrik yöntem kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle hücre kalibrasyonu yapılmıştır ve her bir antibiyotigin 2×10^{-3} M, 20 mL çözeltileri, 0,025 M KOH ile titre edilmiştir. mL titrant-mV grafikleri hazırlanmıştır. Bu grafiklerden eşdeğerlik noktası belirlenmiştir. Takiben F – pH grafikleri hazırlanmış ve birinci iyonlaşma sabiti öncelikle F – pH grafiklerinden yararlanılarak belirlenmiştir. Her bir antibiyotik için 2 titrasyon yapılmış ve ortalama değerler hesaplanmıştır.



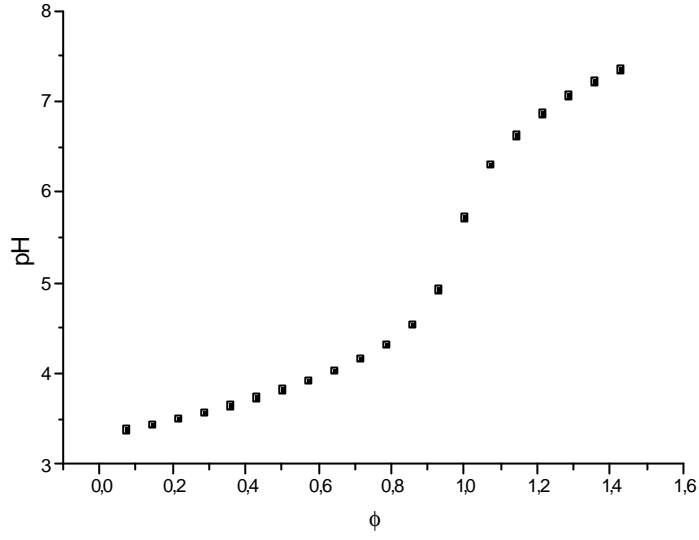
Sekil 4.1 2×10^{-3} M, 20 mL metasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 1. titrasyon grafiği



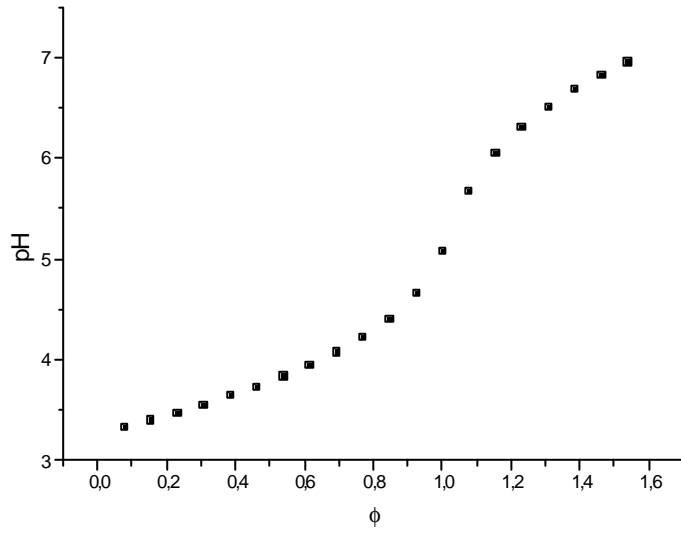
Sekil 4.2 2×10^{-3} M, 20 mL metasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 2. titrasyon grafiği



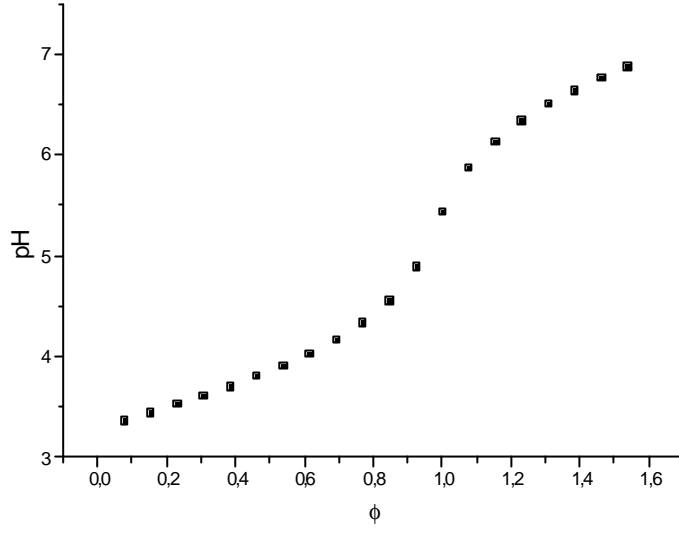
Sekil 4.3 2×10^{-3} M, 20 mL doksisisiklinin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 1. titrasyon grafiği



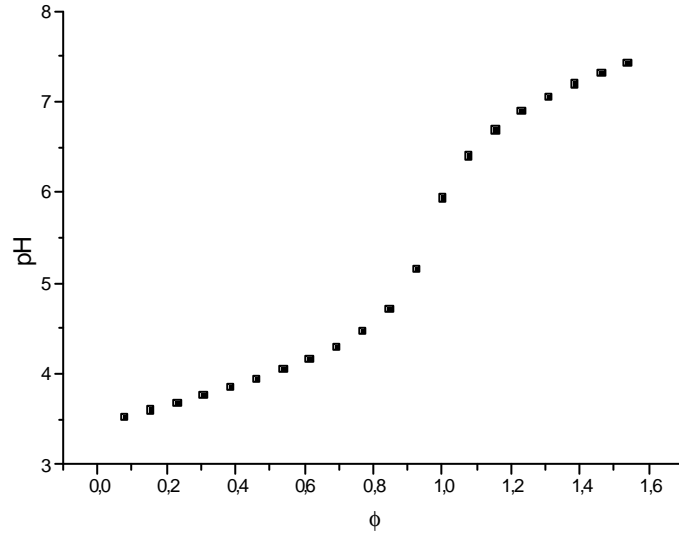
Sekil 4.4 2×10^{-3} M, 20 mL doksisisiklinin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 2. titrasyon grafiği



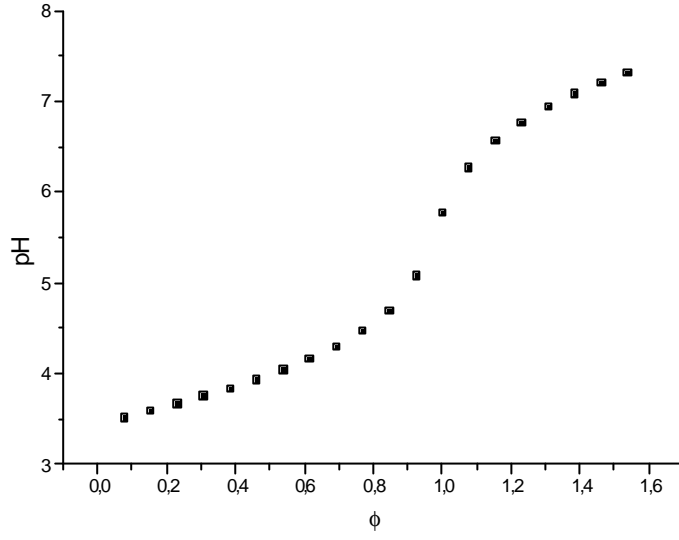
Sekil 4.5 2×10^{-3} M, 20 mL klortetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 1. titrasyon grafiği



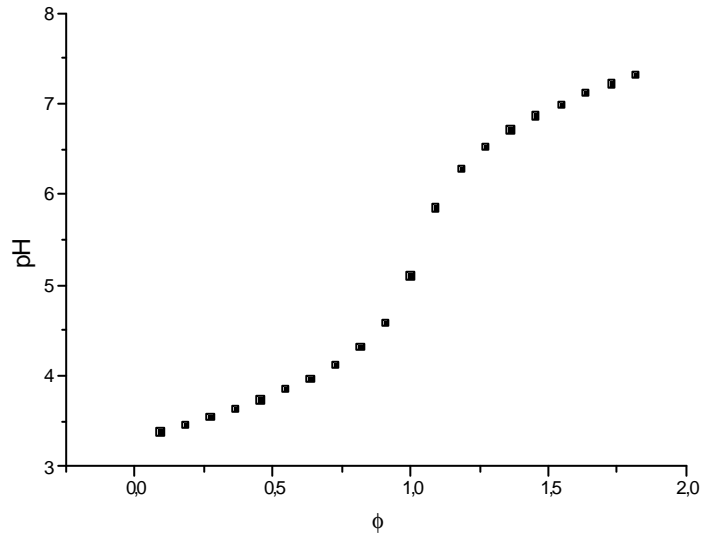
Sekil 4.6 2×10^{-3} M, 20 mL klortetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 2. titrasyon grafiği



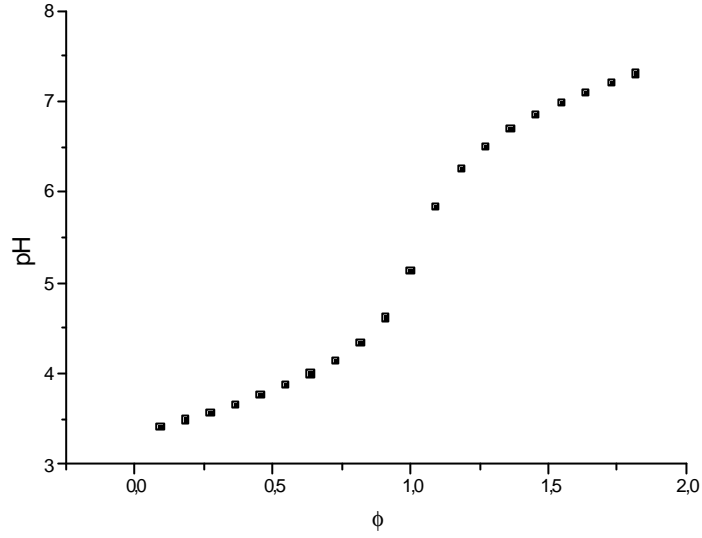
Sekil 4.7 2×10^{-3} M, 20 mL tetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 1. titrasyon grafiği



Sekil 4.8 2×10^{-3} M, 20 mL tetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 2. titrasyon grafiği

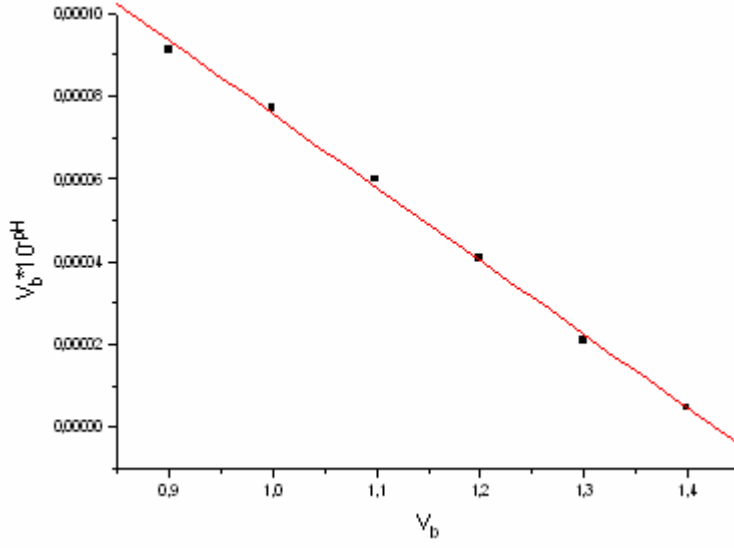


Sekil 4.9 2×10^{-3} M, 20 mL oksitetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 1. titrasyon grafiği



Sekil 4.10 2×10^{-3} M, 20 mL oksitetrasiklin çözeltisinin, 0,025 M KOH ile 2. titrasyon grafiği

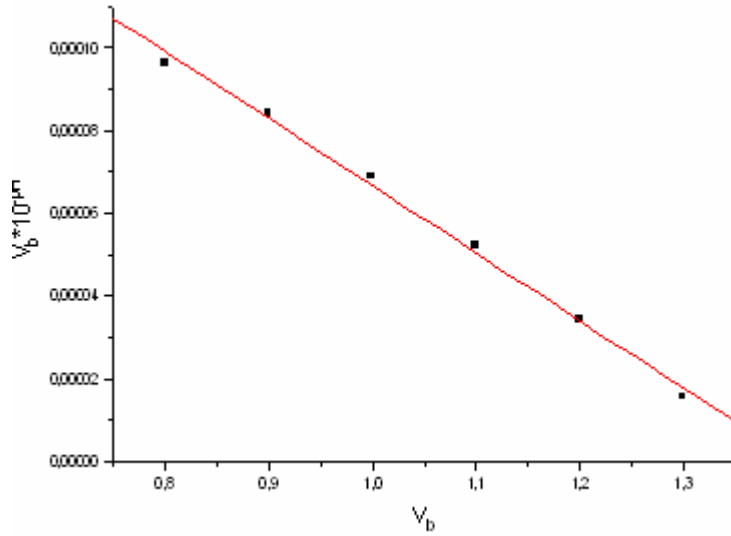
Iyonlaşma sabitinin hesaplanmasında 2. yöntem olarak Gran yöntemi kullanılmış ve sonuçlar yine birinci iyonlaşma sabitlerini hesaplamak için kullanılmıştır. Bu çalışmada Gran fonksiyonları, eşdeğerlik öncesi bölge verileri kullanılarak bulunmuştur. Bilindiği gibi bu grafiklerin eşdeğerlik öncesi bölgede çiziminde, x ekseninde bazin hacmi (V_b) ve y ekseninde ise $V_b \cdot [H^+]$ bulunmaktadır. Lineer fonksiyonun eğimi bize $-K_a$ 'yi vermektedir. X eksenini kesim noktasında V_b için okunan değer, çalışmada eşdeğerlik hacmidir.



Sekil 4.11 2×10^{-3} M 20 mL Doksisisiklinin 0,025 M KOH ile ilk titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi

Bu grafiğin doğru denklemi $V_b \cdot 10^{-4} = -0,00018 \cdot V_b + 0,00025$ şeklindedir.

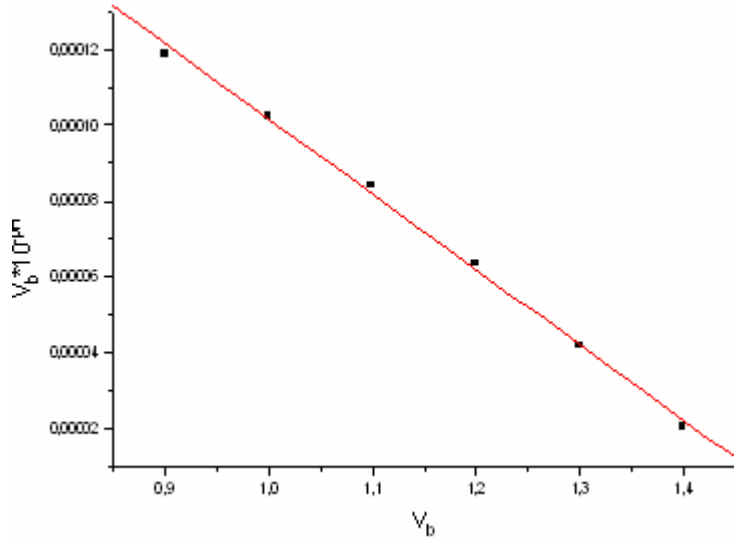
$R = -0,99875$ 'dir.



Sekil 4.12 2×10^{-3} M 20 mL Doksisisiklinin 0,025 M KOH ile ikinci titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi

Bu grafiğin doğru denklemi $V_b \cdot 10^{-4} = -0,00016 \cdot V_b + 0,00023$ şeklindedir.

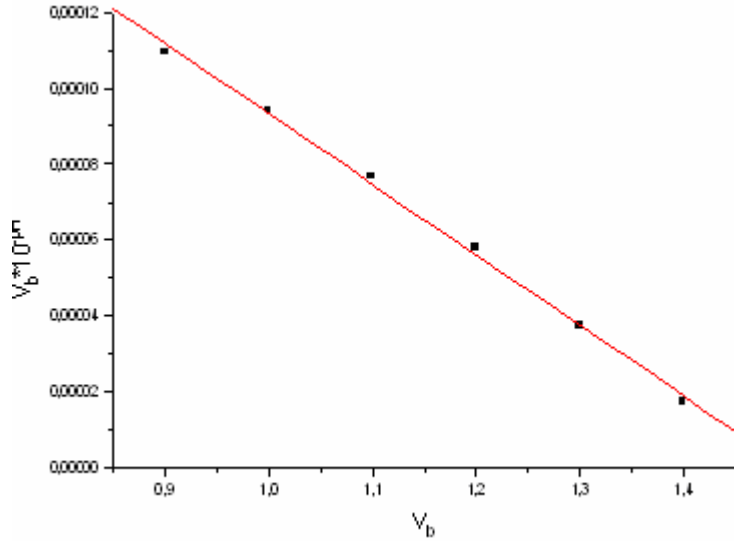
$R = -0,99743$ 'dir.



Sekil 4.13 2×10^{-3} M 20 mL Metasiklinin 0,025 M KOH ile ilk titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi

Bu grafiğin doğru denklemi $V_b \times 10^{-pH} = -0,00020 \times V_b + 0,00030$ şeklindedir.

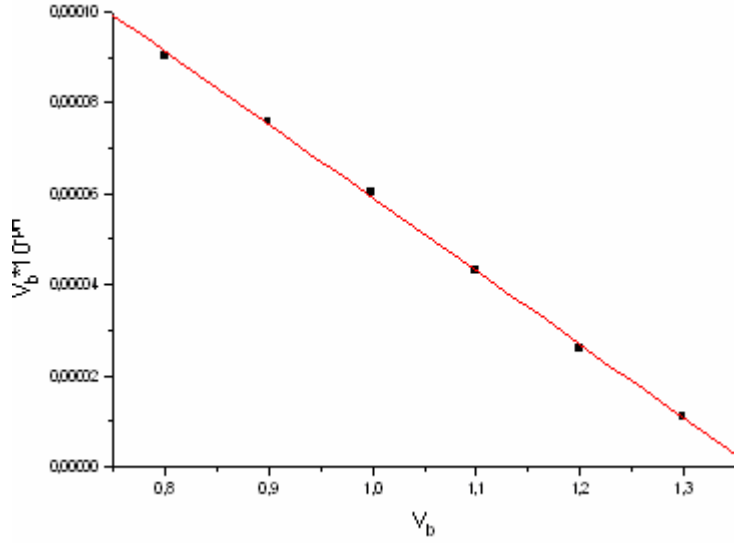
$R = -0,99859$ 'dir.



Sekil 4.14 2×10^{-3} M 20 mL Metasiklinin 0,025 M KOH ile ikinci titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi

Bu grafiğin doğru denklemi $V_b \times 10^{-pH} = -0,00019 \times V_b + 0,00028$ şeklindedir.

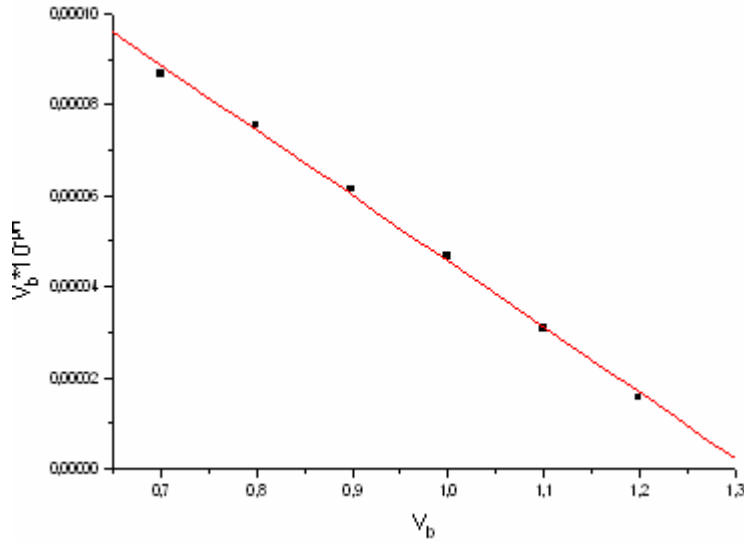
$R = -0,99857$ 'dir.



Sekil 4.15 2×10^{-3} M 20 mL Klortetrasiklinin 0,025 M KOH ile ilk titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi

Bu grafiğin doğru denklemi $V_b \times 10^{-pH} = -0,00016 \times V_b + 0,00022$ şeklindedir.

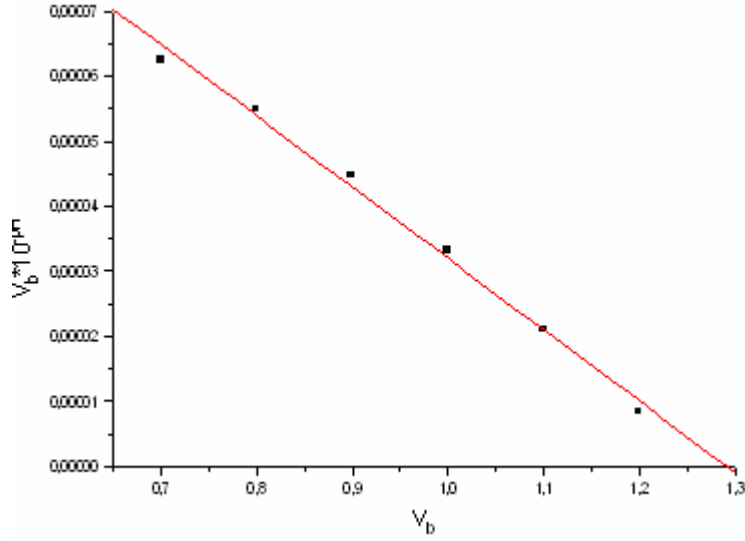
$R = -0,99956$ 'dir.



Sekil 4.16 2×10^{-3} M 20 mL Klortetrasiklinin 0,025 M KOH ile ikinci titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi

Bu grafiğin doğru denklemi $V_b \times 10^{-pH} = -0,00014 \times V_b + 0,00019$ şeklindedir.

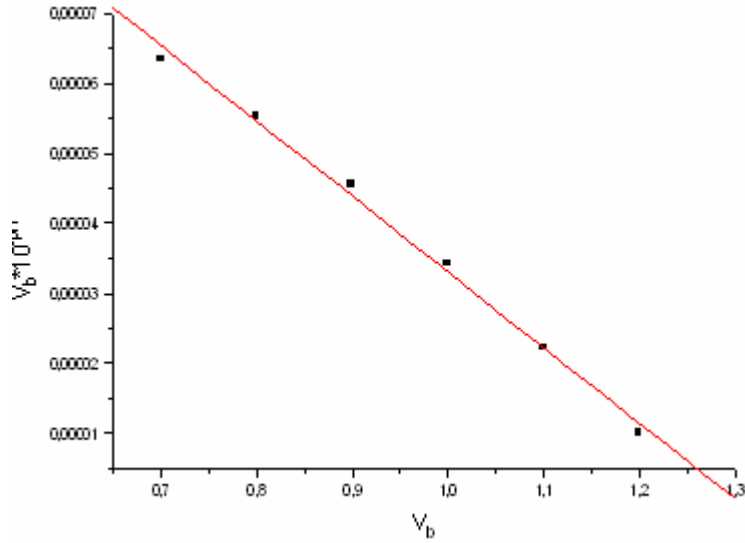
$R = -0,99862$ 'dir.



Sekil 4.17 2×10^{-3} M 20 mL Tetrasiklinin 0,025 M KOH ile ilk titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi

Bu grafiğin doğru denklemi $V_b \times 10^{-pH} = -0,00010 \times V_b + 0,00014$ şeklindedir.

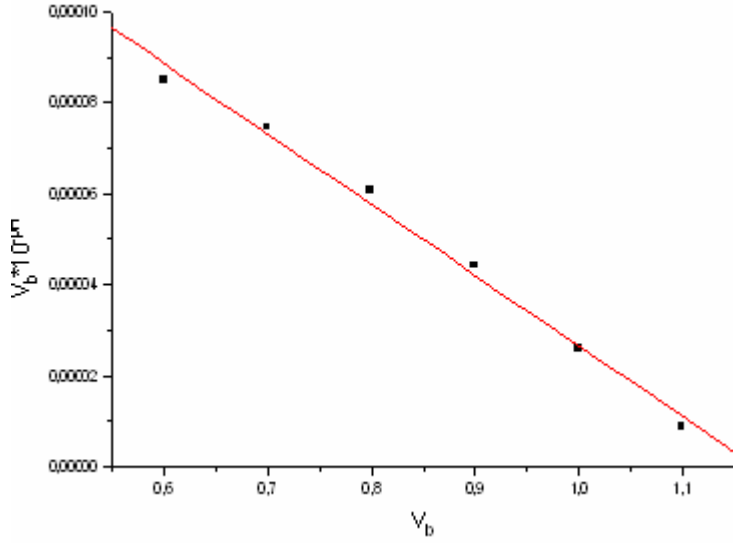
$R = -0,99654$ ' dir.



Sekil 4.18 2×10^{-3} M 20 mL Tetrasiklinin 0,025 M KOH ile ikinci titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi

Bu grafiğin doğru denklemi $V_b \times 10^{-pH} = -0,00011 \times V_b + 0,00014$ şeklindedir.

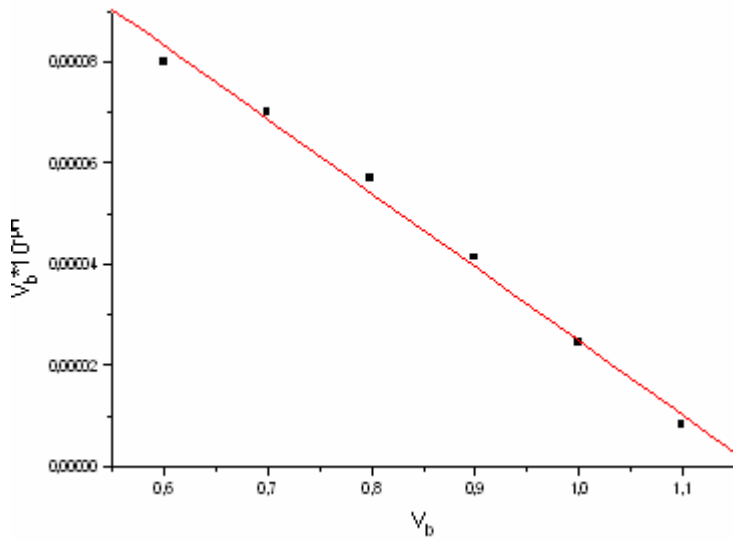
$R = -0,99732$ ' dir.



Sekil 4.19 2×10^{-3} M 20 mL Oksitetrasiklinin 0,025 M KOH ile ilk titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi

Bu grafiğin doğru denklemi $V_b \times 10^{-pH} = -0,00015 \times V_b + 0,00018$ şeklindedir.

$R = -0,99585$ 'dir.



Sekil 4.20 2×10^{-3} M 20 mL Oksitetrasiklinin 0,025 M KOH ile ikinci titrasyonunda Gran fonksiyonunun lineer bölgesi

Bu grafiğin doğru denklemi $V_b \times 10^{-pH} = -0,00015 \times V_b + 0,00017$ şeklindedir.

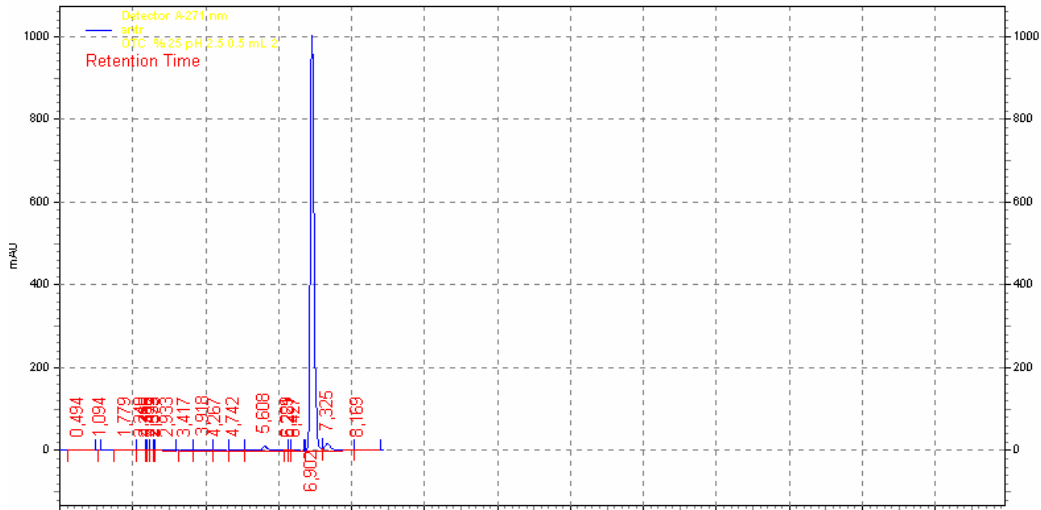
$R = -0,99631$ 'dir.

Çalışılan tüm tetrasiklin bileşiklerinin, her iki yöntemle de bulunan pK_{a1} değerleri çizelge 5.3'de verilmiştir.

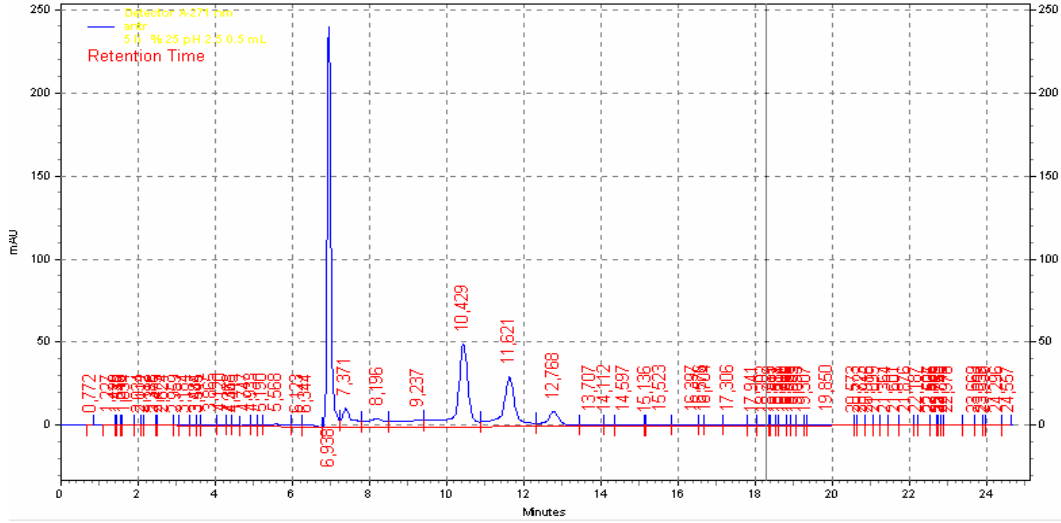
4.1 Mobil Faz pH'si Ile Kapasite Faktörleri Değişiminin İncelenmesi

Bu çalışmada ilk olarak tetrasiklinlerin (OTC, TC, CTC, MC, DC) alıkonma zamanları üzerinde pH etkisi incelenmiştir. Mobil faz olarak kullanılan %25 (v/v) asetonitril-su karışımı 25 mM fosforik asit içerecek şekilde hazırlanmış ve bu mobil fazın pH'si, 2,500; 2,750; 3,000; 3,500; 3,750; 4,000; 4,250; 4,500 değerlerine, 0,5M sodyum hidroksit ile ayarlanmıştır. Her pH koşulunda, ayırımı yapılan tüm maddelerin üçer enjeksiyonu yapılmış ve tetrasiklinlerin her pH koşulundaki kapasite faktörleri (k), seçicilik faktörleri (α) ile birlikte çizelgelerde (çizelge 5.4, çizelge 5.5, çizelge 5.6, çizelge 5.7, çizelge 5.8, çizelge 5.9, çizelge 5.10, çizelge 5.11, çizelge 5.12, çizelge 5.13, çizelge 5.14 ve çizelge 5.15'de) verilmiştir.

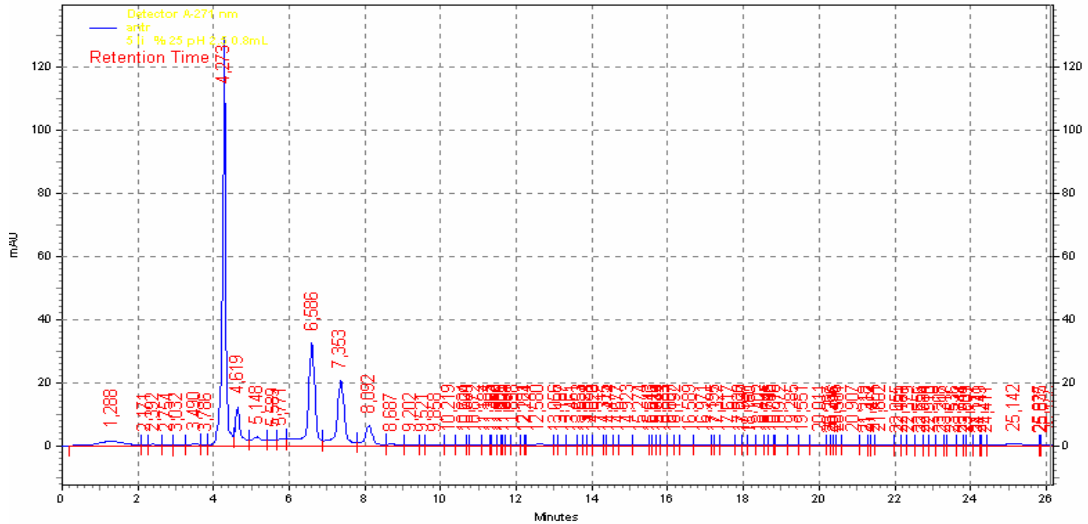
pH $2,500 \pm 0,005$ koşulunda, oksitetrasikline ait kromatogram şekil 4.21.'de, akis hızı 0,5 mL/dakika ve 0,8 mL/dakika olan ayırmalarda karışıma ait kromatogramlar, şekil 4.22 ve şekil 4.23'de verilmiştir.



Sekil 4.21 pH 2,500'da, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L; OTC için $\lambda=271$ nm; KBr için $\lambda=200$ nm

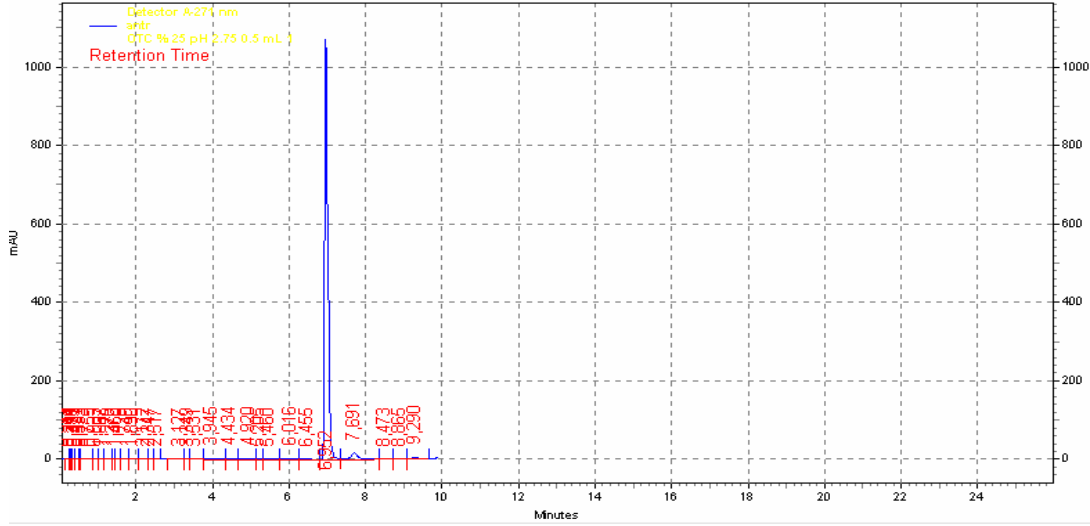


Sekil 4.22 pH 2,500'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

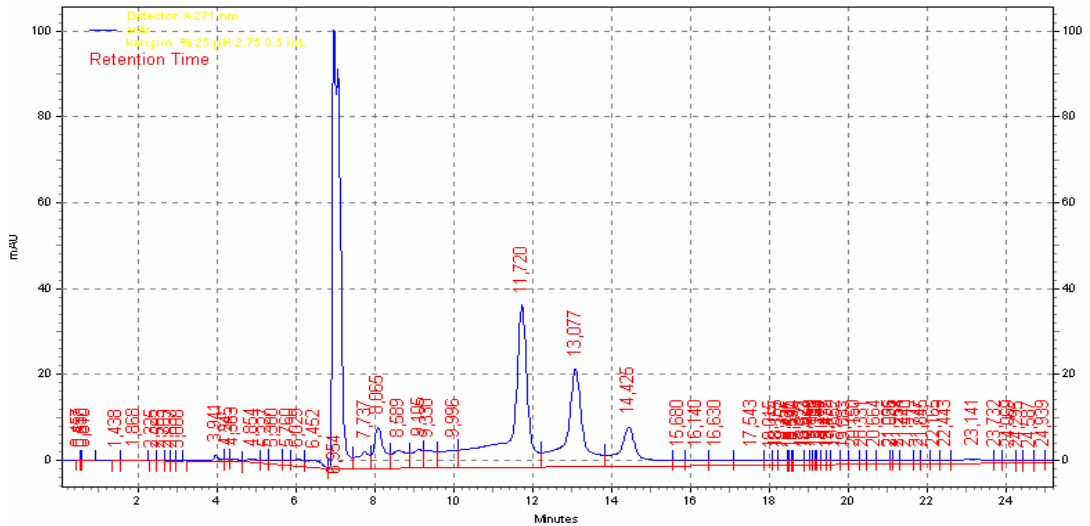


Sekil 4.23 pH=2,500 ± 0,005, akis hizi: 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

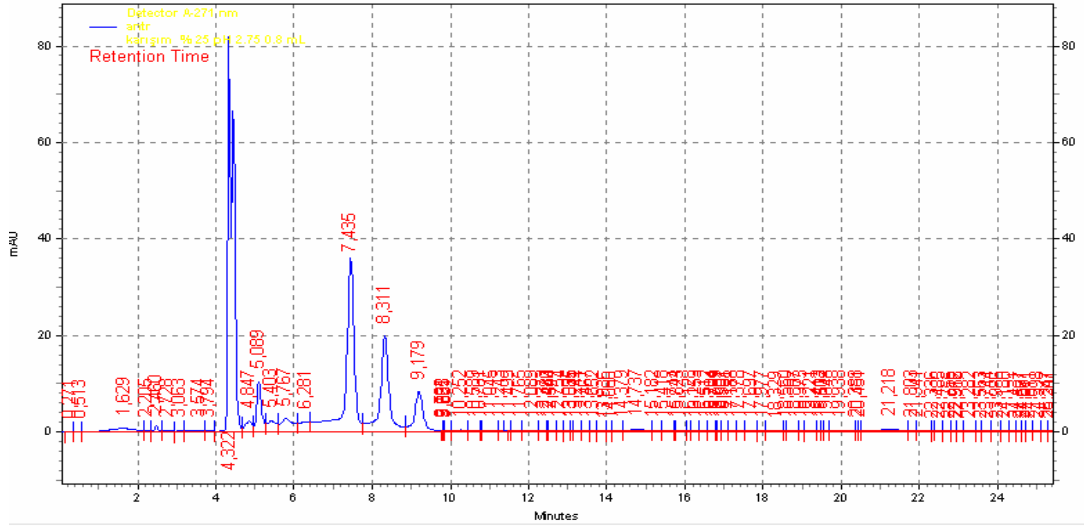
pH $2,750 \pm 0,005$ koşulunda, oksitetrasikline ait kromatogram şekil 4.24’de verilmiştir. Şekil 4.25 ve şekil 4.26’da ise, akis hızı 0,5 mL/dakika ve 0,8 mL/dakika olan koşullarda, karışıma ait kromatogramlar görülmektedir.



Şekil 4.24 pH 2,750’de, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

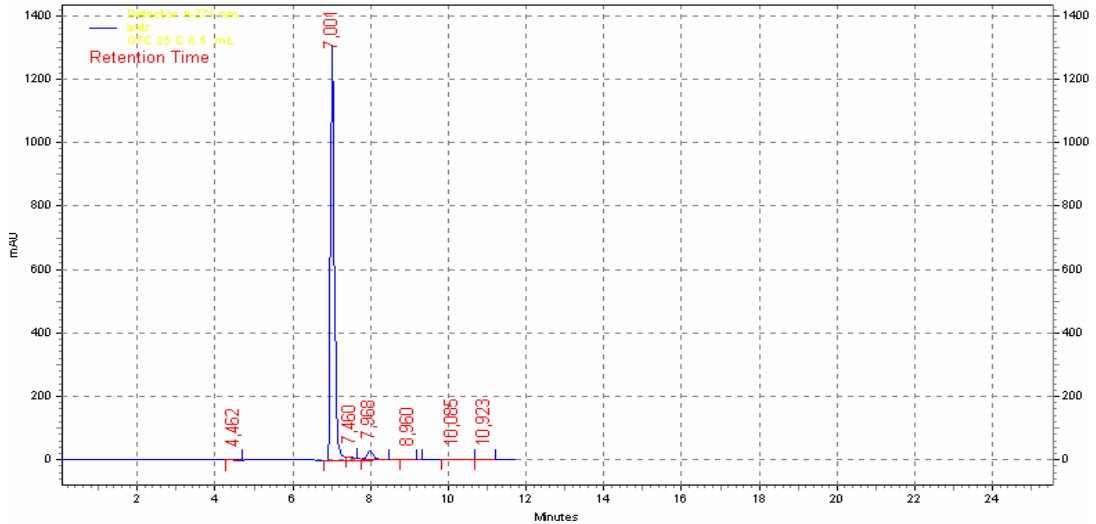


Şekil 4.25 pH 2,750’de, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda tetrasiklinlerin karışımına ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

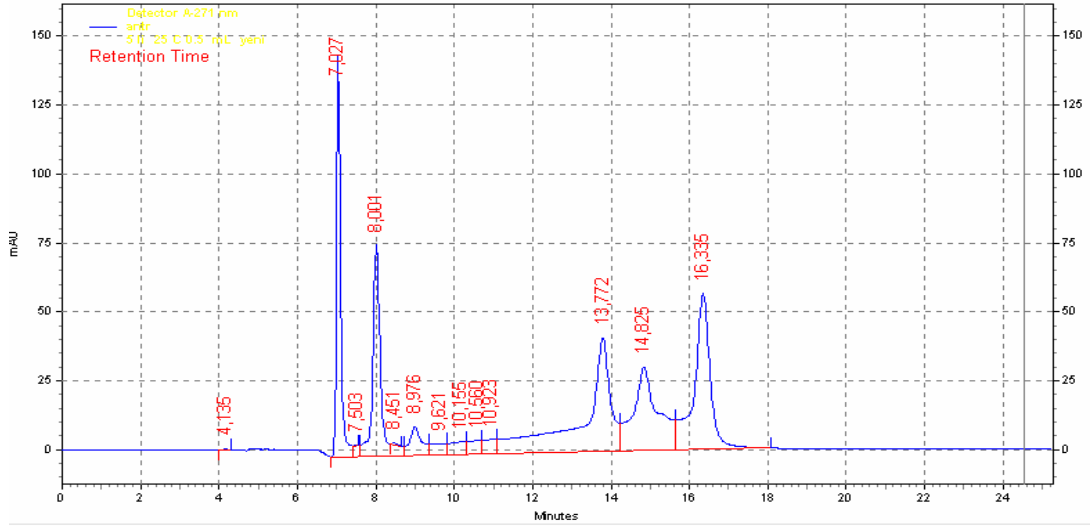


Sekil 4.26 pH 2,750'de, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

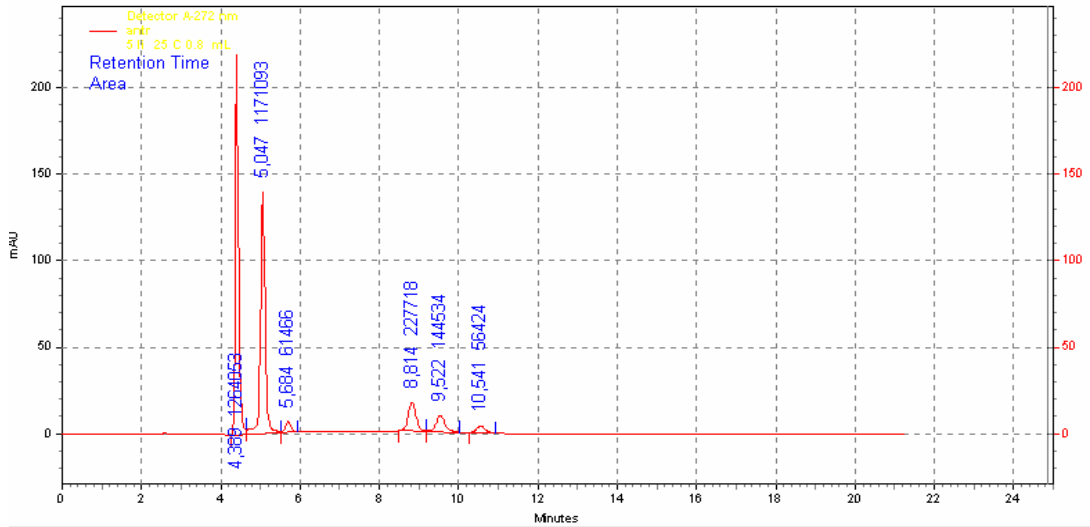
pH 3,000 ± 0,005 kosulunda, oksitetrasikline ait kromatogram sekil 4.27'de, akis hizi 0,5 mL/dakika ve 0,8 mL/dakika olan kosullarda karisima ait kromatogramlar, sekil 4.28 ve sekil 4.29'da verilmistir



Sekil 4.27 pH 3,000'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda oksitetrasiklinine ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

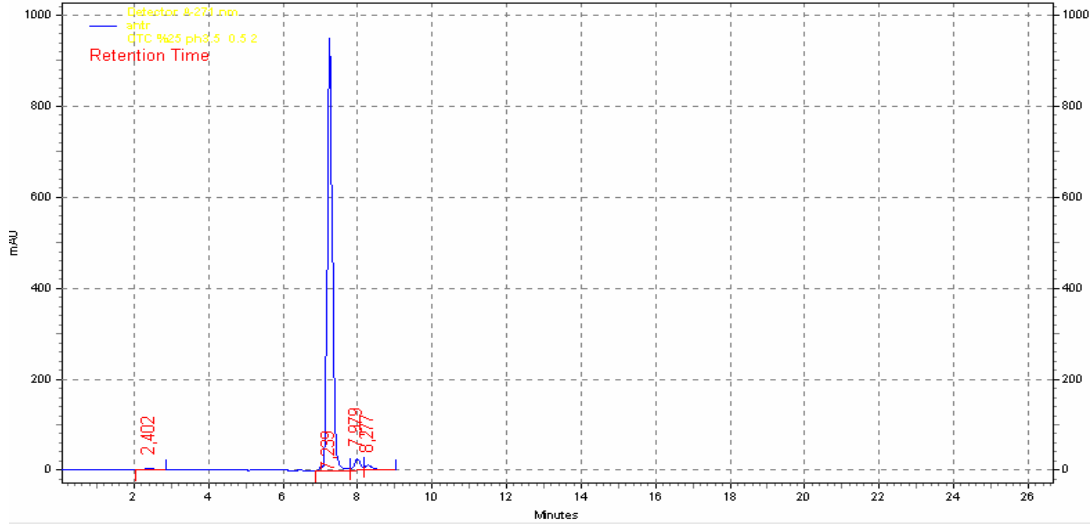


Sekil 4.28 pH 3,000'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

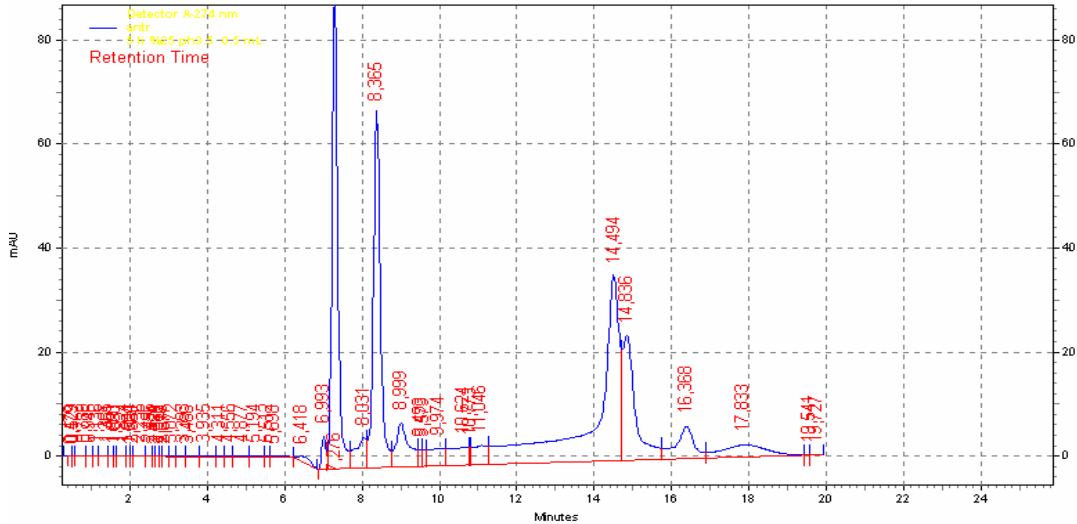


Sekil 4.29 pH 3,000'de, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

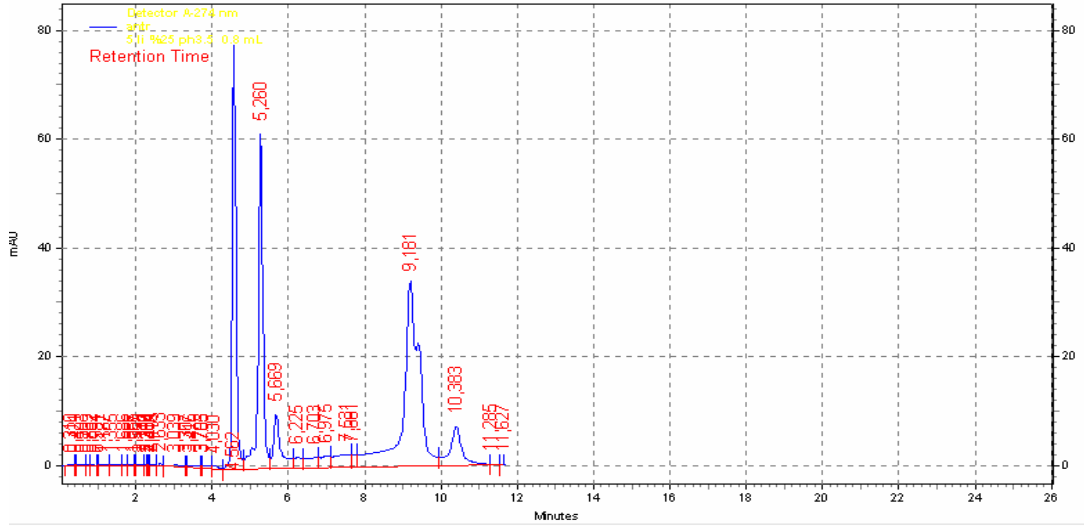
pH 3,500 ± 0,005 koşulunda, oksitetrasikline ait kromatogram şekil 4.30'da, akis hızı 0,5 mL/dakika ve 0,8 mL/dakika koşullarda karışımına ait kromatogramlar, şekil 4.31 ve şekil 4.32'de verilmistir.



Sekil 4.30 pH 3,500'da, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

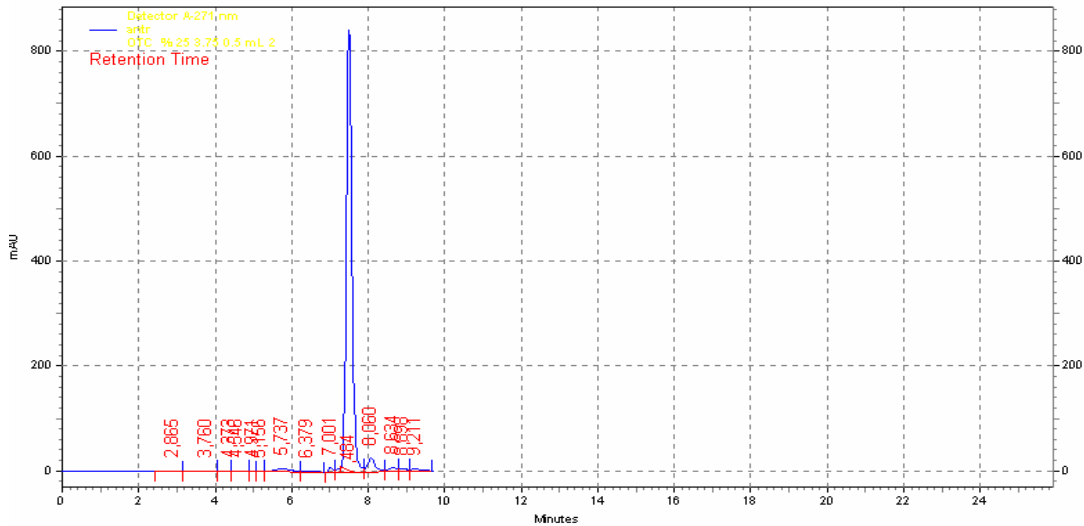


Sekil 4.31 pH 3,500'da, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda tetrasiklinlerin karışımına ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

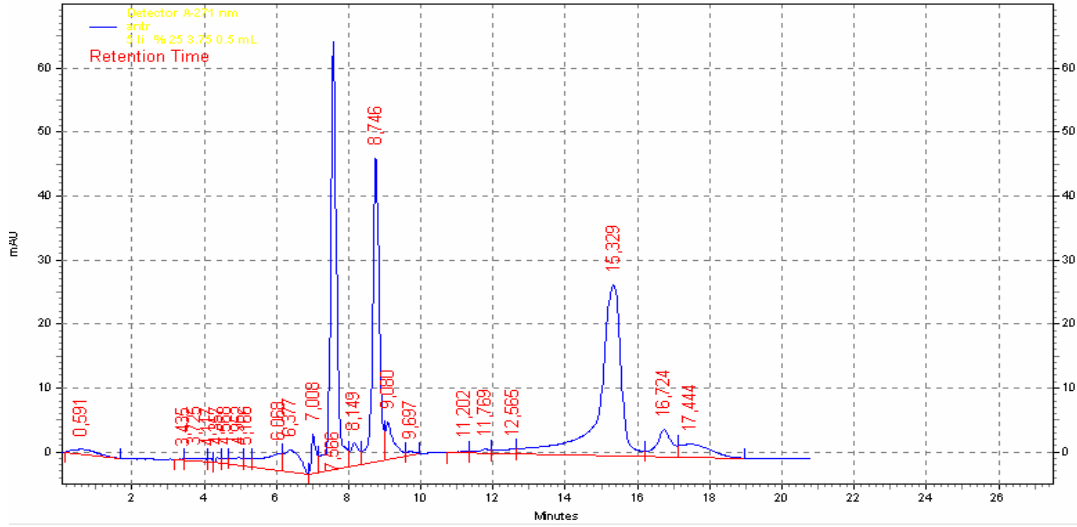


Sekil 4.32 pH 3,500'da, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

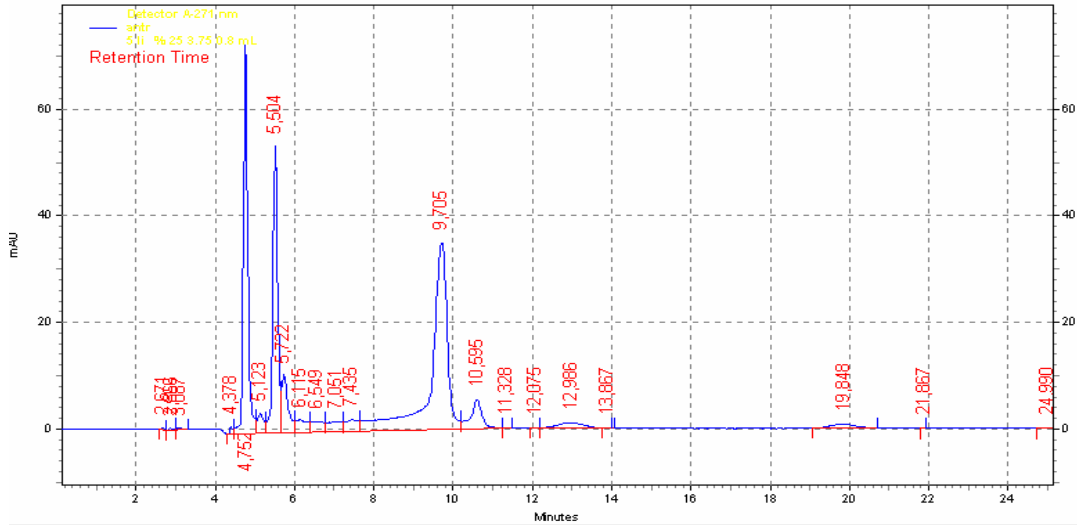
pH 3,750 ± 0,005 kosulunda, oksitetrasikline ait kromatogram sekil 4.33'de, akis hizi 0,5 mL/dakika ve 0,8 mL/dakika olan kosullarda karisima ait kromatogramlar, sekil 4.34 ve sekil 4.35'de verilmistir.



Sekil 4.33 pH 3,750'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; O C için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

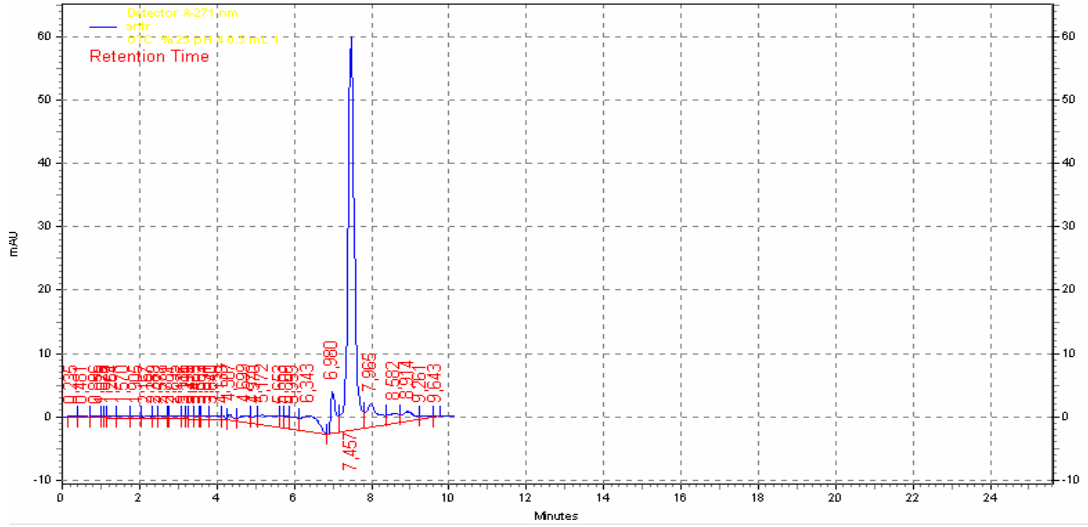


Sekil 4.34 pH 3,750'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

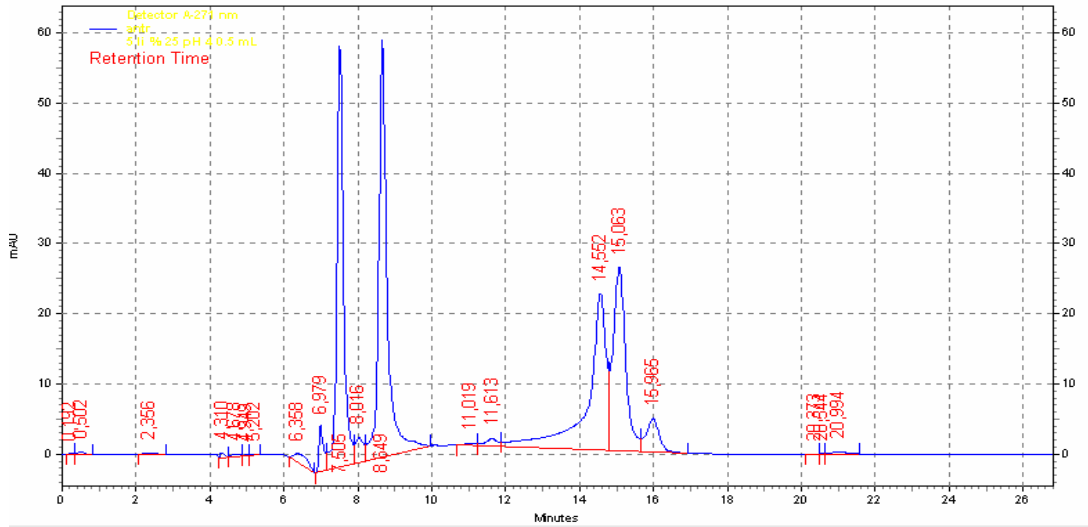


Sekil 4.35 pH 3,750'de, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

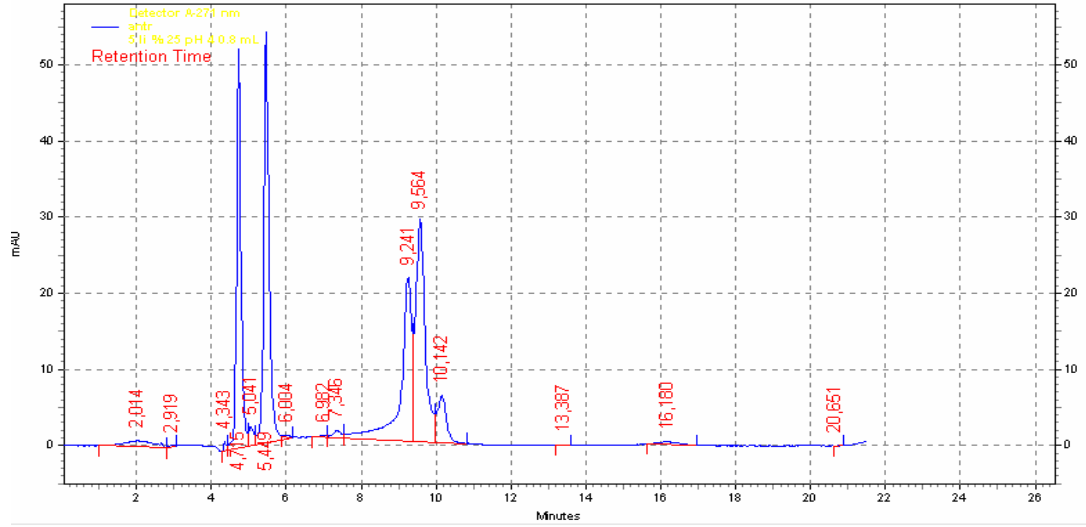
pH 4,000 ± 0,005 kosulunda, oksitetrasikline ait kromatogram sekil 4.36'de, akis hizi 0,5 mL/dakika ve 0,8 mL/dakika olan karisima ait kromatogramlar, sekil 4.37 ve sekil 4.38'da verilmistir.



Sekil 4.36 pH 4,000'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

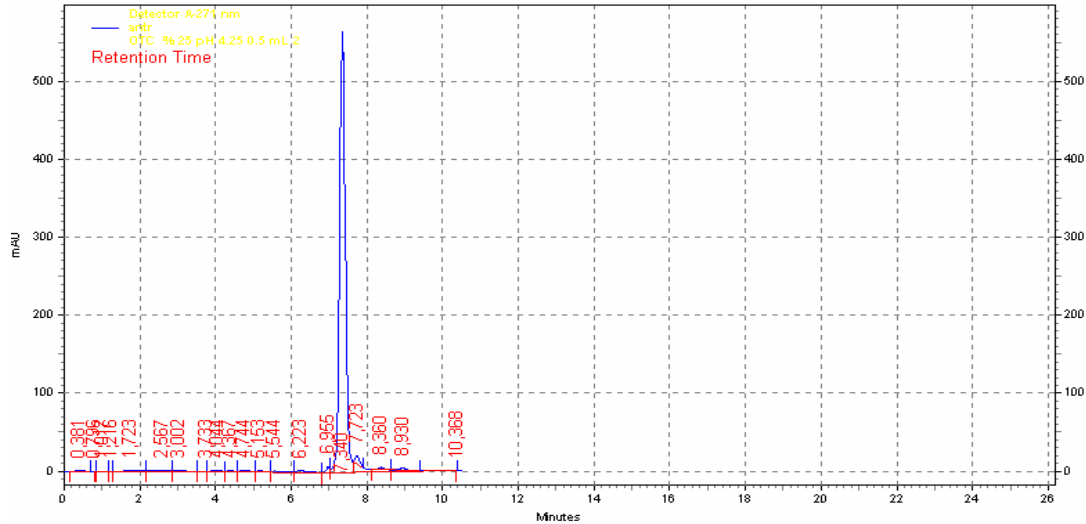


Sekil 4.37 pH 4,000'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

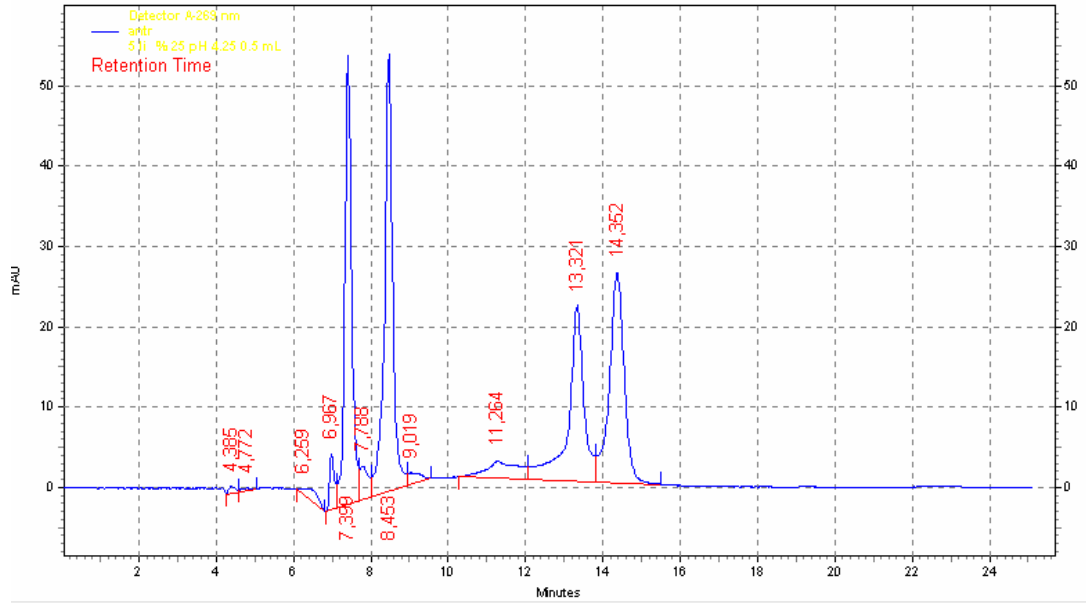


Sekil 4.38 pH 4,000'de, akis hızı 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimine ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

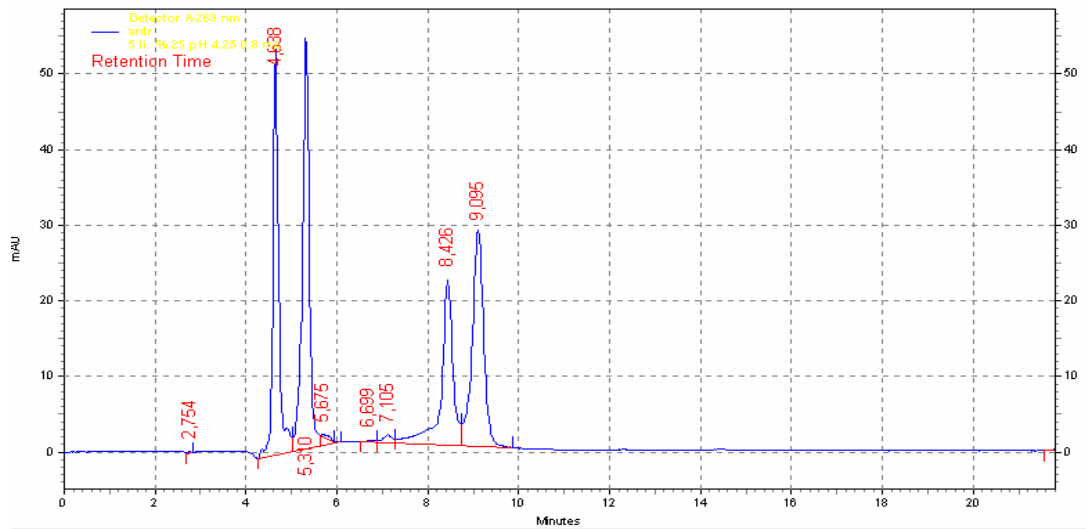
pH 4,250 ± 0,005 kosulunda, oksitetrasikline ait kromatogram sekil 4.39'da, akis hızı 0,5 mL/dakika ve 0,8 mL/dakika olan kosullarda karisima ait kromatogramlar, sekil 4.40 ve sekil 4.41'de verilmistir.



Sekil 4.39 pH 4,250'de, akis hızı 0,5 mL/dakika olan kosulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

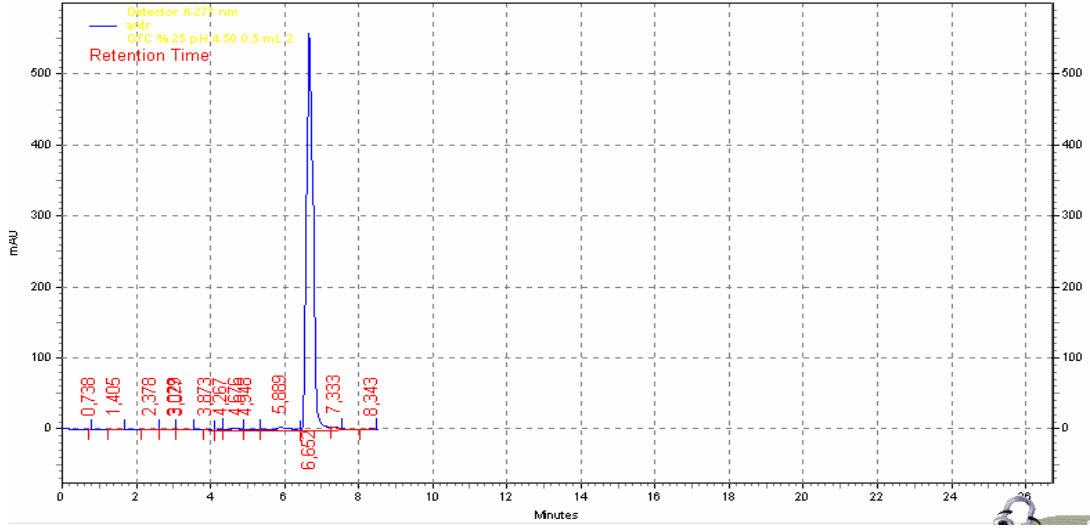


Sekil 4.40 pH 4,250'de, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

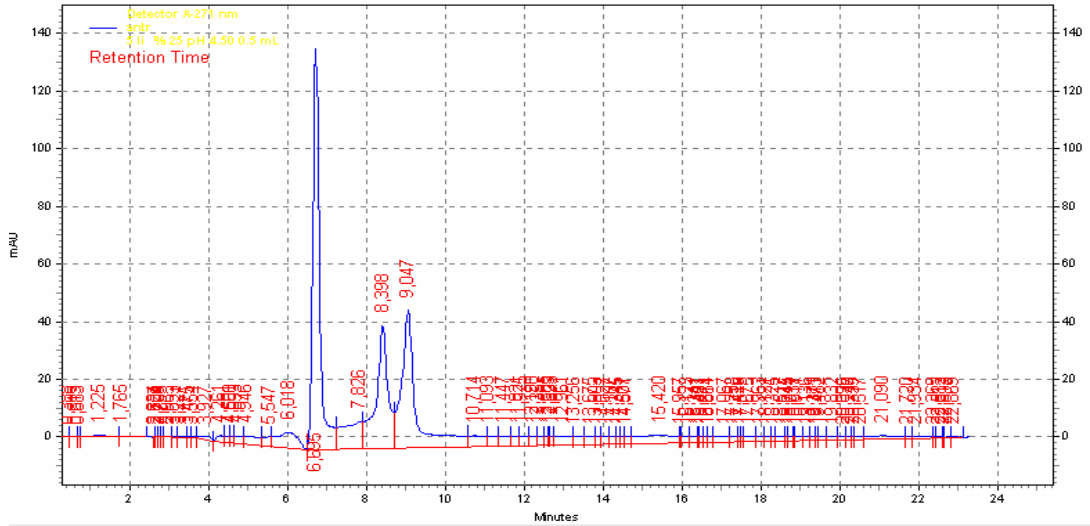


Sekil 4.41 pH 4,250'de, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

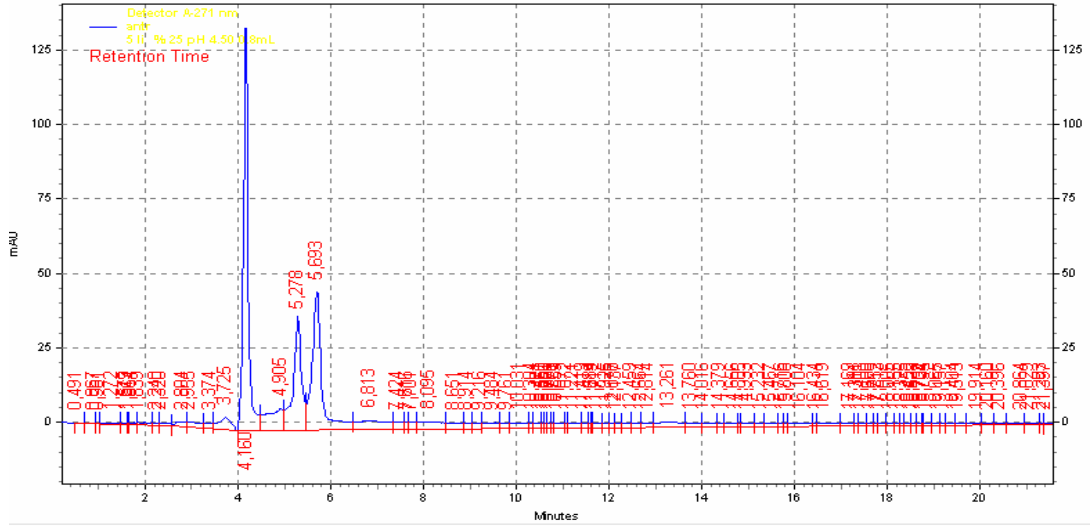
pH 4,500 \pm 0,005 koşulunda, oksitetrasikline ait kromatogram şekil 4.42’de, akis hızı 0,5 mL/dakika ve 0,8 mL/dakika olan iki farklı hızda karışıma ait kromatogramlar, şekil 4.43 ve şekil 4.44’de verilmiştir.



Sekil 4.42 pH 4,500’da, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda oksitetrasikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L; OTC için λ =271 nm; KBr için λ =200 nm

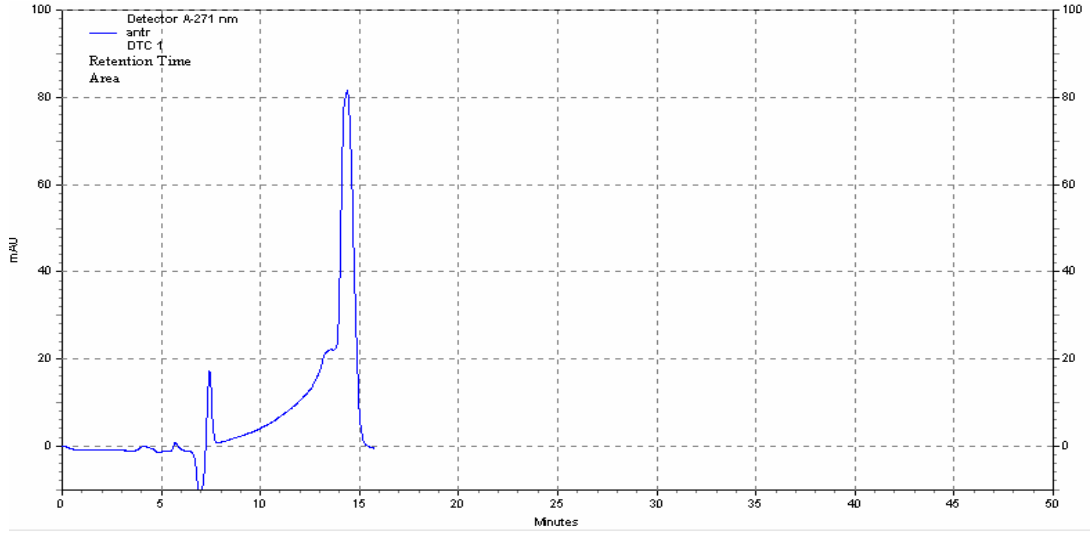


Sekil 4.43 pH 4,500’da, akis hızı 0,5 mL/dakika olan koşulda tetrasiklinlerin karışımına ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μ L; Tetrasiklinler için λ =271 nm; KBr için λ =200 nm

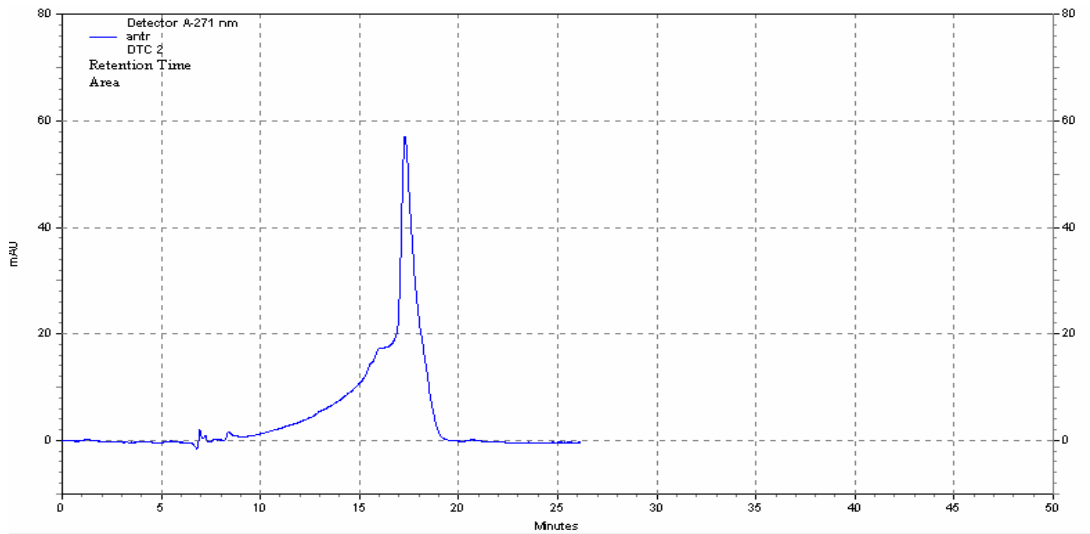


Sekil 4.44 pH 4,50’da, akis hizi 0,8 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimine ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %25 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Tetrasiklinler için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

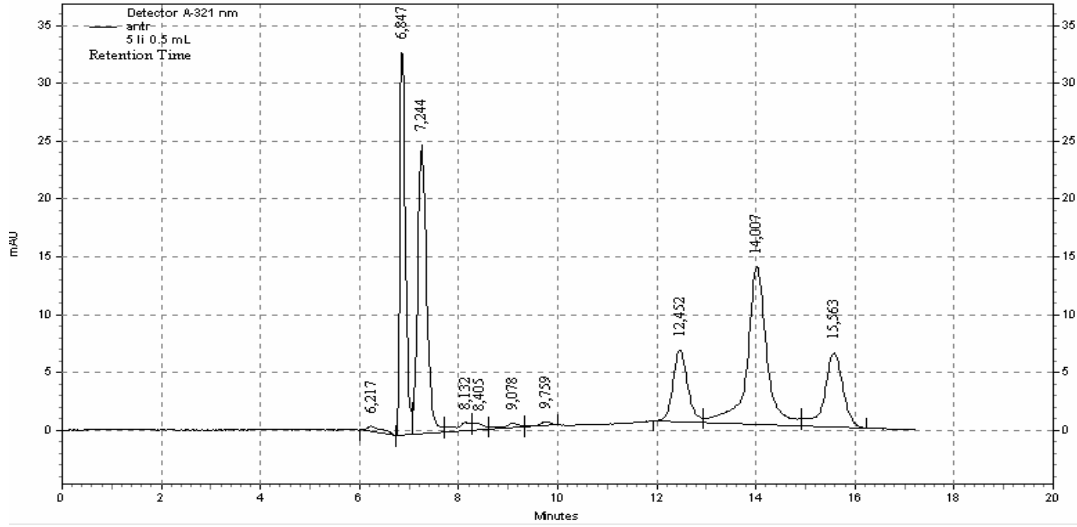
Yapılan pH taramasi sonucunda, çalisilan tetrasikle rin ayrimi için pH 2,50 ve 2,75’in daha uygun olacagi sonucuna varilmistir. Bu iki pH kosulunda, ayirmada temel sorun ilk iki piktedir ve oksitetrasiklin ile tetrasiklin kritik pik çifti olarak davranmaktadır. Bu iki pH’da asetonitrilin etkisini incelemek üzere %23 ve %24 asetonitril derisimlerinde, pH 2,5 ve 2,75’de mobil faz hazirlanmis ve her bir antibiyotik için üçer kez enjeksiyon yapilmistir. Bu kosullara ait kromatogramlar sekil 4.45, 4.46, 4.47, 4.48, 4.49 ve 4.50’de verilmiştir.



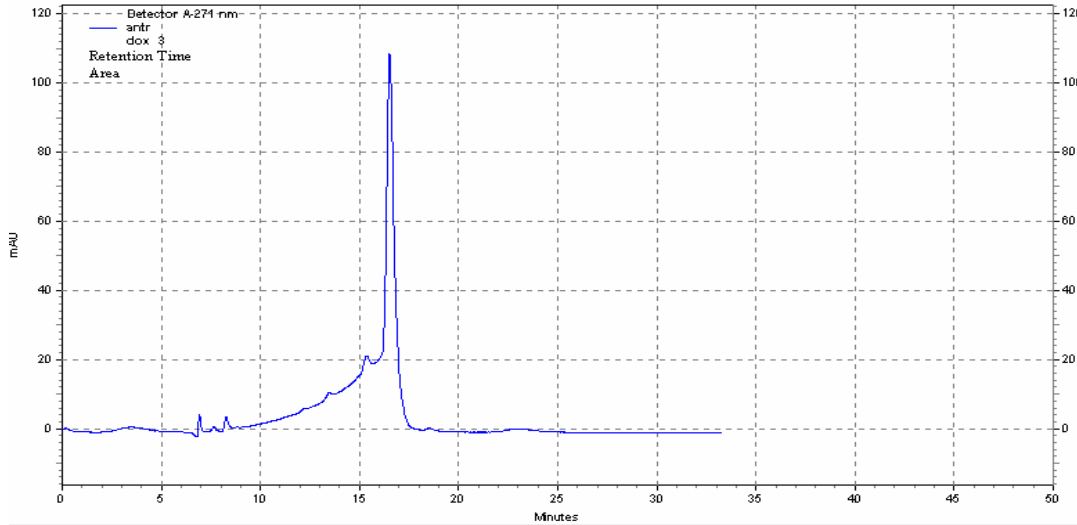
Sekil 4.45 pH 2,500'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda doksisisikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %23 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm



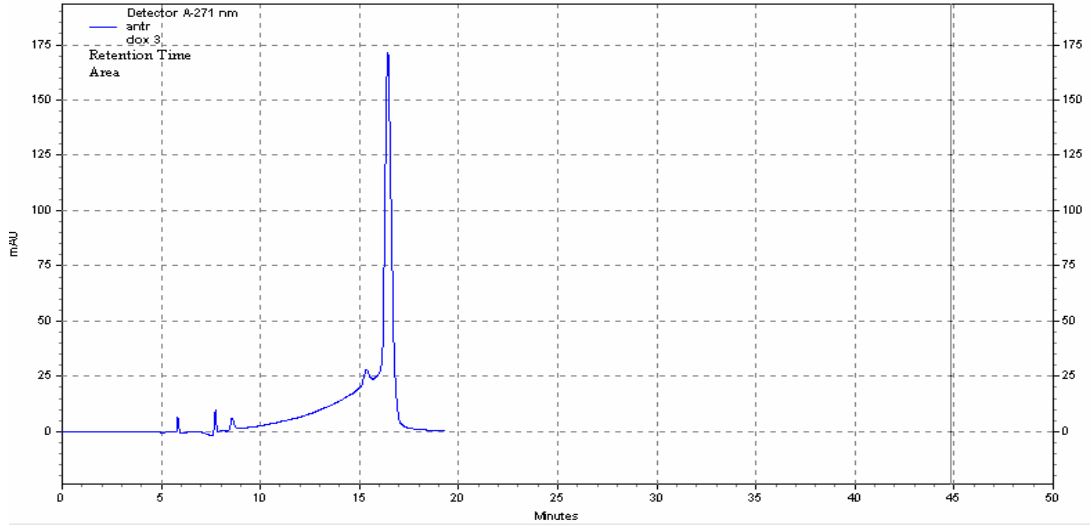
Sekil 4.46 pH 2,750'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda doksisisikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %23 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm



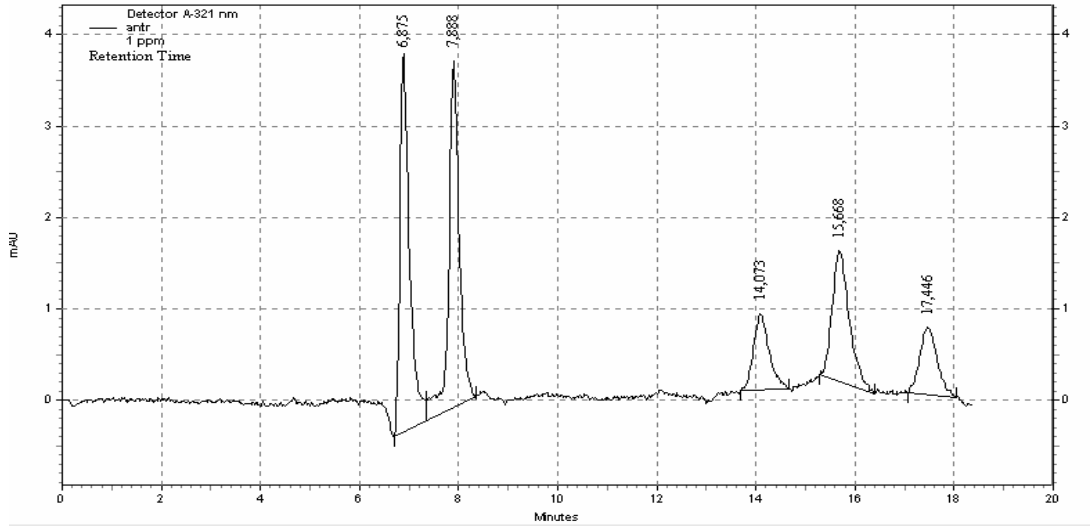
Sekil 4.47 pH 2,500'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimine ait kromatogram 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %23 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm



Sekil 4.48 pH 2,750'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda doksisikline ait kromatogram 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %24 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

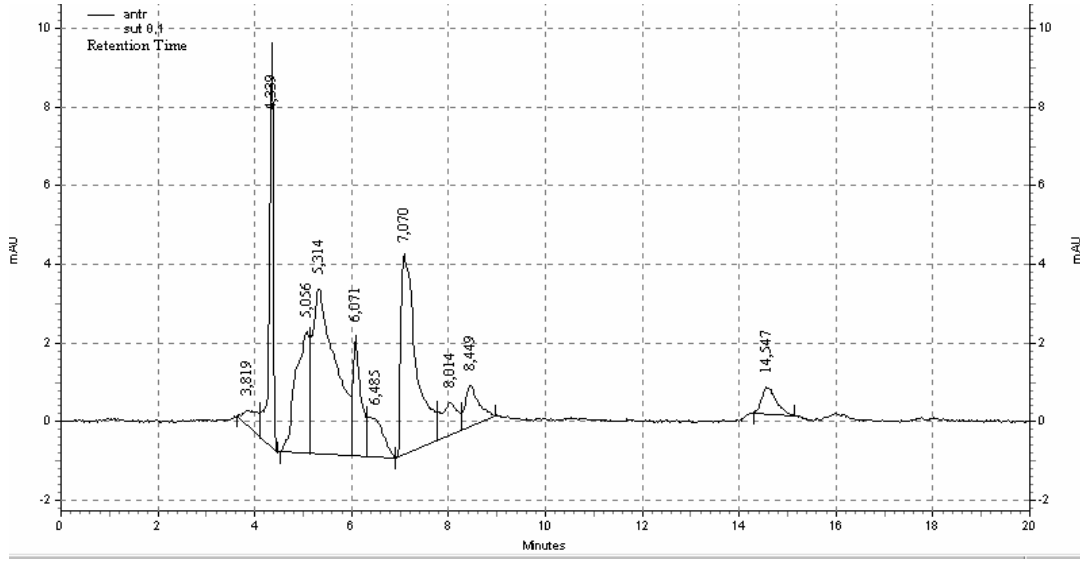


Sekil 4.49 pH 2,500'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda doksisisikline ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %24 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm



Sekil 4.50 pH 2,750'da, akis hizi 0,5 mL/dakika olan kosulda tetrasiklinlerin karisimina ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortami, %24 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sicakligi: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL; OTC için λ=271 nm; KBr için λ=200 nm

Çalışılan süt numunesine ait kromatogram şekil 4.51’de verilmiştir. Şekilden de anlaşıldığı gibi doksisisiklin varlığı saptanamamıştır.



Sekil 4.51 pH 2,750’de, akis hızı 0,8 mL/dakika olan koşulda süt numunesine ait kromatogram. 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %24 (v/v); Kolon: Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 μ); Kolon sıcaklığı: 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 μL

5 TARTISMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, sütte doksisisiklinin sivi kromatografik tayini amaçlanmıştır. Tetrasiklinler, ülkemizde oldukça yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdendir. Bu nedenle, sütte mevcut olabilecek diğer tetrasiklinlerin, doksisisiklinin kantitatif tayininde bozucu etkiler yapabilecekleri düşüncesiyle, metasiklin, klortetrasiklin, tetrasiklin ve oksitetrasiklinin, doksisisiklininden sivi kromatografik ayırımları optimize edilmeye çalışılmıştır. Bilindiği gibi, ters faz sivi kromatografide ayırma için uygun koşul $pK_a \pm 1,5$ 'tur. Bu nedenle öncelikle doksisisiklin, metasiklin, klortetrasiklin, tetrasiklin ve oksitetrasiklinin, ayırma için ödenemelerle uygun bulunan %25 asetonitril-su ortamındaki pK_a değerleri potansiyometrik yöntemle belirlenmiştir.

Potansiyometrik yöntemle pK_a tayininde F-pH sigmoidallerinden yararlanılmış ve yarı nötralizasyon değerlerinden birinci iyonlaşma sabitleri belirlenmiştir. Tüm maddeler için iki titrasyon yapılmıştır. Çizelge 5.1'de, bu yöntemle bulunan pK_{a1} değerleri görülmektedir.

Çizelge 5.1 Tetrasiklinlerin F-pH sigmoidallerinden belirlenen iyonlaşma sabitleri

Bilesik Ismi	pK_{a1} (1.titrasyon)	pK_{a1} (2.titrasyon)
Metasiklin	3,69	3,82
Doksisisiklin	3,79	3,82
Klortetrasiklin	3,78	3,82
Tetrasiklin	3,97	3,94
Oksitetrasiklin	3,75	3,74

Çalışmada, tetrasiklinlerin iyonlaşma sabitlerinin bulunması için kullanılan diğer grafikler, Gran grafikleridir. Gran fonksiyonları, eşdeğerlik öncesi bölge verileri kullanılarak bulunmuştur. Bilindiği gibi bu bölgede lineer fonksiyonun eğimi bize $-K_a$ 'yi vermektedir. X eksenini kesim noktasında V_b için okunan değer, çalışmada eşdeğerlik hacmidir (Levie,1997). Çizelge 5.2'de de, bu yöntemle bulunan ortalama pK_{a1} değerleri görülmektedir.

Çizelge 5.2 Tetrasiklinlerin Gran grafiği ile bulunan iyonlaşma sabitleri

Bilesik Ismi	pK _{a1} (1.titrasyon)	pK _{a1} (2.titrasyon)
Metasiklin	3,74	3,80
Doksisiklin	3,70	3,72
Klortetrasiklin	3,80	3,85
Tetrasiklin	4,00	3,96
Oksitetrasiklin	3,82	3,82

Çizelge 5.3'de, her iki yöntemle elde edilen ortalama pK_{a1} değerleri verilmiştir. Görüldüğü gibi iki yöntemle elde edilen sonuçlar birbirleriyle uyum içindedirler.

Çizelge 5.3 F-pH grafikleri ve Gran yöntemi ile bulunan pK_{a1} değerleri

Bilesik Ismi	pK _{a1} (Sigmoidal)	pK _{a1} (Gran)
Metasiklin	3,76	3,77
Doksisiklin	3,80	3,71
Klortetrasiklin	3,80	3,83
Tetrasiklin	3,96	3,98
Oksitetrasiklin	3,75	3,82

Tetrasiklinlerin pK_{a1} değerleri suda 3,36 olarak verilmektedir (Hosny vd.,1999). %25 asetonitril-su ortamında pK_{a1} değerlerinin büyümesi, ortamın dielektrik sabitinin azalması ile asitliğin zayıflamasının bir sonucudur.

Bu çalışmada, mobil faz üzerinde pH etkisini incelemeye önce, ön denemeler yapılarak, C₈ kolonun uygunluğuna karar verilmiştir. C₈ kolon olarak, Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,60 mm ID; 5 µ) seçilmiştir. Bu tip kolonlar içinde C yüklemesi en fazla olan yeni jenerasyon kolonlarından bu kolon tercih edilmiştir. Asetonitril derisiminin belirlenmesi için öndenemeler yapılmıştır. %20 asetonitril derisiminde tetrasiklinler kolondan yeterince alınamamıştır. %30 asetonitril derisiminde ise tetrasiklinler birlikte elue olmuşlardır. Bu nedenle %25 asetonitril derisimi seçilmiştir.

ve OTC, TC, MC, DC ve CTC'in alikonma zamanlari üzerinde pH etkisi, bu derisim için incelenerek, ayirma için optimum kosul belirlenmeye çalışilmiştir.

Asagida, pH 2,500; 2,750; 3,000; 3,500; 3,750; 4,000; 4,250; 4,500 degerleri için, tetrasiklinlerin alikonma zamanlari, kapasite faktörleri ve α degerleri, çizelge 5.4, çizelge 5.5, çizelge 5.6, çizelge 5.7, çizelge 5.8, çizelge 5.9, çizelge 5.10, çizelge 5.11'de gösterilmistir. Ayrica yine ayni degerler, pH 2,5'da, %23 asetonitril derisimi için çizelge 5.12'de, pH 2,5'da, %24 asetonitril derisimi için çizelge 5.13'de, pH 2,75'de %23 asetonitril derisimi için çizelge 5.14'de ve pH 2,75'de %24 asetonitril derisimi için çizelge 5.15'de gösterilmistir.

Çizelge 5.4 Tetrasiklinlerin pH 2,500 kosulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortaminda alikonma zamanlari ve seçicilik faktörleri

Bilesik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	$t_{r,ort}$	k	α
KBr	6,537	6,563	6,691	6,597	-	-
Oksitetrasiklin	6,910	6,902	6,907	6,906	0,047	-
Tetrasiklin	6,944	6,930	6,926	6,933	0,051	1,087
Klortetrasiklin	10,471	10,449	10,404	10,441	0,583	11,430
Metasiklin	11,634	11,604	11,591	11,610	0,760	1,304
Doksisiklin	12,773	12,773	12,776	12,774	0,936	1,232

Çizelge 5.4'de, üzerinde çalışilan bilesikler, elüsyon sirasina göre verilmiştir. TC/OTC için α seçicilik faktörünün, 1,15 degerinden küçük olması, bu kosulda OTC ve TC ayiriminin yeterli olmadigini ifade etmektedir. Sekil 4.22 ve Sekil 4.23'de görüldüğü gibi pH 2,500'da OTC ve TC birlikte elue olmaktadır.

Çizelge 5.5 Tetrasiklinler için $pH=2,750 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanlari ve seçicilik faktörleri

Bilesik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	$t_{r,ort}$	k	α
KBr	6,268	6,278	6,279	6,275	-	-
Oksitetrasiklin	6,952	6,942	6,965	6,953	0,108	-
Tetrasiklin	7,035	7,015	7,049	7,033	0,121	1,118
Klortetrasiklin	11,573	11,57	11,65	11,598	0,848	7,022
Metasiklin	12,943	12,938	12,995	12,959	1,065	1,256
Doksisiklin	14,336	14,31	14,342	14,329	1,284	1,205

Çizelge 5.5’de, üzerinde çalışılan bilesikler, elüsyon sirasina göre verilmiştir. Elüsyon sirasi bir önceki pH kosulu ile aynidir. TC/OTC için α seçicilik faktörünün, 1,15 degerinden küçük olması, bu kosulda OTC ve TC ayiriminin yeterli olmadigini ifade etmektedir.

Çizelge 5.6 Tetrasiklinler için $pH 3,000 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanlari ve seçicilik faktörleri

Bilesik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	$t_{r,ort}$	k	α
KBr	5,572	5,566	5,567	5,568	-	-
Oksitetrasiklin	7,001	7,011	7,003	7,005	0,258	-
Tetrasiklin	8,014	7,981	7,990	7,995	0,436	1,690
Klortetrasiklin	13,729	13,733	13,734	13,732	1,466	3,362
Metasiklin	14,716	14,722	14,728	14,722	1,642	1,120
Doksisiklin	16,309	16,316	16,318	16,314	1,928	1,174

Çizelge 5.6’da, üzerinde çalışılan bilesikler, elüsyon sirasina göre verilmiştir. Kromatogramdan ve verilerden, ayirmanin gerçekleştiği anlaşılmıştır. Ancak, CTC, MC ve DC’in bulunduğu bölgede, temel çizgi yukari kaydigi için bu pH kosulu kantitatif çalışma için tercih edilmemistir.

Çizelge 5.7’de, üzerinde çalışılan bileşikler, elüsyon sırasına göre verilmiştir. Ayırmanın sağlandığı, kromatogramdan ve verilerden anlaşılmaktadır. Ancak, CTC, MC ve DC’in bulunduğu bölgede, temel çizgi yukarı kaymıştır. Bu nedenle kantitatif çalışma için bu pH koşulu uygun bulunmamıştır.

Çizelge 5.7 Tetrasiklinler için pH $3,500 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alıkonma zamanları ve seçicilik faktörleri

Bileşik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	t_{rot}	k	α
KBr	5,375	5,369	5,456	5,400	-	-
Oksitetrasiklin	7,231	7,239	7,295	7,255	0,344	-
Tetrasiklin	8,292	8,315	8,872	8,493	0,573	1,666
Klortetrasiklin	14,352	14,369	14,667	14,463	1,678	2,928
Metasiklin	14,761	14,751	15,065	14,859	1,752	1,044
Doksisiklin	16,294	16,329	16,368	16,330	2,024	1,156

Çizelge 5.8’de, üzerinde çalışılan bileşikler, elüsyon sırasına göre verilmiştir. Şekil 4.31 ve Şekil 4.32’de görüldüğü gibi ayırma yeterli değildir. CTC ve MC birlikte elue olmuştur.

Çizelge 5.8 Tetrasiklinler için pH $3,750 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alıkonma zamanları ve seçicilik faktörleri

Bileşik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	t_{rot}	k	α
KBr	5,263	5,261	5,269	5,264	-	-
Oksitetrasiklin	7,497	7,484	7,541	7,507	0,426	-
Tetrasiklin	8,636	8,636	8,701	8,658	0,645	1,514
Metasiklin	14,919	14,919	14,995	14,944	1,839	2,851
Klortetrasiklin	15,103	15,124	15,251	15,159	1,879	1,022
Doksisiklin	16,458	16,493	16,507	16,486	2,132	1,135

Çizelge 5.9’de, üzerinde çalışılan bileşikler, elüsyon sırasına göre verilmiştir. Önceki pH değerlerine göre elüsyon sırası değişmiştir. CTC ve MC birlikte elue olmuşlardır. Sekil 4.34 ve Sekil 4.35’de görüldüğü yeterli ayırmaya ulaşılamamıştır.

Çizelge 5.9 Tetrasiklinler için pH $4,000 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri

Bileşik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	t_{rort}	k	α
KBr	5,221	5,224	5,205	5,217	-	-
Oksitetrasiklin	7,436	7,465	7,503	7,468	0,432	-
Tetrasiklin	8,600	8,597	8,646	8,614	0,651	1,509
Metasiklin	14,417	14,433	14,518	14,456	1,771	2,719
Klortetrasiklin	14,904	14,916	15,041	14,954	1,867	1,054
Doksisiklin	15,869	15,901	15,926	15,899	2,048	1,097

Çizelge 5.10’de, üzerinde çalışılan bileşikler, elüsyon sırasına göre verilmiştir. Elüsyon sırası bir önceki koşul ile aynıdır. Sekil 4.37 ve Sekil 4.38’de görüldüğü gibi ayırma yeterli değildir. MC ve CTC ikiz pik halinde gelmiştir.

Çizelge 5.10 Tetrasiklinler için pH $4,250 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri

Bileşik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	t_{rort}	K	α
KBr	5,161	5,136	5,131	5,143	-	-
Oksitetrasiklin	7,331	7,340	7,392	7,354	0,430	-
Tetrasiklin	8,355	8,374	8,440	8,390	0,631	1,468
Metasiklin	13,136	13,163	13,252	13,184	1,564	2,476
Klortetrasiklin	14,131	14,133	14,294	14,186	1,758	1,125
Doksisiklin	14,342	14,365	14,382	14,363	1,793	1,020

Çizelge 5.11’de, üzerinde çalışılan bileşikler, elüsyon sırasına göre verilmiştir. Elüsyon sırası önceki iki koşul ile aynıdır. Sekil 4.40 ve Sekil 4.41’de görüldüğü gibi ayırma yeterli değildir.

Çizelge 5.11 Tetrasiklinler için pH $4,500 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %25 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri

Bileşik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	t_{rort}	k	α
KBr	4,841	4,824	4,799	4,821	-	-
Oksitetrasiklin	6,649	6,652	6,663	6,655	0,380	-
Tetrasiklin	6,708	6,700	6,704	6,704	0,390	1,027
Metasiklin	8,367	8,368	8,387	8,374	0,737	1,887
Doksisiklin	8,857	8,860	8,872	8,863	0,838	1,138
Klortetrasiklin	9,012	9,026	9,050	9,029	0,873	1,041

Çizelge 5.11’de, üzerinde çalışılan bileşikler, elüsyon sırasına göre verilmiştir. Elüsyon sırası, önceki üç koşuldan farklıdır, DC, CTC’in önüne geçmiştir. Sekil 4.43 ve Sekil 4.44’de görüldüğü gibi ayırma yeterli değildir.

Çizelge 5.12 Tetrasiklinler için pH $2,500 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %23 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanları ve seçicilik faktörleri

Bileşik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	t_{rort}	k	α
KBr	7,962	7,985	7,906	7,951	-	-
Oksitetrasiklin	7,187	7,175	6,98	7,114	-0,105	
Tetrasiklin	7,226	7,258	7,198	7,227	-0,091	0,865
Metasiklin	11,254	11,11	11,079	11,148	0,402	4,417
Doksisiklin	12,849	12,879	12,879	12,869	0,619	1,538
Klortetrasiklin	14,372	14,3	14,454	14,375	0,808	1,306

Çizelge 5.13 Tetrasiklinler için pH $2,500 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %24 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanlari ve seçicilik faktörleri

Bilesik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	t_{rott}	k	α
KBr	6,012	6,020	6,108	6,017	-	-
Oksitetrasiklin	6,926	6,915	6,878	6,906	0,148	-
Tetrasiklin	7,916	7,912	7,887	7,905	0,314	2,123
Metasiklin	14,117	14,109	14,089	14,105	1,344	4,283
Doksisiklin	15,715	15,694	15,688	15,699	1,609	1,197
Klortetrasiklin	17,491	17,471	18,219	17,727	1,946	1,210

Çizelge 5.14 Tetrasiklinler için pH $2,750 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %23 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanlari ve seçicilik faktörleri

Bilesik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	t_{rott}	k	α
KBr	6,668	6,681	6,656	6,668	-	-
Oksitetrasiklin	6,985	6,979	6,964	6,976	0,046	-
Tetrasiklin	7,66	7,668	7,692	7,673	0,151	3,267
Metasiklin	13,606	13,626	13,701	13,644	1,046	6,941
Doksisiklin	15,466	15,486	15,547	15,500	1,324	1,266
Klortetrasiklin	17,255	17,28	17,327	17,287	1,592	1,202

Çizelge 5.15 Tetrasiklinler için pH $2,750 \pm 0,005$ koşulunda, 25 mM fosforik asit içeren %24 (v/v) asetonitril-su ortamında alikonma zamanlari ve seçicilik faktörleri

Bilesik ismi	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	t_{rott}	k	α
KBr	6,569	6,607	6,717	6,631	-	-
Tetrasiklin	7,692	7,429	7,563	7,561	0,140	-
Oksitetrasiklin	7,966	7,564	7,425	7,652	0,154	1,100
Metasiklin	13,059	13,149	12,969	13,059	0,969	6,909
Doksisiklin	14,6	14,251	14,251	14,367	1,167	1,204
Klortetrasiklin	16,412	16,168	16,372	16,317	1,461	1,252

pH 2,75’de, %23 asetonitril derisiminde alfa degerleri incelendiginde, bu kosulun ayirma için uygun oldugu görülmektedir. Elüsyon sirasi oksitetrasiklin, tetrasiklin, metasiklin, doksisiklin, klortetrasiklin seklindedir. pH 2,75’de, %24 asetonitril derisiminde alfa degerleri incelendiginde, bu kosulunun da ayirma için yeterli oldugu görülmektedir. Ancak elüsyon sirasi incelendiginde, tetrasiklinin oksitetrasiklinden daha önce elue oldugu görülmektedir.

pH 2,50’de, %23 asetonitril derisiminde alfa degerleri incelendiginde, bu kosulun ilk iki bilesigin ayrilmasi için uygun olmadigi görülmektedir. Elüsyon sirasi oksitetrasiklin, tetrasiklin, metasiklin, doksisiklin, klortetrasiklin seklindedir. Ayrica ilk iki bilesigin kapasite faktörleri negatiftir. pH 2,50’de, %24 asetonitril derisiminde alfa degerleri incelendiginde, bu kosulun ayirma için yeterli oldugu görülmektedir. Elüsyon sirasi incelendiginde, %23 asetonitrildeki ile aynidir.

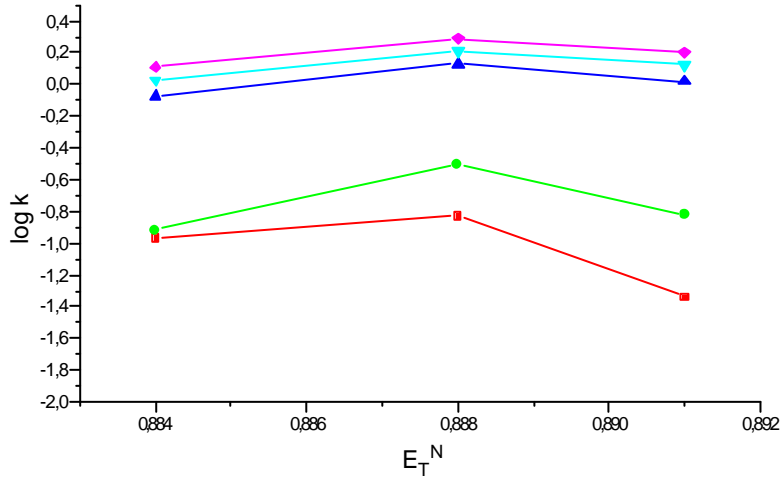
Bu çalismada çizelgelerden görüldüğü gibi 3 farkli asetonitril derisiminde, ayirmada optimum olacagi düşünölen iki farkli pH degerinde çalisilmistir. Her bir asetonitril derisimdeki polarite parametresi ile log k degerleri, her iki pH degeri için çizelge 5.16 ve çizelge 5.17’de verilmistir. Aralarindaki iliskiler ise her iki pH degeri için sekil 5.1’de ve sekil 5.2’de verilmistir.

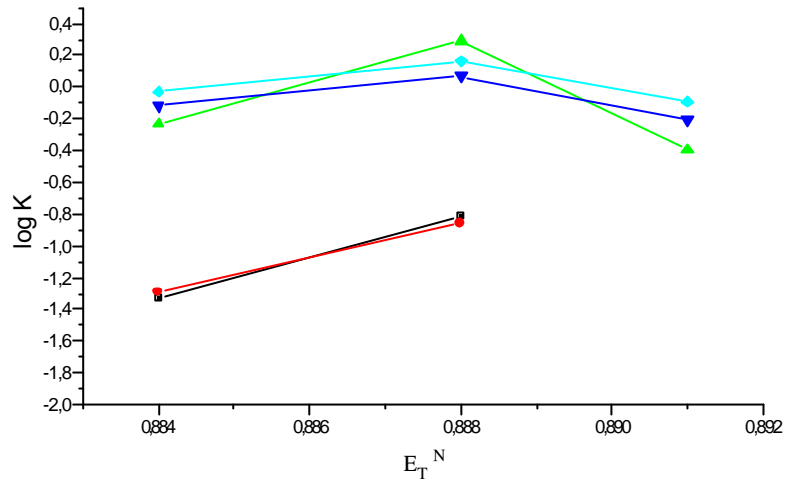
Çizelge 5.16 pH 2,50'de tetrasiklinlerin k ve log k degerleri

Tetrasiklin	OTC	TC	CTC	MC	DC
E_T^N	k				
0,891	-0,105	-0,091	0,402	0,619	0,808
0,888	0,154	0,14	1,969	1,167	1,461
0,884	0,047	0,051	0,583	0,76	0,936
E_T^N	log k				
0,891	--	--	-0,3958	-0,2083	-0,0926
0,888	-0,8125	-0,8539	0,2942	0,0671	0,1647
0,884	-1,3279	-1,2924	-0,2343	-0,1192	-0,0287

Çizelge 5.17 pH 2,75'de tetrasiklinlerin k ve log k degerleri

Tetrasiklin	OTC	TC	CTC	MC	DC
E_T^N	k				
0,891	0,046	0,151	1,046	1,324	1,592
0,888	0,148	0,314	1,344	1,609	1,946
0,884	0,108	0,121	0,848	1,065	1,248
E_T^N	log k				
0,891	-1,3372	-0,821	0,0195	0,1219	0,2019
0,888	-0,8297	-0,5031	0,1284	0,2066	0,2891
0,884	-0,9666	-0,9172	-0,0716	0,0273	0,1086

**Sekil 5.1** pH 2,75'de polarite parametresi ile log k degerleri arasindaki iliski



Sekil 5.2 pH 2,50'de polarite parametresi ile log k degerleri arasindaki iliski

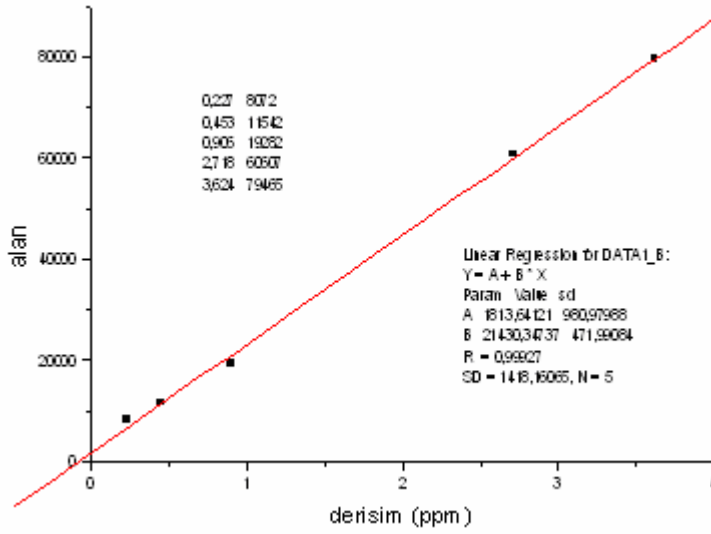
5.1 Sütte Doksisisiklinin Tayini

HPLC yöntemi ile sütte doksisisiklinin tayininde mobil faz olarak 25 mM fosforik asit içeren asetonitril-su ortamı, %24 (v/v) kullanılmıştır. $\lambda=271$ nm. ve akış hızı 0,8 mL/dakikadır. pH taraması çalışmaları sonucunda, doksisisiklinin kantitasyonunun yapılabilmesi için mobil faz pH'sinin, $2,750 \pm 0,005$ olduğu koşulun en uygun koşul olduğu belirlenmiştir. Çalışma grafiği için 0,227-0,453-0,906-2,718-3,624 ppm derisimlerinde standart çözeltiler hazırlanmış ve sıvı kromatografi cihazına 20 μ L miktarında enjekte edilmiştir. Bu standart çözeltilere ait piklerden hesaplanan alanlar, çizelge 5.18'de verilmiştir.

Çizelge 5.18 Dis kalibrasyon verileri

Standart doksisisiklin derisimi (ppm)	Alan
0,227	8072
0,453	11542
0,906	19282
2,718	60607
3,624	79465

Bu veriler ile çizilen dis kalibrasyon grafiği şekil 5.3'de verilmiştir.



Sekil 5.3 Doksisisiklin için dis kalibrasyon grafiği

Bu grafiğe ait doğru denklemi $y = (1813 \pm 980) + (21430 \pm 471)x$ şeklindedir.

$R=0,999$ $SD=1418$ $N=5$

Bu durumda grafiğe özgü hesaplamalar dikkate alındığında;

metodun standart sapması (s_{x_0}), $s_{x_0} = \frac{SD}{Eğim}$

varyasyon katsayısı (CV), $CV = \frac{s_{x_0}}{x} \times 100$

olduğundan, metodun standart sapması 0,066 ve varyasyon katsayısı 4,16 olarak bulunur. Bu yöntemde doksisisiklin için dedeksiyon limiti 0,1 ppm'dir.

Bu çalışmada geri kazanmanın belirlenmesi için, süt numunesi hazırlanırken süt numunesine 0,906 ve 0,453 ppm olacak şekilde doksisisiklin katkıları yapılmış ve elde edilen veriler dis kalibrasyon grafiğinde kullanılarak, geri kazanmanın %72 civarında olduğu belirlenmiştir. Literatürlerde de tetrasiklinlerin proteinlere bağlandığı ve geri kazanmanın düşük olduğu belirtilmektedir (Boatto vd., 1999; Schenk vd., 1998).

Sonuç olarak sunları söyleyebiliriz. Bilindiği gibi sıvı kromatografide iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılmalarında optimum pH koşulu $pK_a \pm 1,5$ aralığında pH etkisi incelenerek belirlenir. Bu çalışmada öncelikle uygun mobil faz ve kolon sistemi

belirlenmiş ve takiben bu mobil faz farklı pH değerlerine ayarlanarak pH etkisi incelenmiştir. Sıvı kromatografide mobil fazın tamamına ait pH değerlerinin belirlenmesi IUPAC kuralına uygun şekilde yapılır. Bu çalışmada da asetonyitril-su ikili karışımına ait pH standardizasyonuna uygun şekilde mobil faz pH'si ayarlanmış ve her bir koşulda kapasite faktörleri, seçicilik faktörleri hesaplanmıştır. Çalışmada asetonyitril derişimi %25 olduğunda pH 2,50 ve 2,75'in ayırma için uygun olduğu düşünülmüş ve bu iki pH değerinde asetonyitril derişimi %23 ve %24 yapılarak polaritenin ayırmadaki etkisi üzerinde durulmuştur. Tetrasiklinlerin birbirinden ayırımı ve doksisiklinin tayini için en uygun mobil fazın 25 mM orto fosforik asit içeren %24 (v/v) ACN olduğu, pH $2,750 \pm 0,005$ 'de OTC, CTC, TC, MC ve DC'in birbirinden ayrılmasının yeterli olduğu belirlenmiştir. Bu koşulda doksisiklinin kantitatif tayini için dış kalibrasyon grafiğı hazırlanmıştır. Burdur yöresinden alınan süt numunesinde ve bazı paket süt numunelerinde doksisiklin tayini çalışması yapılmış, fakat bu numunelerde doksisiklin varlığı saptanmamıştır.

6 KAYNAKLAR

- Axisa, B., Naylor, A.R., Bell, P.R.F., Thompson, M.M. 2000. Simple and reliable method of doxycycline determination in human plasma and biological tissues, *J.Chromatogr.B.*, 744, 359-365.
- Barbosa, J., Nebot, V.S. 1992. pH measurement in acetonitrile-water mixtures by use of a glass electrode, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 10,1047-1051.
- Barbosa, J., Buti, S., Sanz-Nebot, V. 1994. Standard pH values for standardization of potentiometric sensors in %10 acetonitril-water mixtures, *Talanta*, 41(5),825-831.
- Björklund, H. 1988. Determination of oxytetracycline in fish by high-performance liquid chromatography, *J.Chromatogr.B.*, 432, 381-387.
- Blanchflower, W.J., McCracken, R.J., Haggan, A.S., Kennedy, D.G. 1997. Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry, *J.Chromatogr.B.*, 692, 351-360.
- Boatto, G., Pau, A., Palomba, M., Arenare, L., Cerri, R., 1999. Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20, 321-326.
- Bovanová, L., Brandšteterová, E. 2000. Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography, *J.Chromatogr.A.*, 880, 149-168.
- Carson, M.C., Ngoh, M.A., Hadley, S.W. 1998. Confirmation of multiple tetracycline residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid

chromatography-particle beam mass spectrometry, *J.Chromatogr. B.*, 712, 113-128.

Cherlet, M., Schelkens, M., Croubels, S., De Backer, P. 2003. Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry, *Anal.Chim.Acta.*, Baskida.

Choma, I., Grenda, D., Malinowska, I., Zdzislaw Suprynowicz, Z. 1999. Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method, *J. Chromatogr. B.*, 734, 7-14.

Cinquina, A.L., Longo, F., Anastasi, G., Gianetti, L., Cozzani, R., 2003. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle, *J.Chromatogr. A.*, 987, 227-233.

DiCorcia, A., Nazari, M. 2002. Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products, *J.Chromatogr. A.*, 974, 53-89.

Furusawa, N., 1999. Rapid liquid chromatographic determination of oxytetracycline in milk, *J.Chromatogr.A.*, 839, 247-251.

Furusawa, N., 2003. Isolation of tetracycline in milk using a solid-phase extracting column and water eluent, *Talanta*, 59, 155-159.

Gündüz, T., 2002. *Instrümental Analiz. Gazi Kitabevi*, 1357s. Ankara.

Hallworth, M., 1993. *Therapeutic Drug Monitoring and clinical Biochemistry. Association of Clinical Biochemist*, 178s. London.

- Hernandez, M., Borrull, F., Calull, M., 2003. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis, *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 416-438.
- Hosny, W.M., El-Medani, S.M., Shoukry, M.M 1999. Equilibrium studies of the binary and ternary complexes involving tetracycline and amino acid or DNA constituents, *Talanta*, 48, 913-921.
- Joshi, S. 2002. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 795-809.
- Kazemifard, A.G., Moore, D.E. 1997. Evaluation of amperometric detection for the liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics and their common contaminants in pharmaceutical formulations, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16, 689-696.
- Kühne, M., Wegmann, S., Kobe, A. R.Fries. 2000. Tetracycline residues in bones of slaughtered, *Food Cont.*, 11, 175-180.
- Levie, R., 1997. *Principles of Quantitative Chemical Analysis*. The McGraw-Hill Companies, Inc., 737s. Singapore.
- Pilorz, K., Choma, I. 2004. Isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of tetracyclines and flumequine controlled by a chaotropic effect, *J.Chromatogr. A.*, Baskida.
- Poole, C.F., Poole, S.K. 1997. *Chromatography Today*. Elsevier Science B.V., 1026s. Netherlands.

- Posyniak, A., Zmudzki, J., Semeniuk, S., Niedzielska, J., Ellis, R., 1998. Determination of tetracycline residues in animal tissues by liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr.*, 12, 294-299.
- Ruz, N., Zabala, M., Kramer, M.G., Campanero, M.A., Dios-Viéitez, M.C., Blanco-Príeto, M.J. 2004. Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography Application to particulate drug delivery systems., *J.Chromatogr. A.*, Baskida.
- Schenk, F.J., Callery, P.S. 1998. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk, *J. Chromatogr. A.*, 812, 99-109.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Editör: Kiliç, E., Köseoglu, F., 1999. *Analitik Kimya Temelleri. Bilim Yayıncılık*, 870s. Ankara.
- Skúlason, S., Ingólfsson, E., Kristmundsdóttir, T. 2003. Development of a simple HPLC method for separation of doxycycline and its degradation products, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Baskida.
- Vienneau, D.S., Kindberg, C.G. 1997. Development and validation of a sensitive method for tetracycline in gingival crevicular fluid by HPLC using fluorescence detection, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16, 111-117.
- Viñas, P., Balsalobre, N., López-Erroz, C., Hernández-Córdoba, M. 2004. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey, *J.Chromatogr. A.*, 1022, 125-129.
- Yıldız, A., 1993. *Enstrümental Analiz. Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, 480s. Ankara.

ÖZGEÇMİS

Adi Soyadı : Mukadder ERDEM

Doğum Yeri : Beyşehir

Doğum Yılı : 1978

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1992 – 1995 Seydisehir Lisesi

Lisans 1996 – 2000 Süleyman Demirel Üniversitesi- Kimya Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İs Deneyimi:

2000 – ... S.D.Ü. Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Arastırma ve Uygulama Merkezi-Kimyager