

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLORFENİKOL ANTİBİYOTİĞİNİN TAYİNİ İÇİN VOLTAMETRİK
SENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE ANALİTİK UYGULAMALARI**

İMREN TAŞKIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

MALATYA

OCAK 2020

Tezin Başlığı: Florfenikol Antibiyotığının Tayini İçin Voltametrik Sensörlerin
Geliştirilmesi ve Analitik Uygulamaları

Tezi Hazırlayan: İMREN TAŞKIN

Sınav Tarihi: 22.01.2020

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

Sınav Jürisi Üyeleri

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap TİTRETİR DURAN.....

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Ülkü YILMAZ

Malatya Turgut Özal Üniversitesi

Prof.Dr. Kazım TÜRK

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Florfenikol Antibiyotiğinin Tayini İçin Voltametrik Sensörlerin Geliştirilmesi ve Analitik Uygulamaları” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

İmren TAŞKIN

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FLORFENİKOL ANTİBİYOTİĞİNİN TAYİNİ İÇİN VOLTAMETRİK
SENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE ANALİTİK UYGULAMALARI**

İmren TAŞKIN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
66+ix sayfa

2020

Danışman: Doç. Dr. Serap TİTRETİR DURAN
Eş Danışman: Arş. Grv. Dr. Öznur GÜNGÖR

Bu çalışmada, sentetik ve uzun etkili bir antibakteriyel ilaç olan florfenikol miktarlarının tespiti için hassas bir voltametrik sensör geliştirilmiştir. Elektrot modifikasyonları çeşitli monomerler kullanılarak, çevrimli voltametri (CV) metodu ile yapılmıştır. 3-metil tiyofen (3-MTF) ile modifiye edilmiş elektrodun florfenikol voltametrik yanıtları, diğer polimer elektrotlarından daha yüksek çıkmıştır. Daha sonra, florfenikolün 3-MTF ile modifiye camı karbon elektrodundaki (GCE) elektrokimyasal davranışı, çevrimli voltametri ve diferansiyel puls voltametri (DPV) metodu ile araştırılmıştır. 3-MTF ile modifiye edilmiş GCE'un florfenikole duyarlı sensör özelliğini belirlemek için; elektrolit tipi ve elektrolit pH, tarama hızı, film kalınlığı, puls genliği ve puls genişliği gibi parametreler optimize edilmiştir. Modifiye edilmiş elektrotun florfenikol yanıtları, modifiye edilmemiş GCE yanıtları ile karşılaştırıldığında, modifiye edilmiş elektrot ile florfenikol yanıtlarındaki seçicilik, duyarlılık ve kararlılığın önemli ölçüde arttığı görülmüştür.

Florfenikol tayini için 0.1 ile 1.0 mM konsantrasyon aralığında doğrusal bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Doğrusal kalibrasyon eğrisinden korelasyon katsayısı, R^2 , 0.999, tayin sınırı, LOD, ve kantitasyon sınırı, LOQ, sırasıyla 0.0399 mM ve 0.1197 mM olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca, florfenikol tayini için geliştirilen voltametrik sensörün analitik uygulaması kırmızı ve beyaz et numunelerinde gerçekleştirilmiştir. 3-MTF ile modifiye edilmiş GC elektrodu kullanılarak kırmızı ve beyaz et numuneleri için geri kazanım verimi, % 90.07-% 111.92 aralığında elde edilmiştir.

Sonuç olarak; florfenikole duyarlı ve seçici, hızlı, basit, düşük maliyetli, % 99.2 tekrarlanabilir, kararlı bir yöntem geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çevrimli voltametri, Diferansiyel puls voltametri, Florfenikol, Sensör, Polimer

ABSTRACT
MASTER THESIS

**DEVELOPMENT AND ANALYTICAL APPLICATIONS OF VOLTAMETRIC
SENSORS FOR DETERMINATION OF FLORPHENICOL ANTIBIOTICS**

İmren TAŞKIN

İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
66+ix pages

2020

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Instructor Serap TİTRETİR DURAN
Cosupervisor: Res. Asst. Dr. Öznur GÜNGÖR

In this study, a sensitive voltammetric sensor was developed for the detection of florphenicol, a synthetic and long-acting antibacterial drug. Electrode modifications were made by cyclic voltammetry (CV) method using various monomers. Florphenicol voltammetric responses of 3-methyl thiophene (3-MTF) modified electrode were higher than those of other polymers electrodes. Then, The electrochemical behavior of florphenicol on 3-MTF modified glassy carbon electrode (GCE) was investigated by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry (DPV) method. In order to determine the florphenicol-sensitive sensor property of 3-MTF modified GCE; parameters such as electrolyte type and electrolyte pH, scan rate, film thickness, pulse amplitude, and pulse width have been optimized. When the florphenicol responses of the modified electrode were compared to the unmodified GCE responses, it was found that the selectivity, sensitivity and stability of the modified electrode and florphenicol responses were significantly increased. A linear calibration plot was obtained for florphenicol in the concentration range of 0.1 to 1.0 mM. The correlation coefficient from the linear calibration curve, R^2 , 0.999, determination limit, LOD, and quantitation limit, LOQ were calculated as 0.0399 mM and 0.1197 mM, respectively.

In addition, analytical application of the voltammetric sensor developed for the determination of florphenicol was carried out in red and white meat samples. The recovery efficiency for red and white meat samples was obtained from 90.07% to 111.92% by using 3-MTF modified GC electrode. A method was developed for the florphenicol which is fast, simple, low-cost, 99.2% reproducible, stable, sensitive and selective.

Keywords: Cyclic voltammetry, Differential pulse voltammetry, Florphenicol, Sensor, Polymer

TEŞEKKÜR

Bu konuyu yüksek lisans tezi olarak öneren ve çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Serap TİTRETİR DURAN’a

İki yıl süre ile eş danışmanlığımı üstlenen ve bu süre içerisinde her konuda yardımcı olan Sayın Arş. Grv. Dr. Öznur GÜNGÖR’e

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında bazı kimyasalların temininde ve analizinde yardımcı olan İmren ÖZCAN ve Selda SEZER arkadaşlarıma, çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans yapan değerli büyüğüm Muammer BURÇ’a, Funda ALIŞIK’a

Tez çalışmalarımın yoğun olduğu dönemde her türlü desteği ile yanımda olan AİLEM’e

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde 2018/ 1427 No’lu proje ile tüm maddi imkânları sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine

Teşekkür ederim.

İmren TAŞKIN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1 GİRİŞ	1
2 KURAMSAL TEMELLER	3
2.1 Antibiyotikler	3
2.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	3
2.2.1 Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması	3
2.2.1.1 Bakteriyostatikler	3
2.2.1.2 Bakteriasidler	4
2.3 Antibiyotiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması	4
2.3.1 Fenikoller (Amfenikoller)	5
2.3.1.1 Spektrumları	5
2.3.1.2 Farmakokinetik özellikleri	5
2.3.1.3 Türevleri	5
a) Kloramfenikol	5
b) Tiamfenikol	6
c) Florfenikol	6
2.4 Antibiyotiklerin Hayvanlarda Kullanımı	8
2.5 İnsan Sağlığı Üzerine Antibiyotik Kalıntılarının Etkileri	9
2.6 Literatür Özeti	9
2.7 Voltametri	13
2.7.1 Dönüşümlü voltametri (CV)	14
2.7.2 Diferansiyel puls voltametrisi (DPV)	16
2.8 Elektrokimyasal Hücreler ve Elektrotlar	16
2.8.1 Referans elektrot	17
2.8.2 Karşıt elektrot	18
2.8.3 Çalışma elektrodu	19
2.9 Çözücü ve Destek Elektrolitler	21
2.10 Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Sensörler	24
2.11 3-Metil Tiyofenin Elektropolimerizasyonu	25
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1 Kimyasal Maddeler	26
3.2 Ölçümde Kullanılan Aygıt ve Gereçler	26
3.3 Elektrotlar	28
3.3.1 Elektrotların temizliği	29
3.4 Deneysel Prosedürler	29
3.4.1 Kullanılan Çözeltilerin hazırlanması	29
3.4.1.1 Florfenikol analiti çözeltisinin hazırlanması	29
3.4.2 Florfenikolün Saflaştırılması	29
3.4.3 Elektrotların Modifikasyonu	31
3.4.3.1 3- Metil Tiyofen (3-MTF)	31
3.4.3.2 İndolin	31

3.4.3.3 p-amino benzoik asit (PABA)	31
3.4.3.4 o-amino benzoik asit (OABA)	31
3.4.3.5 para tolueen sülfonik Asit	31
3.4.3.6 4-vinil piridin (4-VP)	32
3.4.3.7 4-hidroksi benzoaldehit (4-HBA)	32
3.4.4 3-MTF'nin Yükseltgenme Potansiyelinin Tespiti	32
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	33
4.1 Florfenikol Tayini İçin Optimizasyonlar	33
4.1.1 Florfenikolün indirgenme potansiyelinin belirlenmesi	33
4.1.2 Florfenikol için çözgen türünün belirlenmesi	33
4.1.3 Monomer seçimi	33
4.1.3.1 PABA (p-Amino Benzoik Asit)	34
4.1.3.2 4-HBA (4-Hidroksi Benzoaldehit)	34
4.1.3.3 3-MTF (3-Metil Tiyofen)	35
4.1.3.4 4-VP (4-Vinil Piridin)	36
4.1.3.5 İndolin	37
4.1.3.6 OABA (o-Amino Benzoik Asit)	38
4.1.3.7 para tolueen sülfonik asit	39
4.2 Polimer Oluşumu Parametreleri	40
4.2.1 Florfenikol tayininde kullanılacak elektrolit seçimi	40
4.2.2 Monomer derişimi	41
4.2.3 Polimer Kalınlığı	42
4.2.4 Polimer Tarama Hızı	43
4.2.5 Elektrokatalitik Aktivite	45
4.3 FF Analiz Parametrelerinin Optimizasyonu	46
4.3.1 Elektrolit pH Etkisi	46
4.3.2 Tarama Hızı Etkisi	47
4.4 FF Tayini için Kalibrasyon Eğrileri ve Tayin Sınırı	49
4.5 Tekrarlanabilirlik	50
4.6 Gerçek Örnek Çalışması	51
4.7 Diğer Florfenikol Sensör Çalışmaları	56
4.7.1 Laktoz, Sukroz Ve GUM Karbonhidrat Temelli Poliüretan Yapılarının Hazırlanışı	56
4.7.2 Poliüretan Temelli Modifiye Elektrotlarla Elektrokimyasal Çalışmalar	57
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	58
6. KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB:	Avrupa Birliği
AC:	Alternatif akım
AcN:	Asetonitril
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
CAF:	Kloram fenikol
CV:	Dönüşümlü voltametri
DMF:	Dimetil formamit
NNDMF:	N, N-dimetil formamit
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DPV:	Diferansiyel puls voltametrisi
Ep:	Pik potansiyeli
Ep_a:	Anodik pik potansiyeli
Ep_c:	Katodik pik potansiyeli
FAO:	Gıda ve Tarım Örgütü
FF:	Flor fenikol
FT-IR:	Fourier transform kızılötesi spektroskopisi
GCE:	Camsı karbon elektrot
HBA:	Hidroksibenzaldehit
HPLC:	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
I:	Akım
Ip:	Pik akımı
Ip_a:	Anodik pik akımı
Ip_c:	Katodik pik akımı
J:	Akım yoğunluğu
KNO₃:	Potasyum nitrat
LiCl:	Lityum klorür
LOD:	Tayin sınırı
LOQ:	Kantitasyon sınırı
MBK:	Minimum Bakterisid Konsantrasyon
MiK:	Minimum inhibitör Konsantrasyon
MTF:	Metil tiyofen
n:	Ölçüm sayısı
NaCl:	Sodyum klorür
OABA:	<i>o</i> -amino benzoikasit
PABA:	<i>p</i> -amino benzoikasit
PBS	Fosfat tamponu
R²:	Regrasyon katsayısı
RSD:	Bağıl standart sapma
S:	Standart sapma
SAS:	Sodyum Asetat
SOS:	Sodyum Sülfat
TAF:	Tiam fenikol
TBATFB:	Tetra bütül amonyum tetra floro borat
TLN:	Toluen benzoikasit
Tris:	Tris tamponu
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1:	Kloramfenikol moleküler gösterimi.	5
Şekil 2.2:	Tiamfenikol moleküler gösterimi.	6
Şekil 2.3:	Kloramfenikol, Florfenikol ve Tiamfenikol moleküler gösterimi.	7
Şekil 2.4:	CV için potansiyel-zaman değişimi.	14
Şekil 2.5:	CV metodu ile tersinir bir elektroaktif maddenin akım-potansiyel değişimi.	15
Şekil 2.6:	Diferansiyel puls (A) sinyal oluşumu, (B) voltamogramı.	16
Şekil 2.7:	Elektrokimyasal hücre ve bileşenleri.	17
Şekil 2.8:	Referans elektrotlar (a) Ag/AgCl, (b) DKE, (c) SHE.	18
Şekil 2.9:	Karşıt elektrot çeşitleri.	18
Şekil 2.10:	Voltametriye kullanılan çalışma elektrotları.	19
Şekil 2.11:	3-MTF'in elektropolimerizasyon mekanizması.	25
Şekil 3.1:	BAS 100B elektrokimyasal analizör.	26
Şekil 3.2:	Yardımcı elektrot, çalışma elektrodu ve referans elektrottan oluşan voltametrik hücre.	27
Şekil 3.3:	Thermo Scientific STAR A-111 pH-metre.	27
Şekil 3.4:	Nüve marka EN 400 Model etüv, Branson marka 3510 model ultrasonik banyo.	28
Şekil 3.5:	Kern marka ABJ-NM/ABS-N model terazi.	28
Şekil 3.6:	A) Saflaştırılmamış, B) saflaştırılmış FF'ün FT-IR spektrumu.	30
Şekil 4.1:	PABA modifiye GCE üzerinde (A) AcN (B) DMF içinde çözünürleştirilmiş farklı derişimlerdeki FF'ün (a: 1.183 mM b: 0.875 mM c: 0.491 mM ve d: PBS) DPV'si.	33
Şekil 4.2:	A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik PABA CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.	34
Şekil 4.3:	A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik 4-HBA CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.	35
Şekil 4.4:	A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik 3-MTF CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.	36
Şekil 4.5:	A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik 4-VP CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.	37
Şekil 4.6:	A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik İndolin CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.	38
Şekil 4.7:	A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik OABA CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.	39
Şekil 4.8:	A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik paratoluen sülfonik asit CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.	40
Şekil 4.9:	150, 175, 200, 225 ve 250 mM 3-MTF modifiye GCE üzerinde 0.1 M Na ₂ SO ₄ içinde 0.491 mM FF'ün DPV voltamogramları.	41
Şekil 4.10:	3-MTF derişimi-İ _p ilişkisi.	42

Şekil 4.11:	Na ₂ SO ₄ elektroliti içinde 3- MTF modifiye GCE üzerinde 2, 4, 6, 8 ve 10 segmentlik 0.491 mM FF'ün DPV voltamogramları.	43
Şekil 4.12:	3-MTF film kalınlığı-İ _p ilişkisi.	43
Şekil 4.13:	Na ₂ SO ₄ elektroliti içinde 3- MTF modifiye GCE üzerinde 100, 120, 140, 160, 180, 200 ve 220 mV/s tarama hızlarında 0.491 mM FF'ün DPV voltamogramları.	44
Şekil 4.14:	Polimer oluşum tarama hızı-İ _p ilişkisi.	45
Şekil 4.15:	6 mM K ₃ [Fe(CN) ₆]'ün 1 M KNO ₃ içindeki a) Çıplak GCE, b) Modifiye GCE c) Çıplak ve Modifiye GCE'nin üst üste dönüşümlü voltamogramları.	46
Şekil 4.16:	Na ₂ SO ₄ elektroliti pH-İ _p ilişkisi.	47
Şekil 4.17:	Na ₂ SO ₄ (pH 4.50) elektroliti içinde 3- MTF modifiye GCE üzerinde 20, 40, 60, 80, 100 mV/s tarama hızlarında 0.491 mM FF'ün DPV voltamogramı.	48
Şekil 4.18:	0.491 mM FF'ün 3-MTF modifiye GCE üzerinde DPV tarama hızı-İ _p ilişkisi.	49
Şekil 4.19:	3-MTF modifiye GCE üzerinde 0.1 M Na ₂ SO ₄ elektroliti içinde a:0.1, b: 0.3, c: 0.6, d:0.8 ve e:1.0 mM FF'e ait DPV'ler.	49
Şekil 4.20:	0.1-1.0 mM FF derişimi için elde edilen kalibrasyon grafiğı.	50
Şekil 4.21:	Poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde 0.6 mM FF'ün DPV'leri (n=10).	51
Şekil 4.22:	0.6 mM FF'ün poli 3-MTF GCE üzerindeki voltamogramlarına ait hata grafiğı (n=10).	51
Şekil 4.23:	0.1 M'lık Na ₂ SO ₄ içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde a) Et 1 numunesine ait, b) 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler.	52
Şekil 4.24:	0.1 M'lık Na ₂ SO ₄ içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde a) Et 2 numunesine ait, b) 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler.	53
Şekil 4.25:	0.1 M'lık Na ₂ SO ₄ içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde a) Et 3 numunesine ait, b) 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler.	53
Şekil 4.26:	0.1 M'lık Na ₂ SO ₄ içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde a) Tavuk 1 numunesine ait, b) 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler.	54
Şekil 4.27:	0.1 M'lık Na ₂ SO ₄ içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde a) Tavuk 2 numunesine ait, b) 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler.	55
Şekil 4.28:	0.1 M'lık Na ₂ SO ₄ içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde a) Tavuk 3 numunesine ait, b) 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler.	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1:	Polimer derişimini belirlemek için alınan voltamogramlardan elde edilen I_p değerleri.	41
Çizelge 4.2:	Polimer kalınlığını belirlemek için alınan voltamogramlardan elde edilen I_p değerleri.	42
Çizelge 4.3:	Polimer tarama hızlarına karşılık gelen I_p değerleri.	44
Çizelge 4.4:	Na_2SO_4 elektrolitinin pH'sına karşılık gelen E_p ve I_p değerleri.	47
Çizelge 4.5:	Na_2SO_4 elektrolitinin tarama hızına karşılık gelen E_p ve I_p değerleri.	48
Çizelge 4.6:	Et numunelerine ait ortalama pik akımları ve geri kazanım verimleri.	53
Çizelge 4.7:	Tavuk numunelerine ait ortalama pik akımları ve geri kazanım verimleri	56
Çizelge 4.8:	FF sensör gelişimi için optimize edilen parametreler	58

1. GİRİŞ

Genel olarak mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlara antibiyotik denir. Antibiyotikler tüketilebilen hayvanlarda hastalıkların tedavisi, önlenmesi ve kontrolü ile gelişmenin hızlandırılması, yemden yararlanma etkinliğinin ve verimliliğin artırılması amaçlarıyla kullanılmaktadır. Kullanımdan sonra, hayvanların doku ve organlarında ya da et, süt gibi yenilebilir ürünlerde biriken veya depolanan ilaçlar, metabolitleri, parçalanma ürünleri, serbest veya bağlı haldeki ilaç ya da kimyasal maddelerin hepsi birden kalıntı olarak nitelenir [1-4].

Hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotiklerin kalıntı riski, insan sağlığı açısından ciddi tehlikelere neden olmaktadır. Bu durum, insan tüketimi için vazgeçilmez protein kaynağı olan hayvan kökenli gıdalarda, ilaç kalıntıları riskini oluşturmaktadır [5]. Bu nedenle bu tip ürünleri tüketen insanların sağlığı tehdit altındadır.

Verim artırıcılar grubunda değerlendirilen yem katkı maddeleri iki amaç ile kullanılmaktadırlar. Bunlardan ilki, sindirim sistemi hastalıklarına neden olan patojen mikroorganizmaların üremelerine engel olmak [13], ikincisi ise, hayvanın sindirim sistemi mikroflorasını yararlı mikroorganizmalar lehine çevirerek hayvanın besin maddelerinden daha yüksek düzeyde [14] yararlanmasına olanak sağlamaktır.

Bütün bu özelliklerinden dolayı kalıntı antibiyotiklerin tayini büyük bir önem arz etmektedir. Bu amaçla literatürde antibiyotik tayini amacıyla pekçok yöntem bulunmaktadır. Ancak bu yöntemlerin çoğu yüksek maliyeti, uzun zaman alması, karmaşık işlemlerden oluşması gibi dezavantajlara sahiptir.

Bu tezin amacı; antibiyotiklerin tayininde kullanılan zahmetli, karmaşık ve duyarlılığı düşük tekniklerin yerine kullanılabilecek hızlı, ucuz, zahmetsizce hazırlanabilen ve kısa sürede yanıt alınabilen, mükemmel hassasiyet ve kararlılık sergileyen basit deneysel tasarıma sahip bir voltametrik sensör geliştirilmesidir. Bu amaçla çeşitli monomerlerle dönüşümlü voltametri (CV) yöntemi ile elektropolimerizasyon yapılarak en uygun monomer belirlenmiştir. Belirlenen monomerin elektropolimerizasyonu ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrotlar (GCE) kullanılarak florfenikol antibiyotiğinin tayini için elektrolit tipi ve elektrolit pH'sı, tarama hızı, film kalınlığı, puls genliği ve puls genişliği gibi parametreler diferansiyel puls

voltametrisi (DPV) yöntemi ile incelenerek optimum koşullar belirlenmiştir. Elde edilen yanıtların analit derişimi ile ilişkisi incelendikten sonra ise geliştirilen sensörün analitik değeriendiirilmesi yapılmıştır. Son olarak geliştirilmiş olan sensörün gerçek örneklere uygulanıp uygulanamayacağını, matriks etkisinin herhangi bir pasivizasyon veya girişim etkisi yapıp yapmayacağını, belirlemek amacıyla kırmızı ve beyaz et numunelerinde analitik uygulamaları test edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Antibiyotik

Genel olarak mikroorganizmalardan kaynaklanan yeni hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlara antibiyotik denir [9]. Bu biyoaktif maddeler mantar veya benzeri mikroorganizmalar tarafından biyolojik kaynaklı ya da sentetik olarak elde edilebilir. Hastalıklara karşı bir tedavi etkeni olan antibiyotikler, bakteriyel temelli hastalıkların iyileştirilmesi için kullanılır. Temelde kimyasal madde olan bu ilaçlar, bakterilerin çoğalmasını önlemekte veya onları öldürmektedir. Antibiyotikler ilk kullanılmaya başlanıldığı süreçte direnç sorunu olmadığı için başarıyla kullanılmışlardır. Bulduğumuz süreçte, dünyada her geçen gün artan dirençli patojenler, yeni antimikrobiyallere olan ihtiyacı artırmaktadır. Antibiyotikler dünyada olduğu gibi ülkemizde de en sık kullanılan ilaçlardandır.

2.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler için günümüzde en yaygın bilimsel sınıflandırma aşağıda belirtildiği gibi etki güçlerine ve kimyasal yapılarına göre yapılmaktadır.

2.2.1 Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması

Bütün bakterilerde üç çoğalma devresi vardır. Bunlar; yavaş gelişme, hızlı gelişme ve dinlenme dönemlerinden oluşur. Antibiyotikler bakterilerin hızlı ve yavaş gelişme dönemlerinde etki gösterirler. Bu etkileşim ya bakterisid etki (bakterilerin öldürülmesi) veya bakteriyostatik etki (bakterilerin gelişimi ve üremesinin durdurulması) şeklinde olur [10].

2.2.1.1 Bakteriyostatikler

Bunlar bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önlerler. Gelişmesi ve üremesi duran bakteriler, vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilirler. Bakteriyostatik etki gücünün göstergesi “Minimum inhibitör Konsantrasyon (MiK)”dur.

Bakteriyostatikler; tetrasiklinler, makrolid, sülfonamidler, amfenikoller, linkozamidler, metronidazol ve mikonazol olarak farklı gruplara ayrılırlar.

2.2.1.2 Bakterisidler

Bunlar bakteri hücrelerini dolaysız olarak yok ederler. Bakterisid etki gücünün göstergesi “Minimum Bakterisid Konsantrasyon (MBK)” dur.

Bakterisidler; beta laktamlar (penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler, beta laktamaz inhibitörleri), polipeptidler, florokinolonlar, vankomisin, rifamisin ve teikoplanin’dir.

Antibiyotikler;

1. *Bakteri hücre duvarı sentezini engelleyen*; beta laktamlar (penisilinler, sefalosparinler, monobaktamlar, karbapenemler), siklosein, ristosetin, basitrasin, teikoplanin ve vankomisin,

2. *Sitoplazma membran geçirgenliğini değiştiren*; polimiksinler, gramisidin, nistatin, amfoterisin B, kandisein, ketokonazol ve diğer antifungal imidazoller, flukonazol ve diğer antifungal triazoller ve heksaklorofen,

3. *Ribozamlarda protein sentezini önleyen*; tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolidler, amfenikoller, linkozamidler ve fusidik asit [11].

4. *Ara metabolizmayı bozan*,

5. *Protein sentezini engelleyen* özelliklere sahiptirler [12].

2.3 Antibiyotiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Ribozomlarda protein sentezini bozan antibiyotikler;

1. *Tetrasiklinler*, en az selektif ve en geniş spektrumlu antibiyotiktir.

2. *Aminoglikozidler*, bu gruptaki antibiyotikler çeşitli streptomyces ve micromonospora türü mikroorganizmalardan elde edilen doğal veya yarı-sentetik bileşiklerdir.

3. *Makrolidler*, 12-16 üyeli makrosiklik bir lakton halkasına (aglikon), glikozit bağlarıyla şekerlerin bağlanmasıyla oluşan bir yapı gösterirler.

4. *Linkozamidler*, bir amino şekerle bağlı bir amino asitten oluşan bir amiddir.

5. *Fusidik asit*, protein sentezi inhibitörü antibiyotiktir.

6. *Fenikoller*, olarak sınıflandırılırlar [13].

2.3.1. Fenikoller (Amfenikoller)

Bakterilerde protein sentezini engelleyerek bakterilerin gelişimi ve üremesinin durdurulmasına etki ederler. Florfenikol, kloramfenikol ve tiamfenikol amfenikollerdendir. Spektrumları oldukça geniştir.

2.3.1.1 Spektrumları

- I. Gram(+) koklar
- II. Aerob(+) basiller
- III. Anaerob gram(+) basiller
- IV. Gram(-) bakteriler
- V. Mikoplazmalar
- VI. Spiroketler
- VII. Leptospira

2.3.1.2 Farmakokinetik özellikleri

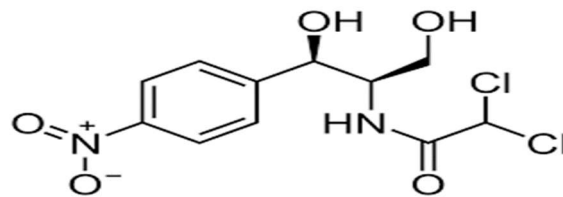
- I. Geniş spektrumlu ve bakteriyostatik etkilidirler.
- II. Beyin, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve göz dâhil vücut dokularına iyi dağılırlar.
- III. Kan-beyin engelini en fazla geçen ilaçtır.
- IV. %100'e yakını emilir.
- V. Karaciğerde glukuronil transferaz enzimi tarafından büyük oranda metabolize edilirler.

2.3.1.3 Türevleri

a) Kloramfenikol

Kloramfenikol (Şekil 2.1), mevcut ilk amfenikoldür. Başlangıçta bir toprak bakteri olan *Streptomyces venezuelae*'den izole edilmiştir, ancak şimdilerde sentetik olarak üretilmektedir.

Gıda olarak tüketime sunulan hayvanlarda kullanımı yasaklanmıştır. Yan etki olarak insanlarda ölüme neden olabilen aplastik anemi, doza bağlı kemik iliği depresyonu ve gri bebek sendromuna neden olur.



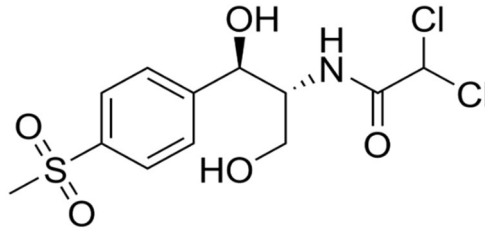
Şekil 2.1: Kloramfenikol moleküler gösterimi.

Aynı etkiye kedi ve köpeklerde de neden olabilmektedir. Hayvanlarda bakterilerden kaynaklanan solunum ve sindirim sistemi enfeksiyonlarında, köpek ile kedilerde gençlik hastalığında, sekonder enfeksiyonların önlenmesinde ve göz hastalıklarının tedavisinde kullanılır.

Kloramfenikol glukuronil transferaz ile karaciğerde inaktive edilerek metabolize edilir. Yeni doğanlarda ve karaciğer yetmezliği olanlarda kullanılmamalıdır.

b) Tiamfenikol

Kloramfenikolün kullanımının aynı olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Kloramfenikolden daha az etkilidir. Kloramfenikolden farklı olarak, Tiamfenikol safra yolu enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılır. Birçok ülkede yaygın olarak balık, domuz, sığır ve kümes hayvanlarında bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Tiamfenikol, içinde nitro bulunan bir kloramfenikol analogudur (Şekil 2.2).



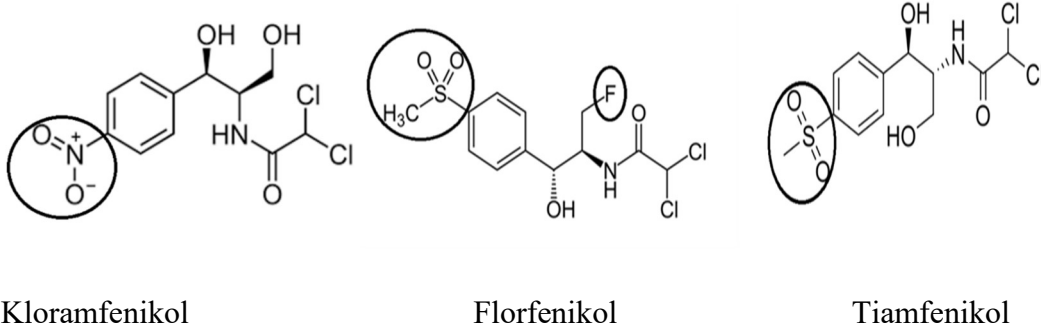
Şekil 2.2: Tiamfenikol moleküler gösterimi.

c) Florfenikol

Sadece veteriner sahada kullanım alanı bulunan, özellikle solunum sistemi enfeksiyonlarında, üriner sistem, meme ve ayak enfeksiyonlarında veteriner hekimlikte kullanılmak üzere özel olarak geliştirilmiş olan florfenikol; tiamfenikol ve kloramfenikolün de içinde bulunduğu amfenikoller sınıfında bulunan, geniş spektrumlu sentetik bir antibakteriyel ilaçtır. Fenikoller grubundan olan FF, kloramfenikol molekülünde nitro grubunun yerine metilsülfonil ($\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-}$) ve hidroksil grubu yerine flor atomunun bağlanmasıyla hazırlanmış [14] beyaz-saman renkli bir tozdur (Şekil 2.3). FF, en az kloramfenikol kadar etkilidir ve istenmeyen etkileri de daha azdır; vücutta genellikle glukuronik asitle birleşme tepkimesine maruz kalmadığından, idrarda daha

ziyade etkin molekül halinde bulunur. Bu yüzden idrar yolları hastalıklarında da kullanılabilir. Moleküle florun geçmesi bakteriyel asetilazlara dirençli kılar; böylece, etkisine karşı daha zor direnç gelişir [15].

Florfenikol, kloramfenikole duyarlı patojenler için de kullanılabildiği gibi kloramfenikole dirençli bakterilere karşı da etkilidir. Ayrıca istenmeyen etkilerinin az olmasıyla da hayvan hastalıklarının tedavisinde geniş bir şekilde kullanılır [16].



Şekil 2.3: Kloramfenikol, Florfenikol ve Tiamfenikol moleküler gösterimi.

Ayrıca tiamfenikolden de hidroksil grubu yerine 3'karbon pozisyonunda flor atomu içermesiyle ayrılır. Bu bağı florfenikolü in vitro ortamda kloramfenikol ve tiamfenikolden daha etkin hale getirir. Tiamfenikol ve kloramfenikole dirençli olsalar bile evcil hayvanlarda infeksiyonlara neden olan bakterilere karşı onlardan daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu bildirilmiştir.

Florfenikol, 3 ile 9 aralığındaki pH seviyelerinde iyonlaşmadan kalır ve ayrıca sulu çözeltilerde zayıfça çözünür. Lipofilik özelliğinden dolayı dokulara iyi dağılım gösterir. Geniş etki spektrumu, terapötik etkinliği, düşük toksisite riski ve gıda değeri olan hayvanlarda solunum ve sindirim sistemi infeksiyonlarının tedavisinde etkinlik sağlaması nedeniyle tartışmasız en önemli veteriner ilaçlarından biri haline gelmiştir.

2.4 Antibiyotiklerin Hayvanlarda Kullanımı

Antibiyotiklerin 1950'lerde besi hayvanlarının yemlerinde kullanılmaya başlanması ile yetiştiricilikte yeni bir dönem başlamıştır. Ancak, viral enfeksiyonlara karşı koruma sağlayan veya gelişmeyi hızlandırıcı olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğu, insan ve hayvanlarda patojen bakteri türleri arasında ortaya çıkan dirençli soyların hızla artması nedeniyle kullanım ömrünü tamamlamak zorunda kalmışlardır [5].

Büyütme faktörü olarak antibiyotiğin kullanımı; Besi hayvanlarının gelişiminin hızlandırılması, yemden yararlanmanın artırılması ve tedavi etme amaçlı kullanılırlar. Bu türden maddelerin etki şekilleri tam bilinmemekle birlikte;

- ✓ Gizli seyreden enfeksiyonların etkenlerini etkileyerek,
- ✓ Gelişme hızını azaltan bakterileri engelleyerek,
- ✓ Besin maddesi sentezleyen bakterilerin gelişimini engelleyerek,
- ✓ Vitamin ve büyütme faktörlerinin sentezini uyarak,
- ✓ Bağırsakların emme yeteneğini artırarak etkili olduğu incelenmiştir [17].

Hayvanlarda kullanılan bu antibiyotikler, bakteri ve mikroplu ortamlarda daha etkilidirler. Hayvanların türüne göre mesela kanatlılarda gelişme hızını %5-25 oranında artırır, yem tüketimini %6 oranında azaltır. Bu etkiler yaşa göre değişiklik göstermektedir.

Yukarıda belirtilmiş olan üreticiye yararları yanında bu antibiyotiklere karşı direnç oluşturarak hastalıklara karşı tedavi başarısını azalttığı için sağaltıcı olarak kullanılanlar, gelişme hızlandırıcı olarak ve uzun süreli kullanılmamalıdır.

Bununla birlikte antibiyotiklerin kalıntı durumu da dikkate alınmalıdır. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi kuruluşlar söz konusu sağlık sakıncalarını en aza indirebilmek için ilaç kullanımından sonra her ilaca özgü olan yasal bekletme sürelerine uyulmasını zorunlu kılmaktadır [18]. Ancak ilacın vücuttan tamamen atılması için gereken bekletme sürelerinin çoğu zaman uzun olması ve bu süre içerisinde kalıntı ihtiva eden et, süt ve yumurta gibi ürünlerin tüketilmeden imha edilmesi, ekonomik yönden yetiştiriciye külfet olmakta ve bu nedenle yasal bekletme sürelerine uyulmasını güçleştirmektedir. Ayrıca birçok ilaç için bu sürelerin bilinmediği gibi bilinenlerin de kalıntı izleme programı için yeterli kontrol ve denetimlerinin yapılmadığı bilinmektedir. Bu amaçla Avrupa Birliği (AB) “çiftlikten sofraya gıda güvenliğini sağlamak” için “ izlenebilirlik ” kapsamı içerisinde kalıntı ile ilgili direktifler oluşturarak, birçok ilaç için gıdalarda bulunması gerekli limitleri belirlemişlerdir [19].

Kesim öncesi bekletme süresine ve antibiyotiğin kullanım aralığına, yem içine karıştırma ve/veya yedirme kurallarına uyulmadığı takdirde, kalıntı içeren besinleri tüketen kişilerde;

- ✓ Kalıntı ile karsinogenik etki,
- ✓ Bağışıklık sisteminde düşme,
- ✓ Alerjik tepkimeler,
- ✓ Ölüme neden olabilecek kemik iliği rahatsızlıkları (Kloramfenikol kullanımı ile)

✓ Aplastik anemi sıklığı 1/65000 (Penisilin kullanımı ile) gibi etkileri olabilmektedir [20].

2.5 İnsan Sağlığı Üzerine Antibiyotik Kalıntılarının Etkileri

Daha önce, giriş bölümünde, bahsedilmiş olan faktörler ilaçların gıda zincirine girmelerine neden olmaktadır. Hayvansal kaynaklı gıdalar, insan patojeni olan pek çok mikroorganizmanın gelişebilmesi için uygun bir besi yeridir. Et ürünlerinde bulunan patojen bakteriler insanlara tüketim sonrası geçebilmekte ve hastalık etkeni olabilmektedir. İlaç kalıntısı içeren gıdaları tüketen insanlarda, alerjik reaksiyonlar, toksik belirtiler, üreme bozuklukları, obezite, bağırsak florasında değişiklikler (dizanteriyi taklit eden kanlı ishal) ile dirençli bakterilerin gelişimi gözlenebilmektedir [5]. Antibiyotiklere dirençlilik konak hücre bölünmesi sırasında vertikal olarak geçtiği gibi, karışık bakteriyel populasyonlardaki aynı veya farklı tür ve soylardaki patojen veya apatojen bakteriler arasında horizontal olarak da geçebilmektedir. Gıdalarda tolerans düzeyinin sınırları üzerinde bulunan antibiyotik insan sağlığı açısından tehlikelidir, böyle gıdaların tüketilmemesi gerekmektedir [21]. Gıdalarda ilaç kalıntılarına ilişkin mevzuatta çiğ dokulardaki tolerans düzeyleri mevcuttur. Bununla birlikte hayvansal gıdalar (et, süt ve yumurta gibi) genellikle değişik pişirme işlemleri uygulandıktan sonra tüketilmektedir. Literatürde başta antibiyotikler olmak üzere, çeşitli ilaç kalıntılarının değişik pişirme işlemleri ve depolama sırasında yıkımlanarak etkisiz metabolitlerine dönüşebildiği bildirilmiştir [22].

2.6 Literatür Özeti

Antibiyotikler, bakteri üremesini engelleyen veya bakterileri öldüren maddelerdir, 1941 yılında penisilinin keşfinden bugüne kadar bakteri enfeksiyonunu engellemek için sıklıkla kullanılmaktadır [23].

Antibakteriyel ilaçlar hayvanlarda kolay erişimi ve verim arttırıcılar grubunda değerlendirilen yem katkı maddeleri iki amaç ile kullanılmaktadırlar. Bunlardan ilki, sindirim sistemi hastalıklarına neden olan patojen mikroorganizmaların üremelerine engel olmak [6], ikincisi ise, hayvanın sindirim sistemi mikro florasını yararlı mikroorganizmalar lehine çevirerek hayvanın besin maddelerinden daha yüksek verimlilik [7] de yararlanmasını sağlamaktır. Hayvanlarda koruyucu, tedavi edici veya büyümeyi hızlandırıcı amaçlarla veteriner ilaçlarının kullanımından dolayı hayvansal

gıdalarda antibiyotik kalıntılarının bulunması [24] ayrıca insanlar tarafından antibakteriyel ilaçların yetersiz veya rastgele kullanımı dirençli bakteri suşlarının artmasına neden olmuştur. Bakteriler yeni antibiyotikler keşfedildikçe bunlara karşı savunmak için yeni direnç mekanizmaları geliştirmektedirler. Daha fazla mikrobiyel tür ve suş dirençli hale geldikçe çoğu hastalığın tedavisi imkânsız hale gelmektedir. Bu yüzden son yıllarda antibiyotik direncine olan ilgi artmıştır.

Antibiyotikler gıda değeri olan besi hayvanlarında hastalıkların tedavisi, önlenmesi ve kontrolü ile gelişmenin hızlandırılması, yemden yararlanma etkinliğinin ve verimliliğin artırılması amaçlarıyla kullanılır. Antibiyotikler doğrudan veya yem ve suya katılarak uygulanır. İlaç ve benzeri yetiştiricilik ürünlerinin kullanılmalarından sonra, hayvanların doku ve organlarında ya da et, süt gibi yenilebilir ürünlerde biriken veya depolanan özgün ilaçlar, metabolitleri, parçalanma ürünleri, serbest veya bağlı haldeki ilaç ya da kimyasal maddelerin hepsi birden kalıntı olarak nitelenir [1-4].

Hayvanlara gereksiz veya aşırı miktarlarda ilaç verilmesi, ilaç kalıntı arınma süresine uyulmaması, yem katkısı olarak kullanımlarda karıştırma hatalarının yapılması veya (yumurtlayan veya sağılan) hayvanların mevcut fizyolojik durumları dikkate alınmadan ilaçların seçilmesi gibi faktörler ilaçların gıda zincirine girmelerine neden olmaktadır. Bu durumun başta antibiyotikler olmak üzere insan tüketimi için vazgeçilmez protein kaynağı olan hayvansal kökenli gıdalarda ilaç kalıntıları riskini oluşturmaktadır [25].

İlaç kalıntılarının, başta çocuk ve yaşlılar olmak üzere insanların gıda zincirine girerek, hafif bir allerjiden kanserojen, teratojen veya mutajenik etkilere ve hatta penisilinlerde olduğu gibi anaflaktik şoka kadar değişen şiddette zehirlenmelere kadar varabilen ciddi halk sağlığı problemlerine yol açtığı bilimsel verilerle ortaya konulmuştur [26-29].

Sığır yetiştiriciliğinde solunum sistemi hastalıkları önemli bir sorun olup tedavide antibiyotiklerin kullanımı kaçınılmazdır. Sığır yetiştiriciliğinde sıklıkla karşılaşılan ve büyük ekonomik kayıplara neden olan solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerden biri florfenikoldür [8].

Florfenikol, sadece veteriner sahada kullanılan, sentetik, uzun etkili, antibakteriyel ve bakteriyostatik etkili bir ilaçtır [30]. Florfenikol, lipofilik özelliğinden dolayı dokulara iyi dağılım gösterdiği, geniş etki spektrumu, terapötik etkinliği, düşük toksisite riski ve gıda değeri olan hayvanlarda solunum ve sindirim sistemi infeksiyonlarının tedavisinde etkinlik sağlaması nedeniyle tartışmasız en önemli veteriner

ilaçlarından biri haline gelmiştir [8]. Florfenikolün, 50S ribozomal alt üniteyi inhibe ederek bakteriyel büyümeyi durdurduğu çok sayıda literatürde ifade edilmektedir. Florfenikolün elektrokardiyogram üzerine etkilerinin incelenmesi sonucunda, bu ilacın kardiyovasküler sistem üzerinde istenmeyen etkilere neden olabileceği açıklanmıştır [31]. Florfenikol; *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida* ve *Proteus vulgaris* mikroorganizma türleri üzerine etki etmektedir [32-34].

Gıdalarda son derece düşük seviyelerde antibiyotik kalıntı analiz tespiti oldukça zor ve zahmetlidir. Hayvansal kaynaklı gıdalar genellikle karmaşık matrislerdir. Bütün bir antibiyotik sınıfını kapsayan çoklu analit yöntemleri istenmektedir; bununla birlikte, seçici olmayan numune hazırlamaya ihtiyaç duyarlar ve bu nedenle, saptama sınırlarını, nicel ve seçiciliğin yanı sıra ekipmanın bakımını tehlikeye atabilecek olan matris etkilerine daha yatkındırlar [35,36]. Gıdalardaki antimikrobiyallerin etkili kontrolü, daha karmaşık yöntemler kullanılarak onaylama ve nicelendirmenin ardından düşük maliyetli ve yüksek numune verimi tarama yöntemlerinin kombinasyonunu gerektirir.

Gıdalardaki antibiyotik miktarını belirlemek için farklı analitik yöntemler geliştirilmiştir. Bu işlem için iki ana adım gereklidir: numune hazırlama, ardından ayırma ve tespit etme. Numune hazırlama sırasında analitlerin uygun şekilde ekstrakte edilmesi, konsantre edilmesi ve ayrıca mümkün olduğunca çok sayıda interferans yapan bileşiğin çıkarılması önemlidir. Amfenikollerin gıdadan ekstraksiyonu ve konsantrasyonu katı faz ve/veya sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile gerçekleştirilebilir. Çözücülerin ve reaktiflerin kullanımının azaltılmasını amaçlayan minyatürleştirilmiş yaklaşımlar da kullanılmıştır [37,38].

Yukarıda verilen bilgilerden de anlaşılacağı gibi yapılan araştırmalar, veteriner ilaçlarının hayvansal dokularda kalıntı bıraktığını ortaya koymakta ve kalıntı içeren gıdaların, besin zincirinin bir halkası olarak insan gıdasına dönüştüğünde önemli riskler mevcut olabileceğini ortaya çıkarmıştır. İyileştirme ve koruma amacıyla kullanılan antibiyotiklerin, metabolik reaksiyon sonucu açığa çıkan ürünlerin çeşitli doku ve biyolojik sıvıları ile süt ve bal gibi bazı gıda maddelerindeki kalıntılarının analizleri için doğruluğu ve kesinliği yüksek metotlar geliştirilmiştir. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden sıklıkla kullanılan immunoassayler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [9,25,39-42], yüksek performanslı sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi (HPLC/MS) [43], sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi (LC/MS) [44,45], sıvı kromatografisi/ tandem kütle spektrometresi [46], gaz kromatografisi/kütle

spektrometresi (GC/MS) [31,44,47], kemülüminesans [48] ve LC/MS/MS [49], gibi yöntemler oldukça hassas olmakla birlikte yüksek maliyetli olup, gelişmiş ve uzmanlık gerektiren ekipmanlara ihtiyaç duymaktadır [9,25]. Bununla birlikte, bu yöntemlerin karmaşık, uzun prosedürler, masraf ve alan kullanımı için uygun olmama gibi çok fazla dezavantajı vardır.

Son yıllarda geliştirilen elektrokimyasal yöntemler yukarıda belirtilen dezavantajların üstesinden gelmede büyük ilerleme kaydetmiştir. Ayrıca, elektrokimyasal yöntemler basitliği, güvenilirliği ve daha hızlı yanıt vermesi ile bilinir. Kolay taşınabilir enstrümantasyon ve ucuz metodoloji ile daha fazla hassasiyet sağlar [50,51]. Biyosensörler ve kimyasal sensörler alanındaki çok sayıda polimer modifiye elektrot çalışması geniş uygulama alanlarından dolayı büyük ilgi görmüştür [52]. İlaçların etken maddesi tayininde kullanılan elektrokimyasal yöntemler de mevcuttur [53-55]. Kutluay Baytak, A. ve Aslanoğlu M. karbon nanotüp ve rutenyum temelli modifiye elektrot ile biber örneklerinde kapsaisin belirlemiştir [53]. Burç, M. ve arkadaşları parasetamolün hızlı ve yüksek hassasiyetli tespiti için poliimid-MWCNT kompozit membran bazlı voltametrik sensör geliştirmişlerdir [54]. Güngör, Ö. ve arkadaşları diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemi ile poliimid membran tabanlı elektrotlar kullanarak lokal anestezik bir madde olan bupivakain tayinini gerçekleştirmişlerdir [55]. Gıdalarda antibiyotik tayini için elektrokimyasal sensör çalışmaları da mevcuttur [56-62]. Karbon nanotüp ve altın nanopartüküllerle modifiye edilmiş elektrot kullanılarak sütte tiamfenikol kalıntısını tespit etmek için elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir [57]. Dumont, V. ve arkadaşları karideslerde tiamfenikol, florfenikol, florfenikol amin ve kloramfenikol kalıntılarının eş zamanlı tayini için bir yüzey plazmon rezonans biyosensör çalışması yapmıştır [60]. Huet, A.C ve arkadaşları yumurta, balık ve kanatlı hayvan etinde (floro) kinolonlar için bir optik yüzey plazmon rezonans biyosensör geliştirmişlerdir [61].

Bu tez çalışmasında ise; elektrot yüzeyleri poli-3-metil tiyofen ile modifiye edilmiş ve bu sayede hiçbir girişim etkisi olmaksızın gıda maddelerindeki florfenikolün direkt tespiti mümkün olmuştur. Bunu kanıtlamak amacıyla; kırmızı ve beyaz et gibi gıda maddelerinde kalıntı olarak bulunabilecek florfenikol antibiyotiğinin tespitinde kullanılan zahmetli, karmaşık ve duyarlılığı düşük tekniklerin yerine kullanılabilecek; hızlı, ucuz, zahmetsizce hazırlanabilen ve kısa sürede yanıt alınabilen, mükemmel duyarlık-kararlılık sergileyen basit bir deneysel tasarıma sahip, güvenilir ve hızlı voltametrik florfenikol sensörü geliştirilmiştir.

2.7. Voltametri

Voltametri, yükseltgenen ve/veya indirgenen elektroaktif inorganik veya organik maddelerin çeşitli ortamlardaki akım-potansiyel eğrilerini inceleyen ve değerlendiren bir yöntemdir. Kullanılan elektrot asılı civa damla veya katı elektrot ise yöntem voltametri, elde edilen akım-potansiyel eğrisi ise voltamogram olarak adlandırılır. Analizi yapılacak çözelti içindeki elektroaktif maddelerin yükseltgenbilme, indirgenbilme özelliklerine göre elektroliz tepkimesi, çalışma elektrotuna ait potansiyel aralığının belirli bir noktasında olur. Elde edilen voltamogramlar, çözeltideki elektroaktif maddelerin nitel ve nicel özelliklerini yansıtır. Voltametrde; yüzey alanı birkaç mm^2 'den daha küçük mikroeletrotlar ve mikrometre kareden daha küçük ultra mikroeletrotlar çalışma elektrotları olarak kullanılmaktadır [63]. Voltametrik potansiyel çalışma aralığı elektrot türüne, çözücüye, pH'ya ve kullanılan elektrolit türüne bağlıdır. Katodik sınırı hidrojenin oluşumu, anodik sınırı ise elektrot malzemesinin ya da çözücünün yükseltgenmesi belirler. Ortamın pH'sı arttıkça katodik bölge daralır. Elektrolit, metal iyonu ile kompleks oluşturan bir iyon ya da molekül içeriyorsa metal elektrotlara ilişkin anodik bölgede daralma gözlenir. Örneğin; Pt, Au, Hg gibi elektrotların çalışma aralığı halojenürler varlığında kompleks oluşturmamasından dolayı daralmaktadır.

Voltametri; çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, moleküler oksijen tayini, elektrot yüzeyinde gerçekleşen adsorpsiyon ve elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması, farmasötik açıdan önemli türlerin tayini gibi pek çok uygulamada kullanılır.

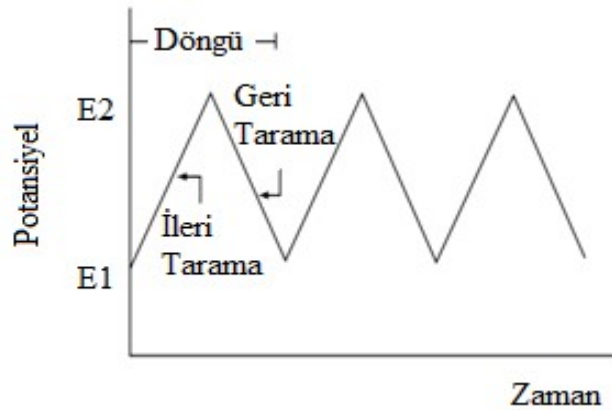
İlaç analizlerinde kromatografik ve fotometrik yöntemlere alternatif olarak voltametrik teknikler kullanılabilir. Voltametrik teknikler kullanılabileceği gibi tamamlayıcı niteliğe de sahiptir. Ayrıca voltametrik tekniklerle yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) birleştirilmesiyle, kompleks karışımların analizi sağlanmıştır [64].

Voltametrik yöntemlerin diğer analitik yöntemlere üstünlüğü ise; az miktarda maddenin analiz için yeterli olması, ucuz olmaları, kolay uygulanabilir olmaları, analitlerin ön saflaştırma işlemlerine fazla ihtiyaç olmaması, fazla çözücü gerektirmemeleri ve daha duyarlı birer yöntem olmalarıdır [53-55]. Voltametrik yöntemlerin duyarlılığının ve seçiciliğinin yüksek olması nedeniyle tıp, eczacılık, biyokimya ve çevre çalışmalarında yöntemine geniş ve giderek artan bir uygulama alanı sağlamıştır [65,66]. Eczacılık alanında ve klinik çalışmalarda voltametrik tekniklerin kullanılmasının nedeni; düşük derişimlerde farmasötik analizlerin yapılabilmesi, numunelerin kısa sürede ve kolayca hazırlanabilmesi, analiz süresinin kısalığı, ortamda

bulunan interferans maddelerinin veya safsızlıkların analiz sonucunu etkilememesi, bu tekniklerin ürün kalite kontrolünde kullanılabilmesine olanak sağlamasıdır [54]. Herhangi bir ayırma işlemine gerek olmadan tablet, kapsül, süspansiyon ve şurup gibi ilaç formülasyonlarının çözünmeyen kısımlarının veya katkı maddelerinin genelde elektroaktiviteleri bulunmadığı için analizleri kolaylıkla yapılabilmektedir [54,55]. Ayrıca bir diğer üstünlüğü de ucuz olması ve az miktardaki ilaçların analizinde de çalışma imkanı vermesidir.

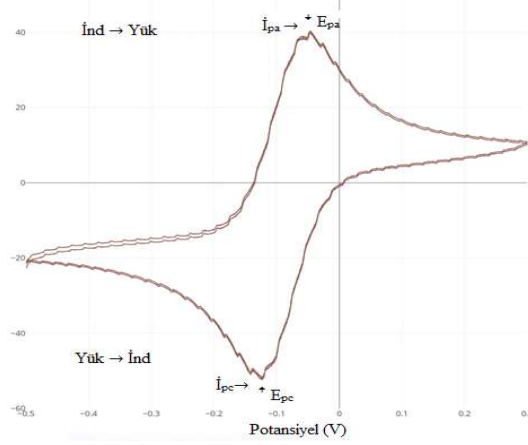
2.7.1 Dönüşümlü voltametri (CV)

Dönüşümlü voltametri yöntemi elektrokimyasal yöntemler içinde en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde çalışma elektrodunun karşıt elektroda göre potansiyelinin belirli bir potansiyel programına uyacak şekilde değiştirilmesi esas alınmaktadır. Dönüşümlü voltametri yönteminde potansiyel zaman ile doğrusal olarak değişir. Uygulanan potansiyel-zaman değişim grafiği Şekil 2.4’de verilmiştir.



Şekil 2.4: CV için potansiyel-zaman değişimi.

Potansiyel taraması bir E1 başlangıç potansiyeli ve E2 potansiyeli arasında yapılır daha sonra aynı tarama hızıyla ilk tarama yönüne göre ters yönde tarama gerçekleştirildiği için yöntemin adı dönüşümlü voltametri olur (Şekil 2.4). Ters taramada potansiyel E1’de sonuçlanabileceği gibi farklı bir potansiyele de götürülebilir. İleri yöndeki potansiyel taraması sırasında çalışma ve karşıt elektrotlar arasında geçen akım kaydedilirse pik şeklinde bir akım-potansiyel eğrisi elde edilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: CV metodu ile tersinir bir elektroaktif maddenin akım-potansiyel değişimi.

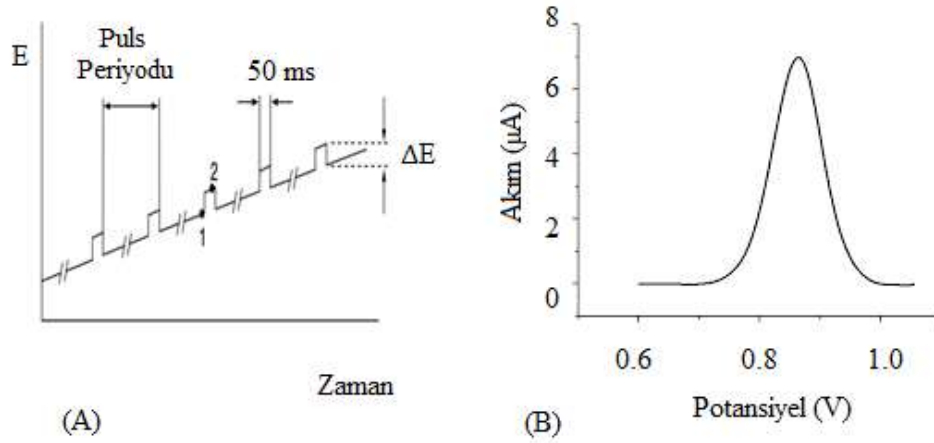
Bu piklerden ileri yöndeki, çözeltideki elektroaktif maddenin yükseltgenmesine; potansiyel tarama yönü ters çevrildiğinde ortaya çıkan pik ise yükseltgenmiş elektroaktif maddenin yeniden indirgenmesine aittir. Potansiyel programı ardarda uygulandığında çok döngülü dönüşümlü voltamogram elde edilir. Şekil 2.5’de verilen bir dönüşümlü voltamogramda Epc, katodik pik potansiyelini, Epa, anodik pik potansiyelini, ipc, katodik pik akımını ve ipa ise anodik pik akımını göstermektedir. Elektroda hızlı bir potansiyel taraması uygulandığı zaman potansiyel, standart indirgenme potansiyeli değerine yaklaşınca madde indirgenmeye başlar. Potansiyel negatifleştikçe elektrot yüzeyindeki maddenin indirgenme hızı ve buna bağlı olarak da akım artar. İndirgenme hızı yeterince büyükse akımı, elektrot yüzeyine difüzyonla gelen madde miktarı kontrol eder. Zamanla difüzyon tabakası kalınlaşacağından difüzyon hızı azalır ve akım da azalmaya başlar. Dönüşümlü voltametri de elde edilen pik akımının büyüklüğü; elektroaktif maddenin derişimine, alınan/verilen elektron sayısına, elektrodun yüzey alanına ve difüzyon katsayısına bağlıdır. Elektrot mekanizmalarının incelenmesinde, adsorpsiyon olayının araştırılmasında ve kinetik çalışmalarda CV yöntemi daha çok kullanılır.

2.7.2 Diferansiyel puls voltametri (DPV)

1960’lardan sonra doğrusal taramalı voltametri metotları önemli bir metot olmaktan çıkmış, yerine puls metodları gelişmeye başlamıştır. Doğrusal taramalı voltametrenin yavaş olması, dedeksiyon limitinin düşük olması ve pahalı parçalar gerektirmesi gibi özellikleri nedeniyle diferansiyel puls voltametri gibi önemli metodlar

geliştirilmiştir [67]. Diferansiyel puls voltametrisi, organik ve inorganik türlerin eser seviyelerini ölçmek için oldukça faydalı bir tekniktir.

Diferansiyel puls yöntemleri düşük derişimli eser elementlerin tayinine imkân vermektedir. Bu yöntem sıklıkla pek çok elektroaktif türün eser miktarlarının tayininde kullanılmaktadır. Puls yöntemleri içerisinde en çok tercih edilen diferansiyel puls voltametrisidir, tayin sınırı 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır. Akım, puls uygulamasından önce ve sonuna doğru ölçülür Şekil 2.6 (A). Akımlar arasındaki fark (ΔE) potansiyele karşı grafiğe geçirilir ve pik şeklinde bir voltammogram elde edilir Şekil 2.6 (B). Pik potansiyeli, elde edilen pikin tepe noktasındaki potansiyeldir ve E_p şeklinde gösterilir. Pik akımı ise oluşan pikin yüksekliğini ifade etmekte olup, I_p şeklinde gösterilir.

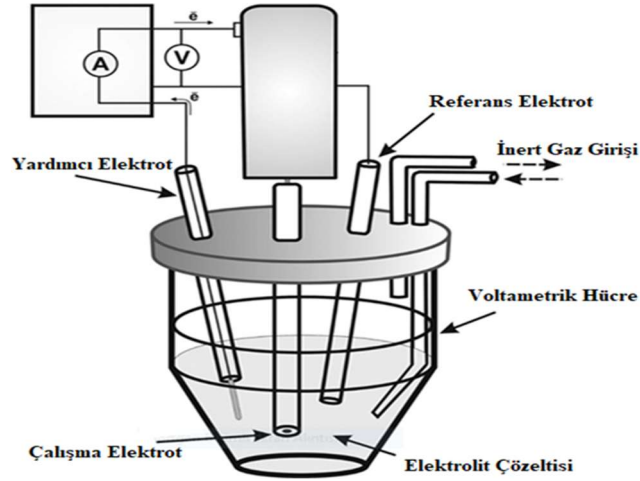


Şekil 2.6: Diferansiyel puls (A) sinyal oluşumu, (B) voltamogramı.

Şekil 2.6 (B)'deki gibi bir pikin yüksekliği, karşılık gelen analitlerin konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır.

2.8 Elektrokimyasal Hücreler ve Elektrotlar

Voltametrizde kullanılan elektroanalitik hücreler; çalışma elektrodu; referans elektrot; karşıt (yardımcı) elektrot olmak üzere üç elektrottan oluşur (Şekil 2.7).



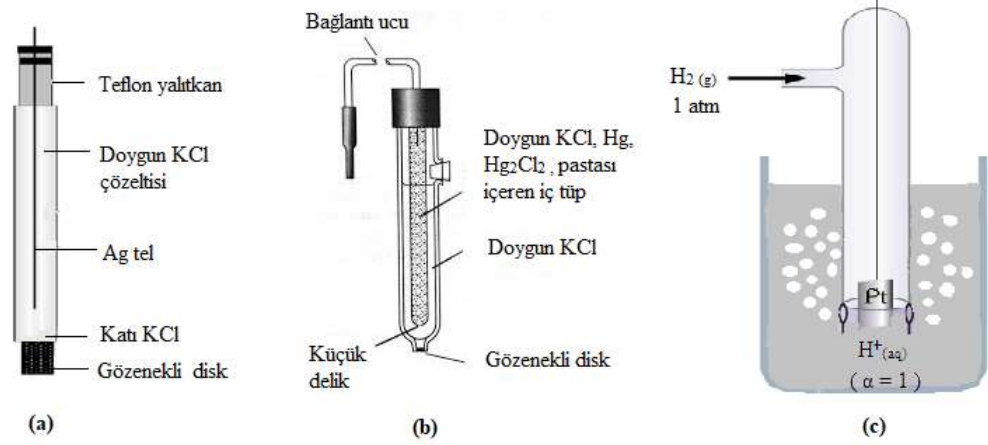
Şekil 2.7: Elektrokimyasal hücre ve bileşenleri.

Hücre tasarımı ve yapımı için kullanılan malzeme deney ve numunenin doğasına göre seçilir. Hücre materyali olarak genellikle pyrex, cam ve kuvars kullanılır, çünkü düşük maliyeti, şeffaflığı, kimyasal olarak inert olması ve kolay temizlenebilmesi gibi özelliklerinden dolayı tercih edilir. Farklı tasarımlar; boyut, sıcaklık kontrolü, şekil veya hücre bölmeleri sayısına göre yaptırılabilir. Numune hacmi sınırlı olduğunda 20-500 μL hacimli hücreler kullanılabilir. Özel olarak tasarlanmış akış hücreleri çevrimiçi uygulamalar için kullanılır.

Hücre kapağı, numuneyle etkileşmeyen, tercihen teflon, Kel-F veya uygun herhangi bir malzemeden yapılabilir. Hücre kapağında hem kullanılan inert gazın girişi, hem de reaksiyon sonucunda oluşabilecek gazların çıkışı için delikler bulunmaktadır. İhtiyaç duyulduğunda hücre içine bir manyetik karıştırıcı ilave edilerek karıştırma sağlanabilmektedir.

2.8.1 Referans elektrot

Voltametricde kolay polarize olan çalışma elektrotunun özelliği veya özelliğindeki değişimler bir yardımcı geniş yüzeyli inert elektrot ve potansiyeli çözelti bileşiminden etkilenmeyen referans elektrot yardımıyla ölçülmektedir. Bu amaçla; gümüş-gümüş klorür (Ag/AgCl) ve doymuş kalomel elektrot (DKE) ve standart hidrojen elektrodu (SHE) referans elektrot olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Referans elektrotlar (a) Ag/AgCl, (b) DKE, (c) SHE.

2.8.2 Karşıt elektrot

Genellikle platin (levha, tel, ve spiral şekilde tel) veya grafit çubuk gibi inert bir iletken malzeme akım taşıma amacıyla kullanılır. Bu elektrot aynı zamanda yardımcı veya karşı elektrot olarak da adlandırılmaktadır.



Şekil 2.9: Karşıt elektrot çeşitleri.

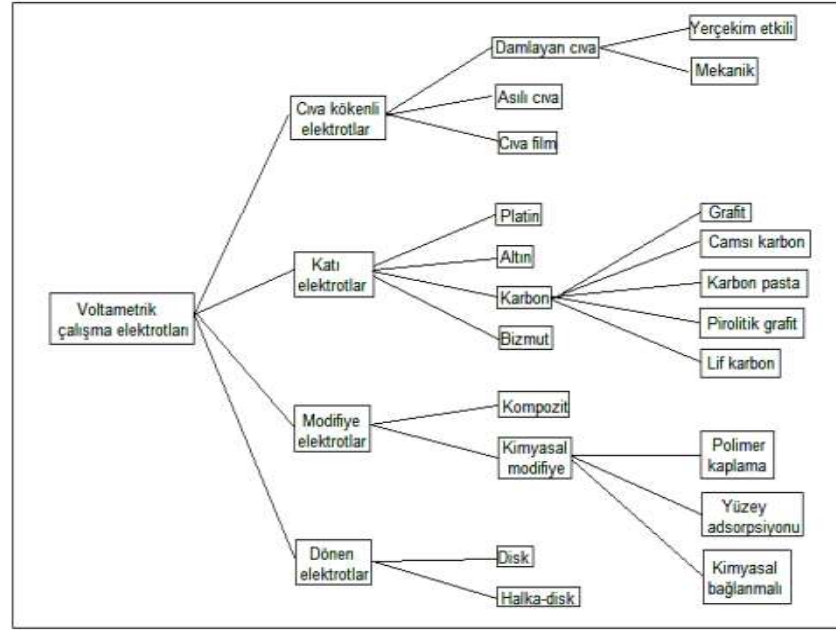
Karşıt inert elektrotta (genellikle platin tel) aranan başlıca özellikler;

- ✓ Çalışma elektrodunun potansiyelini,
- ✓ Çalışma elektrodu üzerinden geçen akımı,
- ✓ Çalışma elektrodu üzerinde yürüyen tepkimeleri etkilemesin,
- ✓ Aşırı gerilim istemesin,
- ✓ Akım sınırlayıcı etkisi olmasın,
- ✓ Çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot arasında düzgün ve doğrusal bir elektriksel alan oluşumuna olanak sağlasın.

Akım sınırlayıcı etkisinin olmaması için yardımcı elektrotun yüzey alanı çalışma elektrotunun yüzey alanından çok daha büyük olması gerekir.

2.8.3 Çalışma elektrodu

Analizlemek istenilen tür veya türlere karşı elektriksel yanıtı değişen çalışma elektrodu, yöntemin seçiciliği ve duyarlılığı açısından çeşitli bileşimlerde ve fiziksel şekillerde (küre veya yarım küre, silindirik tel veya disk) olabilmektedir. Bir dizi malzeme, çalışma elektrotları olarak kullanım alanı bulmuştur (Şekil 2.10). Voltametrizde çalışma elektrotu olarak platin, altın ve camsı karbon elektrot yaygın olarak kullanılmaktadır [48, 49, 52,53].



Şekil 2.10: Voltametrizde kullanılan çalışma elektrotları.

Genel olarak voltametrizde kullanılan çalışma elektrotları şu şekilde sınıflandırılabilir;

1. Cıva Kökenli elektrotlar

- i) Damlayan Cıva (Mekanik veya Yerçekim etkili)
- ii) Asılı Cıva
- iii) Cıva Film

2. Katı Elektrotlar

- i) Platin
- ii) Altın
- iii) Bizmut
- iv) Karbon (Grafit, Camsı Karbon, Karbon Pasta, vb.)

3. Modifiye Elektrotlar

- i) Kompozit

ii) Kimyasal Modifiye

Çalışma elektrodu olarak kullanılacak olan elektrodun yapısında aranacak özellikler arasında;

- ✓ Analizlenecek türe karşı duyarlılık,
- ✓ Seçicilik,
- ✓ Tekrarlanabilirlik,
- ✓ Kolay hazırlanabilirlik ve yenilenebilirlik,
- ✓ Uygun fiziksel boyut ve etkin yüzey alanı,
- ✓ Sinyal/gürültü oranının yüksek olması,
- ✓ Aktivasyon polarizasyonuna elverişli olmayan yapı,
- ✓ Çalışma koşullarında yan tepkime ve öngörülme değişimlere karşı inertlik,
- ✓ Geniş bir potansiyel çalışma aralığı gibi özellikler sayılabilir.

Katı çalışma elektrotu kullanılmadan önce yüzey hazırlama işleminden geçirilir. Küçük bir aşındırma ile temiz, pürüzsüz ve homojen yüzey elde edilmeye çalışılır. Burada dikkat edilmesi gereken şey yüzey morfolojisinin değişmemesine özen gösterilmesidir. Yüzeyde bulunan oksit tabakası, adsorbe safsızlıklar tamamen uzaklaştırılmış olmalıdır.

Mekanik temizlik için eğer yüzey bir önceki çalışmadan dolayı çok kirlenmiş ise su zımparası ile temizleme sonra parlatma işlemine geçilmelidir. Parlatma işleminde elmas parlatıcısı kullanılır.

Bir başka temizleme şekli; güçlü yükseltgen çözeltiler aracılığı ile metalik elektrodu çözünür yapıp dönüştürerek kimyasal temizleme yapmak mümkündür. Elektrokimyasal yüzey temizleme de bir başka yöntemdir. İki şekilde yapılır;

1. H_2 çıkış bölgesinde elektrotu belli bir süre bekletme şeklindedir.
2. H_2 ve O_2 çıkış bölgeleri arasında hızlı bir çevrimsel voltamogramla temizlenmesidir.

Bu tez çalışmasında çalışma elektrodu olarak; kimyasal etkilere karşı oldukça dirençli, elektriksel olarak iletken, gaz geçirilmeyen ve saf halde elde edilebilen, anodik bölge çalışmaları için uygun bir materyal olan camsı karbon elektrot (GCE) kullanılmıştır.

Avantajları;

- ✓ Kimyasal olarak inert (çözgen direnci)
- ✓ Ucuz
- ✓ Geniş potansiyel penceresine sahip
- ✓ Çözünmüş O_2 ve H_2 oluşumu için gerekli aşırı potansiyele sahip

- ✓ Proton transferi içeren reaksiyonlar ve birçok redoks çifti için tersinirliği yüksek
- ✓ En önemli avantajı ise sıyırma voltametriyi yoluyla eser elementlerin tayininin yapılabilmesidir.

Dezavantajları;

- ✓ En önemli dezavantajı hiçbir camsı karbon elektrot bir diğer camsı karbon elektrot ile eşdeğer değildir
- ✓ Camsı karbon elektrotu ile uranyum, demir, krom ve bakırın kalorimetrik indirgenmesi cıva ve platin elektroduna göre daha az duyarlıdır.
- ✓ Kesinliği azalabilmektedir. Bunun sebebi ise GCE'deki yüksek zemin akımı ve elektrolizin daha uzun sürmesidir.
- ✓ 1 M H₂SO₄ içerisinde yüksek bir artık akım oluşturmaktadır.
- ✓ Yüksek akım yoğunluğunda yeniden kristalizasyonun bir sonucu olarak yüzeyi pürüzlenebilmektedir.
- ✓ Yüksek yoğunluğa ve küçük gözenekliliğe sahip camsı karbon elektrotları yeniden üretmek için genellikle yüzeyde bir ön denemeye başvurulur.

Performansı değiştirmek için;

- ✓ Elektrokimyasal
- ✓ Kimyasal
- ✓ Isıtma
- ✓ Lazerle müdahale gibi ilave aktivasyon basamakları kullanılabilir.

Elektron- transfer reaktifliğini arttırmak için;

- ✓ Yüzeyde girişim yapan türleri uzaklaştırmak
- ✓ Serbest karbon türlerini açığa çıkarmak
- ✓ Yüzeydeki oksijen grupların yoğunluğunu artırma işlemleri yapılabilir.

Camsı karbonun elektrokimyasal özellikleri bir ağ kombinasyonu gibi bunlar oldukça geniş yüzey alanına sahip, %90-97 boş hacimleri bulunmakta ve sıvı akışı için küçük bir direnç göstermektedirler.

2.9 Çözücü ve Destek Elektrolitler

Elektrokimyasal ölçümler genellikle sulu veya susuz bir ortam içinde gerçekleştirilir. Elektrolit çözeltisi; iletkenliği sağlamak amacıyla kullanılan bir tuz ve çözücünden oluşur. Çözücü seçimi öncelikle analitin çözünürlüğü ve redoks aktivitesi ayrıca elektriksel iletkenlik, elektrokimyasal aktivite ve kimyasal reaktivite gibi

özelliklere göre belirlenir. Çözücü analitle veya ürünler ile geniş bir potansiyel aralığında elektrokimyasal reaksiyona girmemelidir.

Elektrokimyasal bir hücrede kullanılan elektrolit; basit bir sulu çözücü, tuz karışımlarının çözeltisi, bir katı veya bir gaz dahi olabilir. Genel olarak bir elektrolit birkaç bileşen (çözücü, destek elektrolit, tampon ve diğer maddeler) içerir ve bu bileşenlerin her biri hücrede yapılan gözlemi etkiler. Esas olan çözücünün varlığıdır ancak, diğer bileşenler de hemen hemen daima bulunur. Çözücülerde aranan en önemli özellik yüksek dielektrik sabitine (≥ 10) sahip olmasıdır. En çok kullanılan çözücüler ve dielektrik sabitleri; su, 80; Dimetil formamid (DMF), 36.7; Dimetil sülfoksit (DMSO), 46.7; asetonitril, 37.5. Polaritesi daha düşük çözücüler de voltametrik çalışmalarda kullanılabilir. Ancak, yeterince iletkenliği sağlamak için ortama destek elektrolitleri ilave edilir. Çeşitli tuzlar, asitler ve bazlar sulu ortamda destek elektroliti olarak kullanılabilir.

Verilen herhangi bir elektrokimyasal teknik için evrensel bir elektrolit yoktur. Ancak, o tekniğin pratiği dikkate alınarak bazı tavsiyeler yapılabilir. Tampon olarak asidik bölgede asetik asit/asetat, bazik bölgede ise amonyum/amonyak tamponu kullanılmakla birlikte sitrat, tris ve fosfat tamponları da kullanılabilir. Tampon derişimi yeterince yüksek ise ayrıca bir destek elektrolit ilavesine ihtiyaç olmayabilir.

Elektroanalitik ölçümlerde en çok kullanılan su önemli elektrokimyasal çözücülerden biridir. Suyun en büyük avantajı; çok yüksek saflıkta elde edilebilirliği, ucuz oluşu ve başka çözücülere kıyasla çok fazla sayıda maddeyi çözebilmesidir. Dezavantajı ise özellikle büyük moleküllü organik bileşikler yeterince çözmemesi ve protik bir çözücü olmasıdır. Birinci dezavantaj, diferansiyel puls voltametrisi gibi daha duyarlı teknikler kullanıldığında giderilmektedir. Protik çözücü olması, yani hidrojen iyonları bulundurması nedeniyle protonun yer aldığı elektrokimyasal reaksiyonların çalışılması durumunda elektrolitin tamponlanması gerekmektedir.

Bazen su yerine karışık çözücüler kullanılarak çözücünün çözücülüğü artırılabilir. Su ile karıştırmak üzere seçilen ikincil çözücüler (genellikle dioksan:su karışımı) büyük ölçüde sulu çözelti özelliğine sahiptir. Karışık çözücülerle çalışılırken birkaç hususa dikkat etmek gerekir. Bunlardan birincisi referans elektrottur. En iyi seçim sulu doygun kalomel elektrottur. Bu elektrodun karışık çözücülerde kullanılması dikkate değer büyüklükte bir sıvı temas potansiyelinin ortaya çıkmasına sebep olmakla birlikte susuz referans elektrotlar kullanımına tercih edilir. İkinci husus, bir protik çözücü olarak suyun kullanılması nedeniyle çözelti pH'sının kontrol edilmesinin gerektiği durumlarda ortaya çıkar. Ancak, böyle bir ortamdaki pH skalası tamamen sulu ortamdaki pH

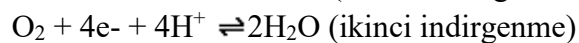
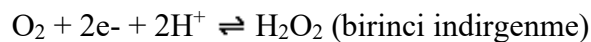
skalasından farklı olacağından sulu ve karışık çözücülerde ölçülen pH değerlerinin karşılaştırılmaması gerekir.

Susuz protik çözücüler olarak ise alkoller ile inorganik ve organik asitler kullanılır. Bunlar çözücülük açısından sulu veya karışık çözücülere göre bir avantaj getirmediği halde kullanılmalarının nedeni, bu çözücülerdeki reaksiyon mekanizmalarının sudakinden çok farklı ve istenilen tarzda olmasıdır.

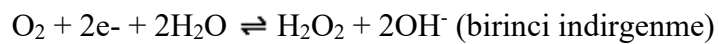
Susuz çözücülerin çoğu aprotiktir. Erimiş tuzlar ve asetonitril bu gruba girer. Susuz çözücülerin seçimindeki neden bazı elektrokimyasal türlerin ancak bu tür çözücülerde çözünebilmesidir. Ancak, bunların saflaştırılması, suyun saflaştırılması işlemlerine kıyasla çok daha zordur. Öte yandan atmosferdeki su ve oksijenle reaksiyon vermeleri veya otodegradasyon gibi olumsuzlukları söz konusudur.

Ortamın iletkenliğini ve elektroaktif maddenin elektrot yüzeyine yalnızca difüzyonla taşınmasını sağlamak için destek elektrolit kullanılır. Destek elektrolit bu göreve ek olarak bazı uygulamalarda ortamın pH'sını ayarlayan bir tampon ya da ortamda bazı iyonları kompleksleştiren bir ligant görevini de görebilir. Bazı ortamlarda ise anodik potansiyel sınırının hangi değerden başlayacağını belirlemede etkin rol üstlenir. Şöyle ki; destek elektrolitin yükseltgenme potansiyeli anodik sınır potansiyeli olarak alınır. Negatif potansiyel sınırını ise çözücünün ya da destek elektrolit katyonunun indirgenme akımı belirler. Hg elektrotta asidik ortamda -1.80 V'da bazik ortamda -2.30 V'da suyun indirgenerek H₂ gazı oluşturması sonucu şiddetli bir akım geçer. Bazı organik çözücüler suya göre daha güç indirgenir ya da daha güç yükseltgenirler. Bazı çözücülerde ise hem indirgenme sınırı, hem de yükseltgenme sınırı suya göre daha yüksek potansiyel değerlerinde ortaya çıkar. Böylece susuz çözücülerin kullanılması ile ve uygun bir elektrot malzemesi ve destek elektrolit seçilerek çalışabilen voltametrik potansiyel sınırları hem anodik hem de katodik yönde daha büyük potansiyel değerlerine kaydırılabilir.

Ayrıca normal şartlarda havayla dengede bulunan bir çözeltideki çözünmüş olarak bulunan elektroaktif oksijen molekülü konsantrasyonu 2×10^{-4} M'dır. Bu konsantrasyondaki oksijen oldukça belirgin bir pik verir. Bu pik Asidik çözeltisinde:



Nötral veya bazik çözeltide:



Bu reaksiyonların ortamda gerçekleşmesinin istenmediği durumlarda elektroliz ortamından inert bir gaz, genellikle N₂, uzun bir süre geçirilir.

2.10 Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Sensörler

Elektrokimyasal sensörler doğrudan doğruya elektrik sinyalleri üretirler. Bu onların hem önemli avantajlarından biri, hem de kimyasal sensörlerle elektrokimya alanları arasındaki yakın ilişkinin nedenlerinden biridir. Spesifik bir cihazın elektrokimyasal sensör olarak tanımlanması hakkında farklı görüşler ortaya atılmıştır.

Elektrotların modifikasyonu, farklı polimer tiplerinin kaplanması ve nanomateriyaller, antikorlar ve enzimler gibi bazı modifiye ajanların eklenmesiyle yapılabilir. Elektrotların modifikasyonunda polimerik membranlar

- Elektrokimyasal polimerizasyon
- Kimyasal polimerizasyon şeklinde uygulanabilir.

Kimyasal sentez, kondenzasyon polimerizasyonu ya da katılma polimerizasyonu gibi farklı metodları içerir. Kimyasal sentez yalnızca çeşitli iletken polimerleri sentezlemek için farklı yollar sunmaz, aynı zamanda elektrokimyasal sentez ile şu anda mümkün olmayan şekilde bu materyallerin genellikle toz halinde ya da kalın polimer filmler elde edilmesine izin verir [68,69].

Elektropolimerizasyon, iletken polimerin bir monomer çözeltisinden bir iletken substrat üzerine oluşturulduğu ve biriktirildiği bir kaplama prosedürüdür. Polimerizasyon çalışma elektrodu, karşıt elektrot ve referans elektrot olmak üzere üç elektrotlu düzenek ile uygulanır. Elektrokimyasal teknik ile 20 nm gibi çok ince filmler üretilebilmektedir. Özellikle uygulanan potansiyel ve akımın elektropolimerizasyon koşullarını seçerken dikkatli olunmalıdır. Elektropolimerizasyon sürecinde sıcaklık, çözücü sistemi (su içeren), elektrolit, elektrot sistemi, elektrot üzerinde polimerin birikme süresi ve potansiyelin uygunluğu gibi değişkenler dikkate alınmalıdır. Uygulanan potansiyel, monomeri okside etmek ve polimerize etmek için yeterince yüksek, ancak metali çözmemek veya korozyonu indüklememek için yeterince düşük olmalıdır [70].

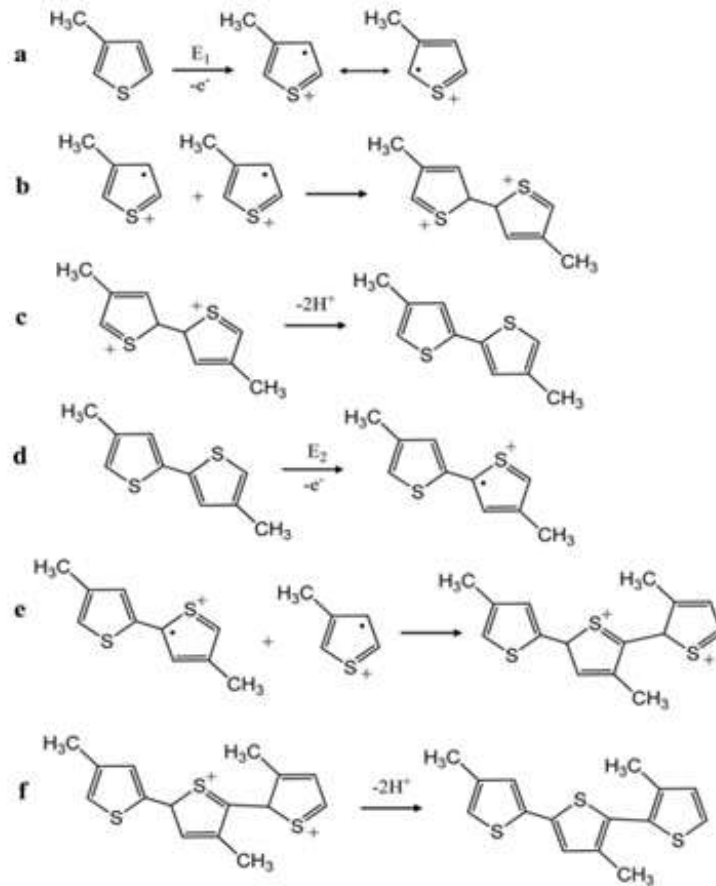
Bütün iletken polimerler kimyasal yolla sentezlenebilir fakat elektrokimyasal sentez uygun bir potansiyel varlığında polimerizasyonun başlatıcıları olan reaktif ve radikal iyonları oluşturmak üzere yükseltgenen monomerlerin varlığındaki sistemler ile sınırlıdır. İletkenlik polimerin doğal bir özelliği olabileceği gibi iletken dolguların polimere katılmasıyla da iletken polimerler elde edilmektedir. İletken dolgu olarak C siyahı veya parça halinde C fiber veya metal tozları kullanılmaktadır. Kendiliğinden

iletken olan ilk polimer polisülfür nitrür olup, iletkenliği 10^3 s/cm civarındadır. Polimerik filmlerin özelliklerinin; polimerizasyon şartları, film kalınlığı, iplikçik çapı ve cis trans vinilleme birimlerinin bağıl oranlarına bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir.

2.11 3-Metil Tiyofenin Elektropolimerizasyonu

3-MTF, GCE'un yüzeyinde serbest radikallerle oksitlenmiş, radikaller daha sonra hızlı bir şekilde birleşme reaksiyonu ile ürünü ortaya çıkarmıştır.

Şekil 2.11'de görüldüğü gibi; ilk adım, monomerin oksidasyonu (Şekil 2.11a) ve radikal katyonun oluşumunu (Şekil 2.11) göstermektedir. Daha sonra, iki radikal katyon birleşerek ve dihidrodimer diksiyonu (Şekil 2.11b) meydana gelmektedir. İkinci adımdan sonra, ara ürün iki proton kaybettikten ve yeniden aromatize edildikten sonra dimere dönüşmektedir (Şekil 2.11c). Dimer oksitlenip (monomerden daha kolay) ve aynı rotayı (Şekil 2.11d-f) takip ederek trimeri oluşturmaktadır. Bu reaksiyonların ardından, polimer zinciri büyümeye devam etmektedir.



Şekil 2.11: 3-MTF'in elektropolimerizasyon mekanizması.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Kimyasal Maddeler

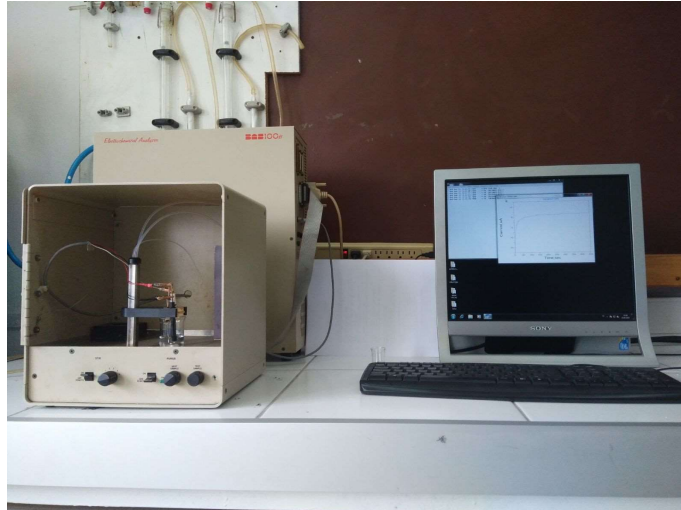
Elektropolimerizasyonda monomer olarak kullanılan 3-metil tiyofen, indolin, p-aminobenzoik asit, o-aminobenzoik asit, 4-vinil piridin, 4-hidroksi benzaldehit, para tolueen sülfonik asit, tetrabutilamonyum tetrafloroborat (TBATFB) Sigma-Aldrich'den; eter, asetonitril (AcN), dimetil formamit, sülfürik asit ve nitrik asit Merck Chemical'dan satın alınmıştır.

Voltametrik çalışmalar için Tris, sodyum sülfat, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , sodyum klorür, lityum klorür, potasyum nitrat, sodyumasetat Sigma-Aldrich Chemical Company veya Merck firmasından temin edilmiştir. Florfenikol ise piyasadan satın alınan “Florkem” ilacı saflaştırılarak kullanılmıştır.

Voltametrik çalışmalar; yaklaşık olarak 2 dakika boyunca % 99.99 saflıkta azot gazı geçirildikten sonra gerçekleştirilmiştir.

3.2 Ölçümde Kullanılan Aygıt ve Gereçler

Çalışmalarda potansiyostat olarak *BAS (Bioanalytical Systems, Inc.)* marka 100B model bir elektrokimyasal analizör kullanılmıştır. Analizör bilgisayara bağlanmış, aygıtın kontrolü, veri depolaması ve işlenmesi bilgisayara yüklenmiş ve MS-Windows altında çalışan bir yazılım kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



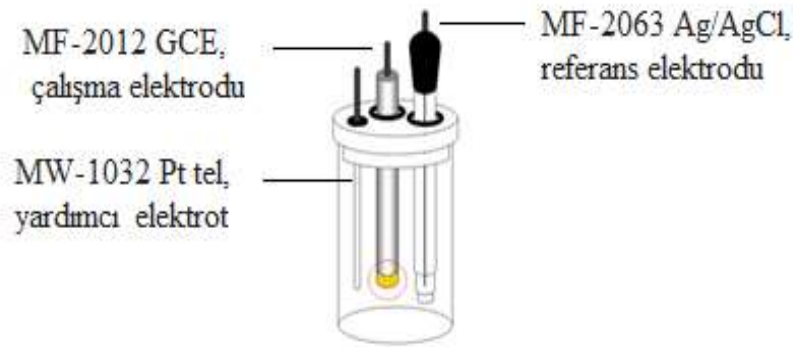
Şekil 3.1: BAS 100B elektrokimyasal analizör.

Bilgisayar program menüsü 28 farklı elektrokimyasal tekniğin seçilmesine ve bunların genel veya spesifik parametrelerinin çok hızlı bir şekilde değiştirilmesine imkan vermektedir. Analizör ayrıca elektrokimyasal hücre çözeltisinden gaz geçirilmesine veya çözeltinin karıştırılmasına yine kontrol yazılımı vasıtasıyla imkan vermektedir.

Çalışmada elektrokimyasal hücre, dış elektrik ve manyetik etkilerden yalıtımı sağlayan, (cell stand) içine yerleştirilmiş, C2 hücre kafesi kullanılmıştır.

Tüm elektrokimyasal deneyler; Şekil 3.2’de gösterilen özel olarak yaptırılmış, yaklaşık 10 mL hacimli pyrex cam hücre içinde gerçekleştirilmiştir. Gerek hücrelerin, gerekse diğer cam malzemelerin temizliği önce deterjan ile yapılmış distile su ile çalkalandıktan sonra en az bir saat olmak üzere tercihen bir gece 6 M HNO₃ çözeltisinde bekletildikten sonra en az üç kez distile su ile çalkalanıp etüvde kurutularak yapılmıştır.

Bu çalışmada MF-2012 GCE çalışma elektrodu, MF-2063 Ag/AgCl referans elektrodu ve MW-1032 Pt tel yardımcı elektrot kullanılmıştır.



Şekil 3.2: Yardımcı elektrot, çalışma elektrodu ve referans elektrottan oluşan voltametrik hücre.

pH ölçümleri için Thermo Scientific STAR A-111 pH-metre (Şekil 3.3) kullanılmıştır. pH metrenin kalibrasyonu sırasıyla pH=7 (Merck 4939) ve pH=4 (Merck 9475) tampon çözeltileriyle gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3: Thermo Scientific STAR A-111 pH-metre

Elektrotların tam olarak temizlenmesi ve çözeltilerin hazırlanması esnasında Branson marka 3510 model ultrasonik banyo (Şekil 3.4) kullanılmıştır.

Nüve marka EN 400 Model etüv (Şekil 3.4) tüm kimyasal maddelerin ve cam malzemelerin kurutulması için kullanılmıştır.



Şekil 3.4: Nüve marka EN 400 Model etüv, Branson marka 3510 model ultrasonik banyo.

Kern marka ABJ-NM/ABS-N model analitik terazi (Şekil 3.5) kimyasal maddelerin tartımı için kullanılmıştır.



Şekil 3.5: Kern marka ABJ-NM/ABS-N model terazi.

Çözeltilerin hazırlanması ve seyreltme işlemleri için kullanılmış olan su; Millipore marka Elix 20 model su sisteminden elde edilmiştir.

3.3 Elektrotlar

Yardımcı elektrot olarak platin tel elektrot (MW-1032), referans elektrot olarak 3 M KCl içindeki Ag/AgCl (MF-2063), elektrodu ve çalışma elektrodu olarak ise farklı polimerlerle modifiye edilmiş camsı karbon elektrotlar (GCE, MF-2012) kullanılmıştır.

3.3.1 Elektrotların temizliği

Referans elektrotlar distile su ile yıkanmış ve sürekli olarak 3 M KCl çözeltisi içinde saklanmıştır.

Yardımcı elektrot olarak kullanılan platin elektrotların temizliği, zaman zaman çıplak ateşte ısıtılarak veya 3 M HNO₃ çözeltisi içinde ultrasonik banyoda 1-2 dakika tutulduktan sonra ise distile su ile yıkanarak yapılmıştır.

Katı elektrotlarda, tekrar edilebilir sonuçların alınabilmesi için çalışma elektrotların yüzeyinin her ölçümden önce ön işleme tabi tutularak temizlenmesi gerekir. Ön işlem hem elektrotun cinsine, hem de deney çözeltisinin bileşimine bağlıdır. GCE yüzeyinde elektrokimyasal kaplamanın tekrar edilebilirliğinin sağlanması için her deneyden önce aynı yüzey halinin oluşturulması gerekmektedir. Deney öncesi GCE 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi içerisinde 15 çevrimli CV ile elektrokimyasal olarak temizlendi. Ayrıca mekaniksel temizleme de önce 1 µm, 0.3 µm ve 0.05 µm tanecik boyutuna sahip sulu alümina pastası ile kadife ped üzerinde "8" çizdirilecek şekilde temizlenip ultrosanik banyoda 5 dakika boyunca sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra ultra saf su ile yıkanıp optimum koşullarda kurutulmuştur.

3.4 DeneySEL Prosedürler

3.4.1 Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Florfenikol tayini için, TRİS ve PBS tamponu ve ayrıca Na₂SO₄, Na₂HPO₄, NaCl, LiCl, KNO₃, CH₃COONa tuzlarından oluşan çözeltiler hazırlanarak, deneylerde kullanılmıştır. Her biri 0.1 M derişimde olacak şekilde 250 mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır.

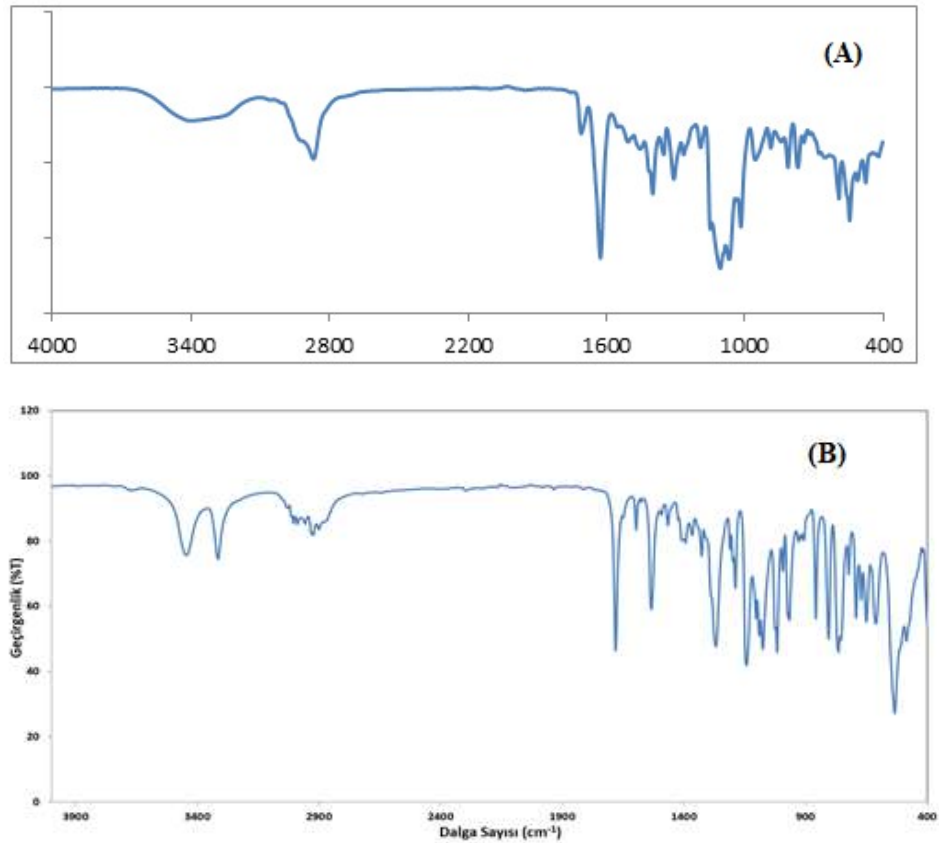
3.4.1.1 Florfenikol analiti çözeltisinin hazırlanması

4mM'lık Florfenikol stok çözeltisi; 0.0143 g florfenikol hassas teraziyle tartılıp 10 mL hem AcN ve hem de DMF içinde ayrı ayrı çözülerek hazırlanmıştır.

3.4.2 Florfenikolun saflaştırılması

Florfenikol antibiyotiği "Florkem" ilacının saflaştırılarak elde edildikten sonra kullanılmıştır. İlaça ait saflaştırılmadan önceki Şekil 3.6A'da ve saflaştırıldıktan sonraki FTIR spektrumları ise Şekil 3.6B'de gösterilmiştir. Suda çöken bu ilaç krema kıvamında bir görüntüye sahiptir. Bu nedenle kristallendirme işlemi yapıldıktan sonra uygun derişimde hazırlanan çözeltisi stok olarak kullanılmıştır. Kristallendirme işlemi;

1. Suyla krema kıvamına gelen florkem bir ayırma hunisine alınıp üzerine etil asetat ilave edilmiştir.
2. 5 dk çalkalyıcıda çalkalanmıştır. Bu esnanda gaz çıkışı gözlenmiştir.
3. Su içindeki florfenikol, etil asetat içinde çözünerek su ve etil asetat olmak üzere iki ayrı faz meydana gelmiştir.
4. Su fazı ayırma hunisinden ayrılmıştır.
5. Daha sonra etil asetat ayırma hunisinden alınmıştır.
6. Etil asetat üzerine kuru $MgSO_4$ eklenerek tamamen su fazından ayrılmıştır.
7. Karışım daha sonra süzgeç kağıdından süzölüp ve kalıntılar eterle yıkanmıştır.
8. Çözücünün fazlası kaynatılarak uzaklaştırılmıştır.
9. Sıcak çözelti oda koşullarında soğumaya (kristallendirilmeye) bırakılmıştır.
10. Kristaller büyük ve toz halinde olmak üzere ikiye ayrılmış olup, büyük kristaller alınarak kullanılmıştır.



Şekil 3.6: A) Saflaştırılmamış, B) Saflaştırılmış FF'ün FT-IR spektrumu.

3.4.3 Elektrotların modifikasyon

3.4.3.1 3- Metil tiyofen (3-MTF)

100 mM'lık 3-MTF monomer çözeltisini hazırlamak için; 72.46 μ L 3-metil tiyofen alınarak 0.1 M TBATFB içeren 5 mL AcN içinde hazırlandı. (-800)-(+1000) mV'luk potansiyel aralığında CV ile -'den +'ya doğru (yükseltgenme yönünde) ayrı ayrı 3 segment (polimerin yükseltgenmiş hali) ve 4 segment (polimerin indirgenmiş hali) seçilerek polimer kaplama işlemi gerçekleştirildi.

3.4.3.2 İndolin

20 mM'lık İndolin monomer çözeltisini hazırlamak için; 22.64 μ L indolin alınarak 0.1 M 10 mL PBS içinde hazırlandı. (-800)-(+1000) mV'luk potansiyel aralığında CV ile -'den +'ya doğru (yükseltgenme yönünde) ayrı ayrı 3 segment (polimerin yükseltgenmiş hali) ve 4 segment (polimerin indirgenmiş hali) seçilerek polimer kaplama işlemi gerçekleştirildi.

3.4.3.3 p-amino benzoik asit (PABA)

0.001 M'lık PABA monomer çözeltisini hazırlamak için; M_A 'sı 137.14 g/mol olan p-amino benzoik asitten 0.0007 g tartılarak 5 mL, 0.1 M PBS içinde çözülerek hazırlandı. Sonra CV ile (-800)-(+1000) mV potansiyel aralığında -'den +'ya doğru (yükseltgenme yönünde) ayrı ayrı 3 segment (polimerin yükseltgenmiş hali) ve 4 segment (polimerin indirgenmiş hali) seçilerek polimer kaplama işlemi gerçekleştirildi.

3.4.3.4 o-amino benzoik asit (OABA)

0.001 M'lık OABA monomer çözeltisini hazırlamak için; M_A 'sı 137.14 g/mol olan 2- amino benzoik asitten 0.0014 g tartılarak 10 mL PBS içinde çözülerek hazırlandı. (-800)-(+1000) mV'luk potansiyel aralığında CV ile -'den +'ya doğru (yükseltgenme yönünde) ayrı ayrı 3 segment (polimerin yükseltgenmiş hali) ve 4 segment (polimerin indirgenmiş hali) seçilerek polimer kaplama işlemi gerçekleştirildi.

3.4.3.5 Para toluen sülfonik asit

2 mM'lık para toluen sülfonik asit monomer çözeltisini hazırlamak için; 0.0034 g para toluen sülfonik asit alınarak 0.1 M 10 mL PBS içinde hazırlandı. (-800)-(+1000) mV'luk potansiyel aralığında CV ile -'den +'ya doğru (yükseltgenme yönünde) ayrı ayrı 3 segment (polimerin yükseltgenmiş hali) ve 4 segment (polimerin indirgenmiş hali) seçilerek polimer kaplama işlemi gerçekleştirildi.

3.4.3.6 4-vinil piridin (4-VP)

0.005 M'lık 4-vinil piridin monomer çözeltisini hazırlamak için; 5.34 μ L 4- Vinil piridin alınarak 0.1 M TBATFB içeren 10 mL AcN içinde hazırlandı. (-800)-(+1000) mV'luk potansiyel aralığında CV ile -'den +'ya doğru (yükseltgenme yönünde) ayrı ayrı 3 segment (polimerin yükseltgenmiş hali) ve 4 segment (polimerin indirgenmiş hali) seçilerek polimer kaplama işlemi gerçekleştirildi.

3.4.3.7 4-hidroksi benzaldehit (4-HBA)

100 mM'lık 4-hidroksibenzaldehit monomer çözeltisini hazırlamak için; 0.0611 g 4-HBA alınarak 0.1 M TBATFB içeren 5 mL AcN içinde polimerleştirildi. (-800)-(+1000) mV'luk potansiyel aralığında CV ile -'den +'ya doğru (yükseltgenme yönünde) ayrı ayrı 3 segment (polimerin yükseltgenmiş hali) ve 4 segment (polimerin indirgenmiş hali) seçilerek polimer kaplama işlemi gerçekleştirildi.

3.4.4 3-MTF'nin yükseltgenme potansiyelinin tespiti

Monomer çözeltisi, 3-MTF içeren TBATFB'nin AcN'de çözülmesiyle hazırlandı. 3-MTF'nin polimerizasyonu, CV tekniği ile çıplak GCE üzerinde Tetrabutylamonyum tetrafloroborat (TBATFB) varlığında asetonitril (AcN) içerisinde gerçekleştirildi. CV ile modifiye edilmiş GC elektrotlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

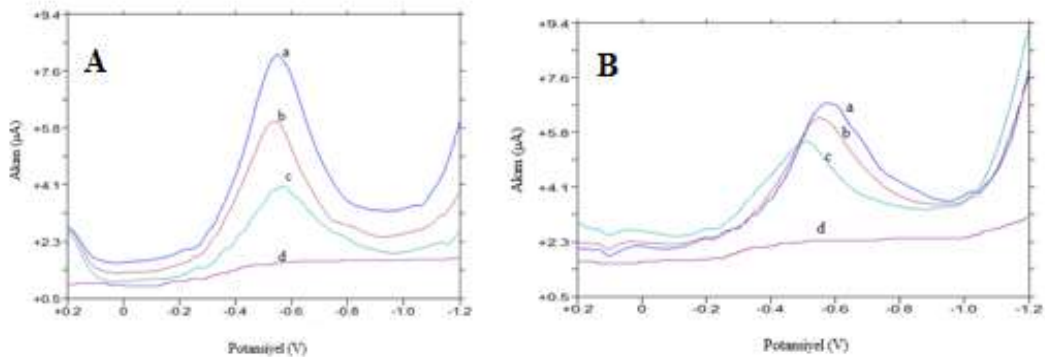
4.1. Florfenikol Tayini İçin Optimizasyonlar

4.1.1 Florfenikolün İndirgenme Potansiyelinin Belirlenmesi

Çalışma elektrodu olarak çıplak ve polimer kaplı GCE kullanılarak PBS (pH=7.00) tamponu içinde (0.2)-(-1.2) V potansiyel aralığında florfenikolün diferansiyel puls voltamogramları alınmıştır.

4.1.2 Florfenikol için Çözgen Türünün Belirlenmesi

Elektrolit olarak pH=7.00 olan 0.1 M PBS tampon çözeltisi kullanılmıştır. Florfenikolün hangi ortamda daha iyi çözündüğünü belirlemek için AcN ve DMF çözgenleri içerisinde 4 mM Florfenikol stok çözeltileri hazırlanmış ve 5 mL PBS üzerine bu çözeltiden alınan 700, 1400 ve 2100 μ L'lik hacimler eklenerek DPV'leri alınmıştır (Şekil 4.1). Çözgen olarak Şekil 4.1(A) AcN, Şekil 4.1(B) de ise DMF kullanılmıştır. Elde edilen voltamogramlarda görüldüğü üzere; Şekil 4.1(A) da elde edilen pik akım değeri, Şekil 4.1(B) de elde edilen pik akım değerinden büyüktür. Bundan dolayı AcN içerisinde FF ün daha iyi çözündüğü anlaşılmış, çözgen olarak tercih edilmiştir.



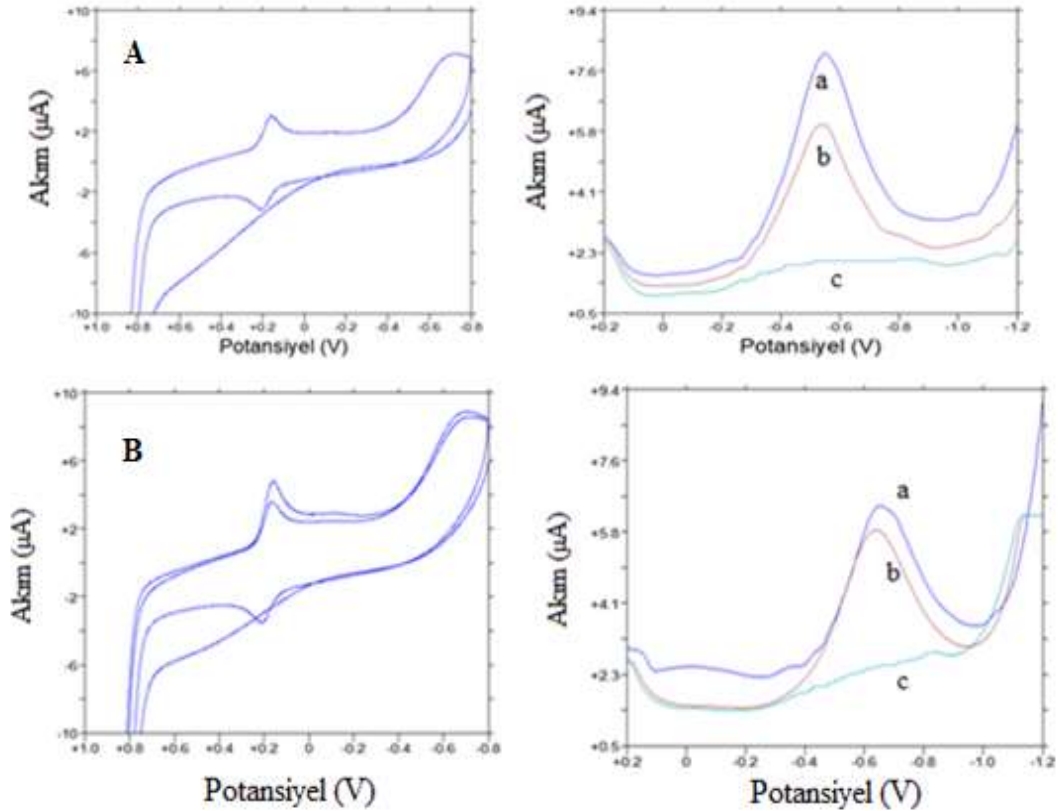
Şekil 4.1: PABA modifiye GCE üzerinde **A)** AcN, **B)** DMF içinde çözünürleştirilmiş farklı derişimlerdeki FF'ün **a:** 1.183 mM, **b:** 0.875 mM, **c:** 0.491 mM ve **d:** PBS) DPV'si.

4.1.3 Monomer seçimi

Florfenikol tayininde kullanılacak polimer için öncelikle 4 mM'lık Florfenikol çözeltisi, 0.0143 g florfenikol tartılarak, 10 mL AcN içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hangi polimerde daha iyi sonuç verdiğini belirlemek amacıyla derişimleri birbirinden farklı 7 polimer hazırlanmıştır. Her bir monomerin hazırlanışı ile elde edilen CV ve polimer elektrot üzerindeki FF'e ait DPV voltamogramları Şekil 4.2-Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

4.1.3.1 PABA (p-amino benzoik asit)

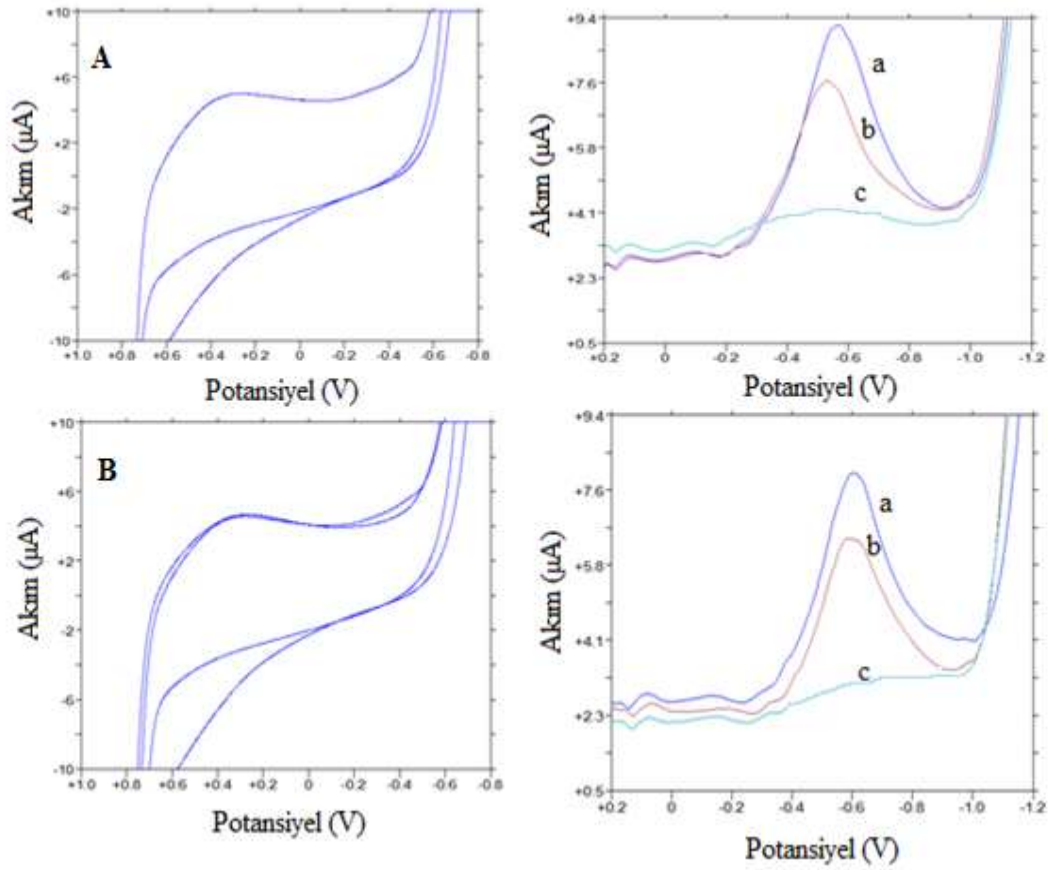
0.001 M'lık PABA monomer çözeltisini hazırlamak için; M_A 'sı 137.14 g/mol olan p-amino benzoik asitten 0.0007 g tartılarak 5 mL, 0.1 M PBS içinde çözülerek hazırlandı. Sonra CV ile (-800)-(+1000) mV potansiyel aralığında -'den +'ya doğru 3 ve 4 segmentlik olarak ayrı ayrı kaplama yapılmıştır. Ardından zemin çözeltisi olan PBS'nin ve iki farklı derişimdeki FF çözeltisinin DPV'leri alınmıştır.



Şekil 4.2: A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik PABA CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.

4.1.3.2 4-HBA (4-hidroksi benzaldehit)

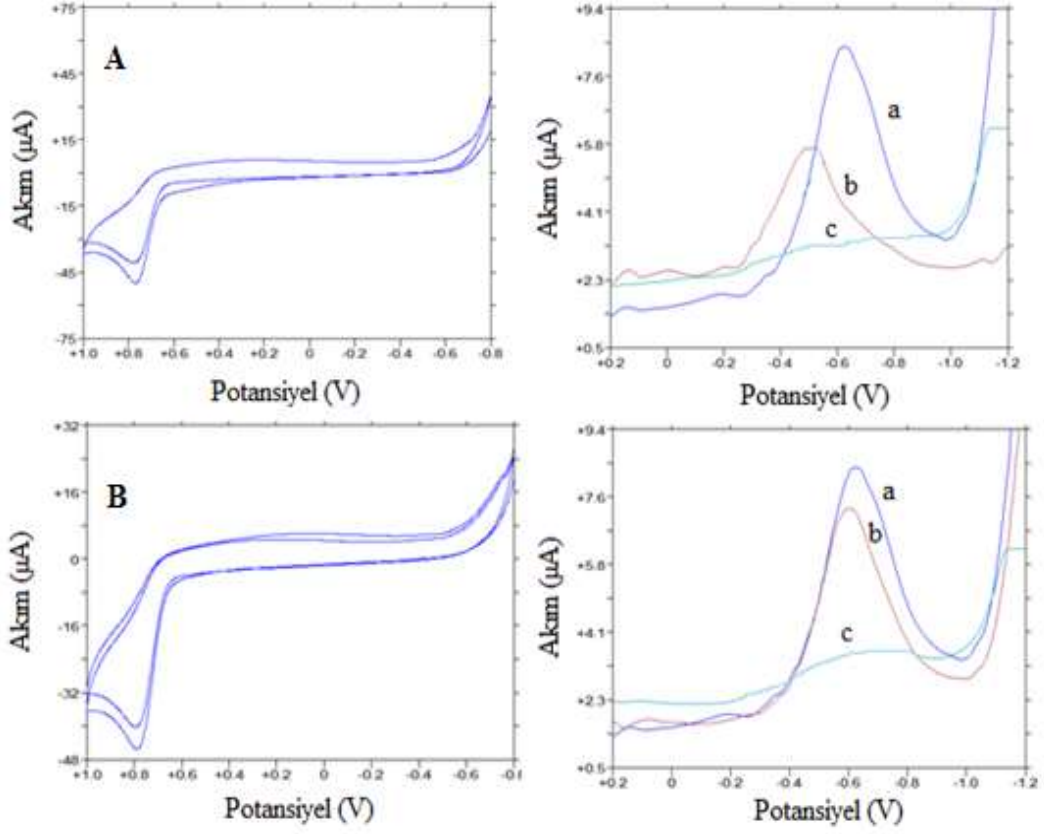
100 mM'lık 4-hidroksibenzaldehit monomer çözeltisini hazırlamak için; 0.062 g 4-HBA alınarak 0.1 M TBATFB içeren 5 mL AcN içinde hazırlandı. (-800)-(+1000) mV potansiyel aralığında CV ile -'den +'ya doğru 3 ve 4 segmentlik olarak ayrı ayrı kaplama yapılmıştır. Ardından zemin çözeltisi olan PBS'nin ve iki farklı derişimdeki FF çözeltisinin DPV'leri alınmıştır.



Şekil 4.3: A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik 4-HBA CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.

4.1.3.3 3-MTF (3-metil tiyofen)

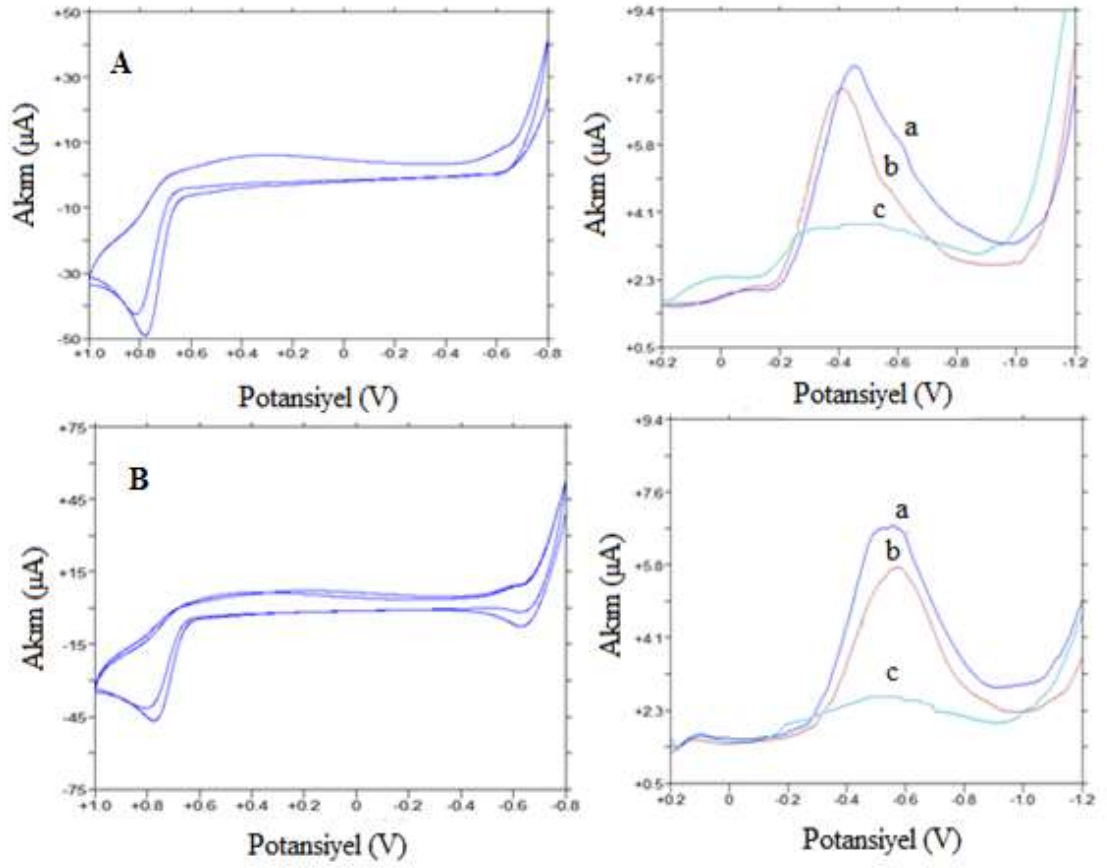
100 mM'lık 3-MTF monomer çözeltisini hazırlamak için; 72.46 μL 3-metil tiyofen alınarak 0.1 M TBATFB içeren 5 mL AcN içinde hazırlanmıştır. Daha sonra CV ile (-800)-(+1000) mV potansiyel aralığında -'den +'ya doğru 3 ve 4 segmentlik olarak ayrı ayrı kaplama yapılmış, ardından zemin çözeltisi olan PBS'nin ve iki farklı derişimdeki FF çözeltisinin DPV'leri alınmıştır.



Şekil 4.4: A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik 3-MTF CV ile modifiye GCE üzerinde **a:** 0.875 mM, **b:** 0.491 mM FF ve **c:** PBS DPV yanıtları.

4.1.3.4 4-VP (4-Vinil Piridin)

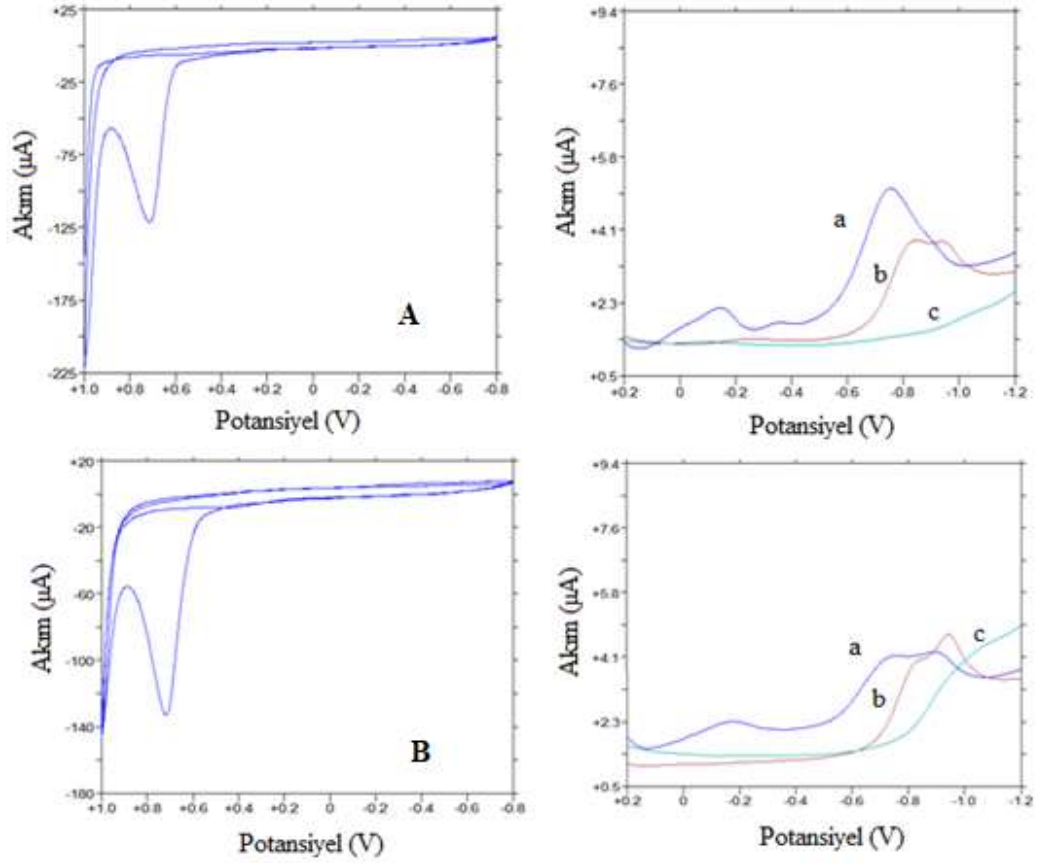
0.005 M'lık 4-vinil piridin monomer çözeltisini hazırlamak için; 5.34 μL 4- Vinil piridin alınarak 0.1 M TBATFB içeren 10 mL AcN içinde hazırlanmıştır. Daha sonra CV ile (-800)-(+1000) mV potansiyel aralığında -'den +'ya doğru 3 ve 4 segmentlik olarak ayrı ayrı kaplama yapılmış, ardından hazırlanan bu modifiye elektrot üzerinde zemin çözeltisi olan PBS'nin ve iki farklı derişimdeki FF çözeltisinin DPV'leri alınmıştır.



Şekil 4.5: A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik 4-VP CV ile modifiye GCE üzerinde **a:** 0.875 mM, **b:** 0.491 mM FF ve **c:** PBS DPV yanıtları.

4.1.3.5 İndolin

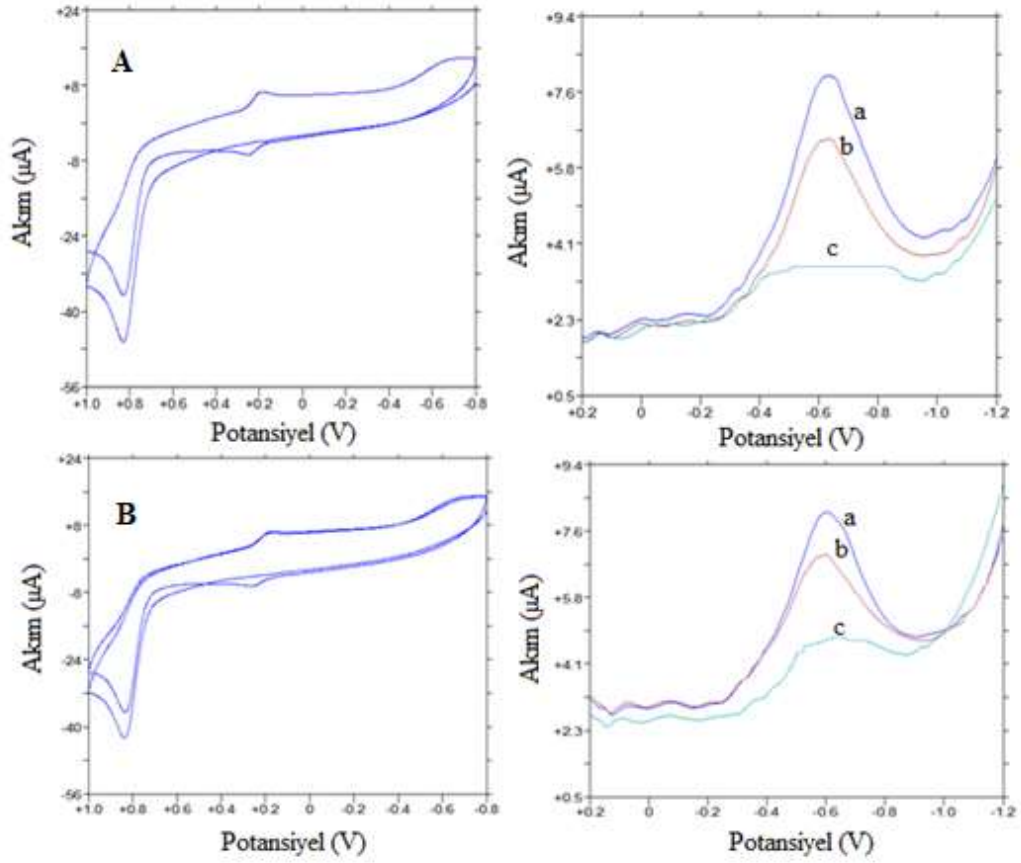
20 mM'lık indolin monomer çözeltisini hazırlamak için; 22.64 μL indolin alınarak 0.1 M 10 mL PBS içinde hazırlanmıştır. Daha sonra CV ile (-800)-(+1000) mV potansiyel aralığında -'den +'ya doğru 3 ve 4 segmentlik olarak ayrı ayrı kaplama yapılmış, ardından hazırlanan bu modifiye elektrot üzerinde zemin çözeltisi olan PBS'nin ve iki farklı derişimdeki FF çözeltisinin DPV'leri alınmıştır.



Şekil 4.6: A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik İndolin CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF c: PBS DPV yanıtları.

4.1.3.6 OABA (o-amino benzoik asit)

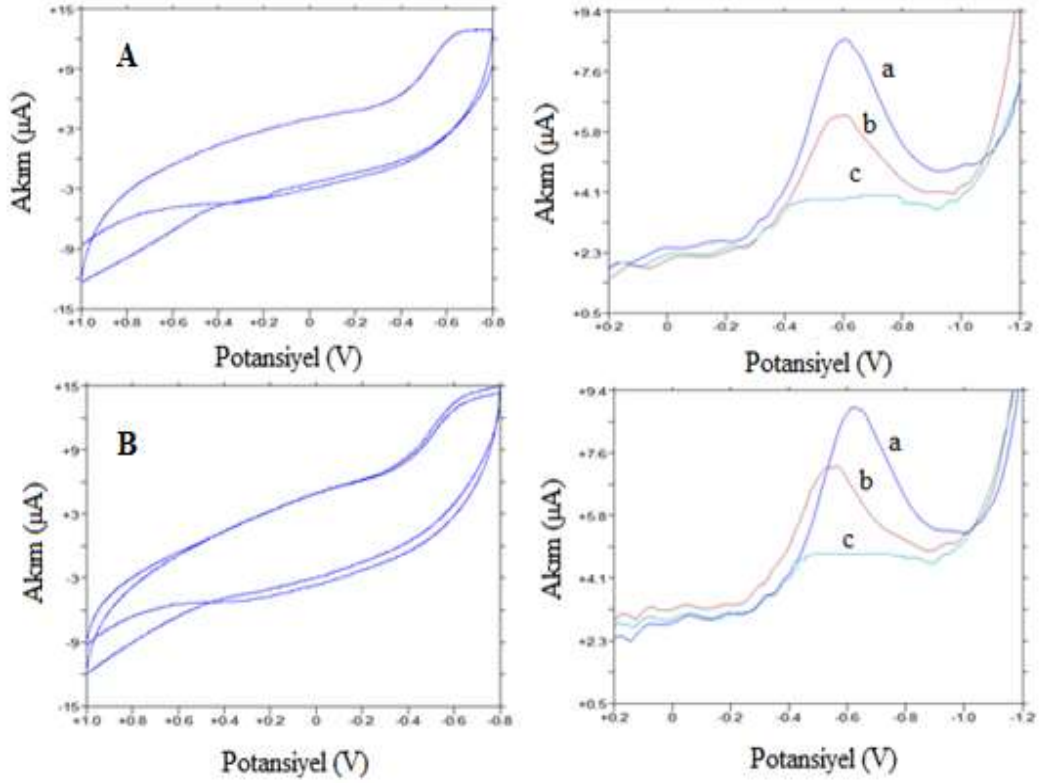
0.001 M'lık OABA monomer çözeltisini hazırlamak için; M_A 'sı 137.14 g/ mol olan 2- amino benzoik asitten 0.0014 g tartılarak 0,1 M 10 mL PBS içinde çözülerek hazırlanmıştır. Daha sonra CV ile (-800)-(+1000) mV potansiyel aralığında -'den +'ya doğru 3 ve 4 segmentlik olarak ayrı ayrı kaplama yapılmış, ardından hazırlanan bu modifiye elektrot üzerinde zemin çözeltisi olan PBS'nin ve iki farklı derişimdeki FF çözeltisinin DPV'leri alınmıştır.



Şekil 4.7: A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik OABA CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.

4.1.3.7 Paratoluen sülfonik asit

2 mM'lık para tolueen sülfonik asit monomer çözeltisini hazırlamak için; 0.0034 g para tolueen sülfonik asit alınarak 0.1 M 10 mL PBS içinde hazırlanmıştır. Daha sonra CV ile (-800)-(+1000) mV potansiyel aralığında -'den +'ya doğru 3 ve 4 segmentlik olarak ayrı ayrı kaplama yapılmış, ardından hazırlanan bu modifiye elektrot üzerinde zemin çözeltisi olan PBS'nin ve iki farklı derişimdeki FF çözeltisinin DPV'leri alınmıştır.



Şekil 4.8: A) 3 segmentlik ve B) 4 segmentlik paratoluen sülfonik asit CV ile modifiye GCE üzerinde a: 0.875 mM, b: 0.491 mM FF ve c: PBS DPV yanıtları.

Bulunan CV ve DPV verilerine göre uygun polimerin 100 mM'lık 3-MTF olduğu görülmüştür bundan sonraki çalışmalarımızda 4 segmentlik 3-MTF kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2. Polimer oluşumu parametreleri

4.2.1 Florfenikol tayininde kullanılacak elektrolit seçimi

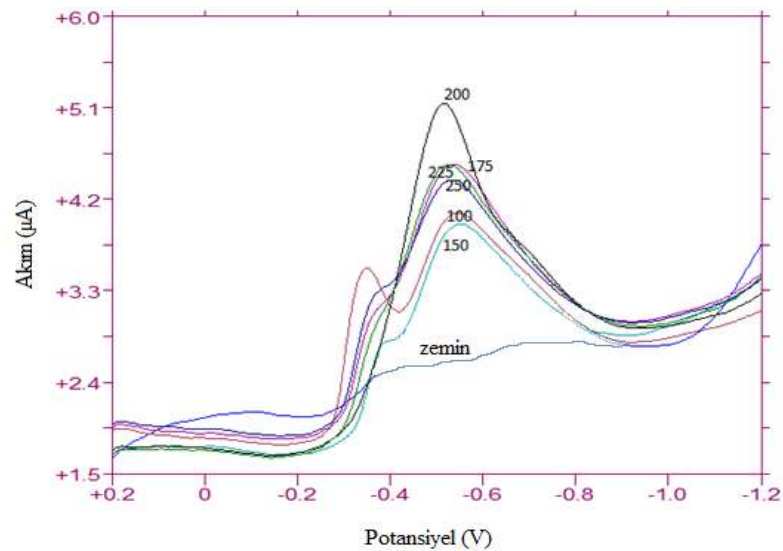
Florfenikol tayininde kullanılacak elektrolit seçiminde hepsi 0.1 M derişimde olan Tris, Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , PBS, NaCl, NaClO_4 , KNO_3 , CH_3COONa elektrolitleri kullanılmıştır. Her bir elektrolit içinde öncelikle çıplak GCE üzerinde, daha sonra elektrot 3-MTF kaplı GCE üzerinde, son olarak da poli-3-MTF kaplı elektrot üzerinde 0.491 mM FF'ün DPV sinyalleri alınmıştır. Elde edilen verilere göre en uygun elektrolitin Na_2SO_4 olduğuna karar verilmiştir.

4.2.2 Monomer derişimi

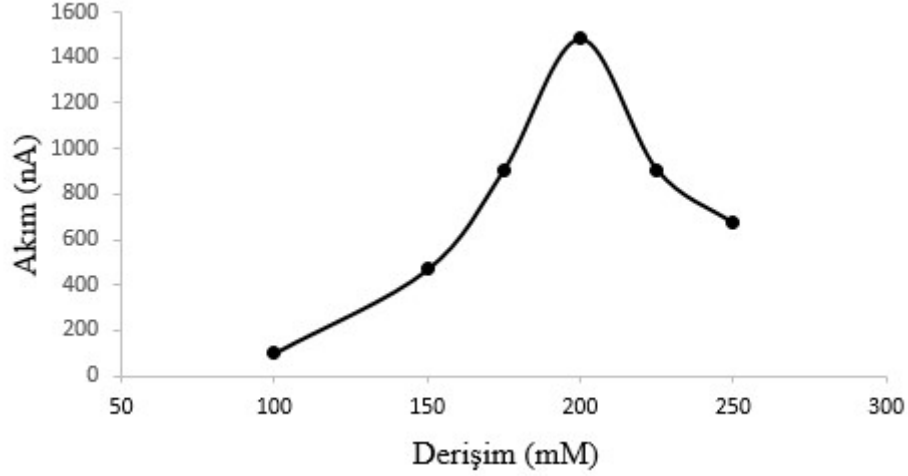
Uygun monomer derişimi için 150, 175, 200, 225 ve 250 mM'lık 3-MTF çözeltileri hazırlandı ve 0.491 mM FF özeltisi içinde DPV'lerine bakıldı. Elde edilen voltamogramlar şekil 4.9'da, E_p - $\dot{I}_p$ değerleri izelge 4.1'de ve derişim-akım ilişkisi grafiği ise şekil 4.10'da verilmiştir. Sonuçlara göre en uygun derişimin 200 mM olduğu anlaşılmıştır. Daha sonraki çalışmalarımızda 200 mM 3-MTF ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.1: Polimer derişimini belirlemek için alınan voltamogramlardan elde edilen $\dot{I}_p$ değerleri.

Polimer Derişimi (mM)	E_p (mV)	$\dot{I}_p$ (μ A)	Net $\dot{I}_p$ (μ A)
Zemin	-580	1.241	
100	-540	1.342	0.101
150	-540	1.710	0.469
175	-528	2.149	0.908
200	-512	2.723	1.482
225	-516	2.149	0.908
250	-524	1.914	0.673



şekil 4.9: 150, 175, 200, 225 ve 250 mM 3-MTF modifiye GCE üzerinde 0.1 M Na_2SO_4 içinde 0.491 mM FF'n DPV voltamogramları.



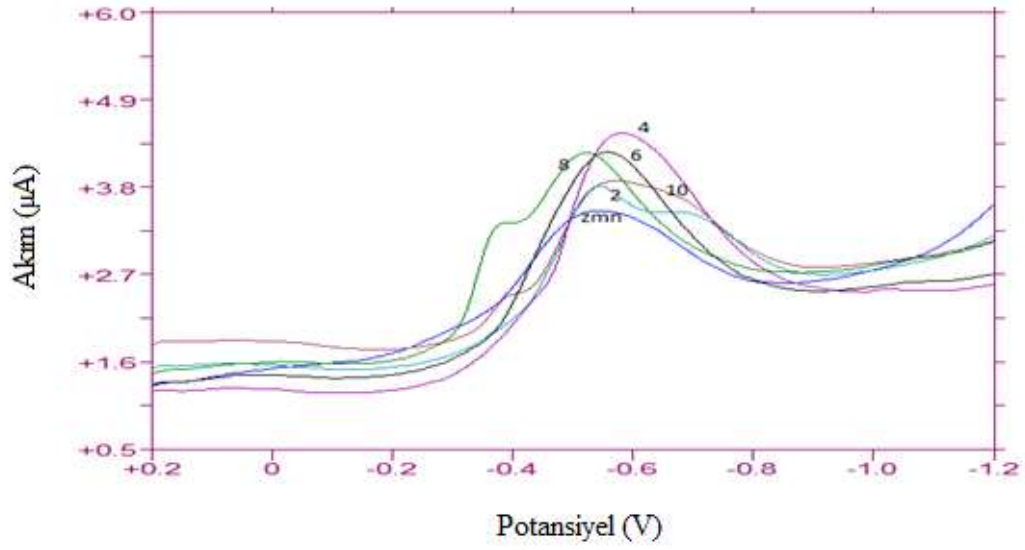
Şekil 4.10: 3-MTF derişimi- $\dot{I}_p$ ilişkisi.

4.2.3 Polimer kalınlığı

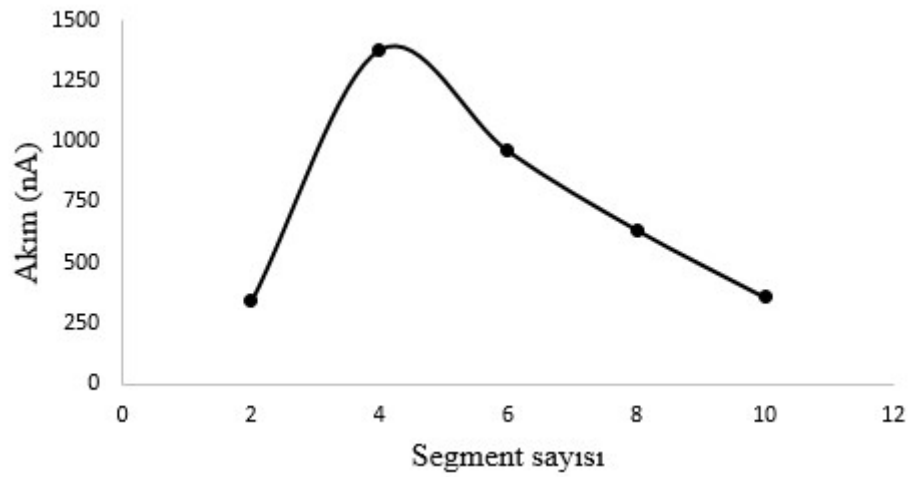
0.491 mM FF Na₂SO₄ elektroliti içinde 200 mM 3-MTF'in AcN içinde modifiye edilmiş GCE üzerinde polimer kalınlığı 2, 4, 6, 8 ve 10 segment olarak çalışılmıştır. Çalışma kapsamında uygun polimer kalınlığının 4 segment olduğu belirlenmiştir. Elde edilen voltamogram Şekil 4.11'de, E_p - $\dot{I}_p$ değerleri Çizelge 4.2'de ve film kalınlığı-pik akımı ilişkisi grafiği ise Şekil 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.2: Polimer kalınlığını belirlemek için alınan voltamogramlardan elde edilen $\dot{I}_p$ değerleri.

Polimer Kalınlığı	E_p (mV)	$\dot{I}_p$ (μ A)	Net $\dot{I}_p$ (μ A)
Zemin	-528	1.346	
2 segment	-516	1.687	0.341
4 segment	-512	2.723	1.377
6 segment	-540	2.306	0.960
8 segment	-548	1.982	0.636
10 segment	-552	1.704	0.358



Şekil 4.11: Na_2SO_4 elektroliti içinde 3- MTF modifiye GCE üzerinde 2, 4, 6, 8 ve 10 segmentlik 0.491 mM FF'ün DPV voltamogramları.



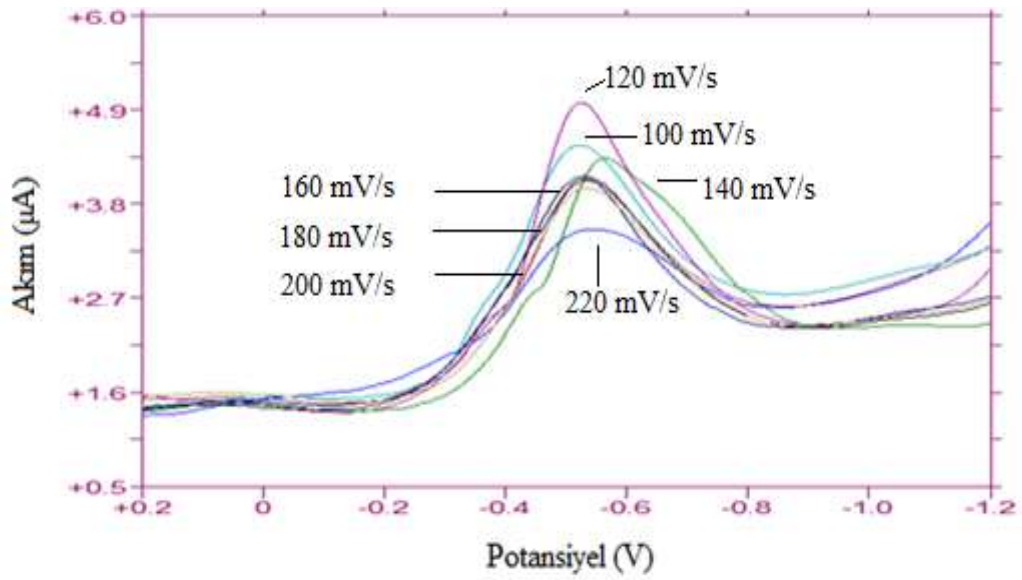
Şekil 4.12: 3-MTF film kalınlığı- I_p ilişkisi.

4.2.4 Polimer tarama hızı

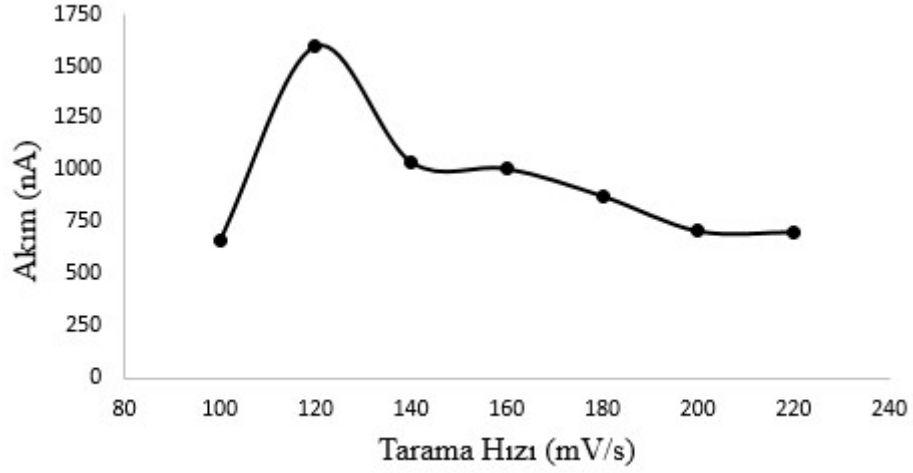
200 mM derişimli 3-MTF'in AcN içindeki çözeltisinde GCE üzerinde 4 segmentlik elektropolimer oluşumu esnasında farklı tarama hızları (100, 120, 140, 160, 180, 200 ve 220 mV/s) kullanılarak 0.491 mM FF içeren Na_2SO_4 elektroliti içinde DPV'leri alınmıştır. Voltamogramlar incelendiğinde en uygun tarama hızının 120 mV/s olduğu görülmüştür. Elde edilen voltamogram Şekil 4.13'de, E_p - I_p değerleri Çizelge 4.3'de ve tarama hızı-akım ilişkisi grafiğı ise Şekil 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4.3: Polimer tarama hızlarına karşılık gelen $\dot{I}_p$ değerleri.

Polimer Tarama Hızı (mV/s)	E_p (mV)	$\dot{I}_p$ (μA)	Net $\dot{I}_p$ (μA)
Zemin	-528	1.346	
100	-528	2.004	0.658
120	-524	2.946	1.600
140	-516	2.355	1.041
160	-524	2.222	1.009
180	-560	2.387	0.876
200	-528	2.163	0.707
220	-528	2.053	0.703



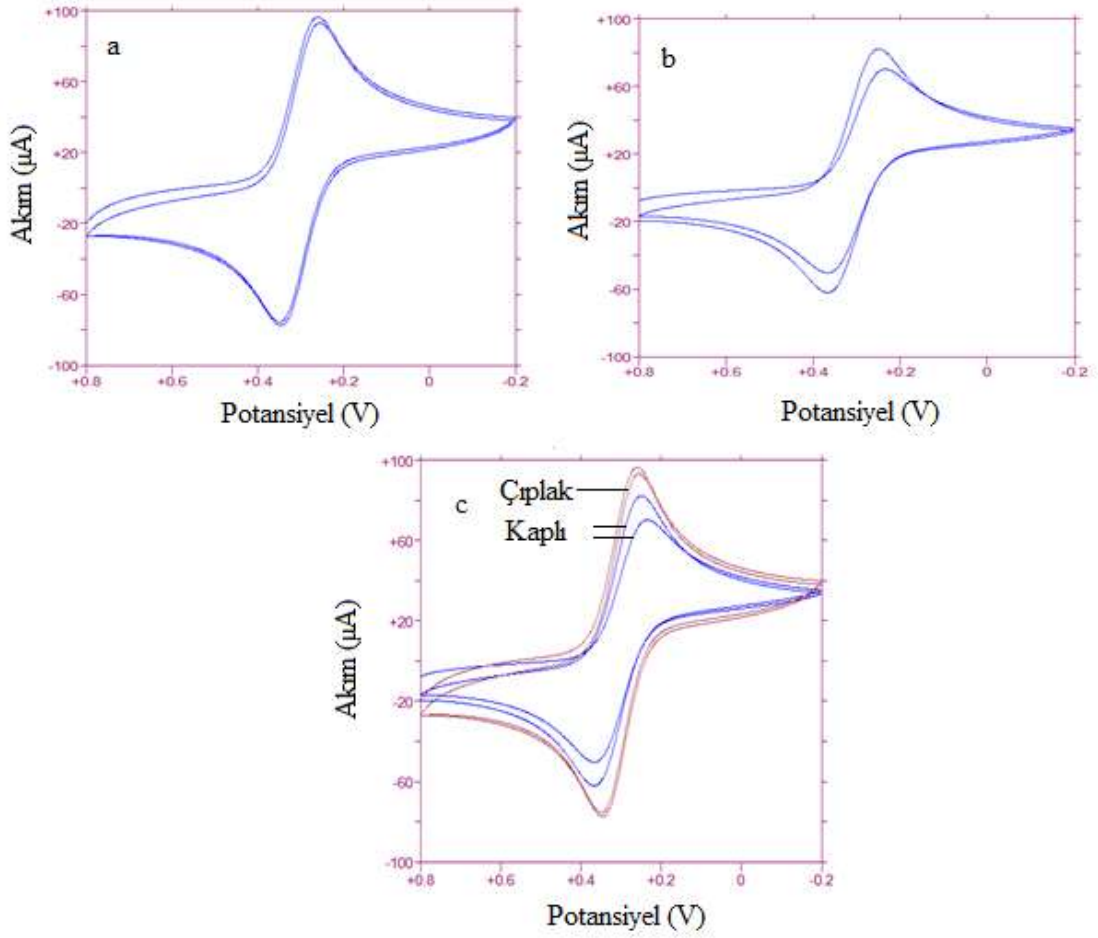
Şekil 4.13: Na_2SO_4 elektroliti içinde 3-MTF modifiye GCE üzerinde 100, 120, 140, 160, 180, 200 ve 220 mV/s tarama hızlarında 0.491 mM FF'ün DPV voltamogramları.



Şekil 4.14: Polimer oluşum tarama hızı- I_p ilişkisi.

4.2.5 Elektrokatalitik aktivite

200 mM 3-MTF'in AcN ortamında, 4 segment kalınlığında, 120 mV/s tarama hızı ile gerçekleştirilmiş poli 3-MTF modifiye GCE elektrodun elektrokatalitik aktivitesi; 6 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 'ün 1 M KNO_3 içinde (800)-(-200) mV potansiyel aralığında CV metodu kullanılarak çalışıldı (Şekil 4.15). Şekilden görüldüğü gibi poli 3-MTF modifiye elektrot CV pikleri tersinir olduğundan dolayı kararlıdır. Sonuçlar göstermiştir ki kolayca hazırlanmış olan modifiye edilmiş elektrodun elektrokatalitik aktivitesi (Şekil 4.15b) çıplak GCE'un aktivitesi (Şekil 4.15a) ile kıyaslandığında (Şekil 4.15c) oldukça iyi elektrokatalitik aktivite sergilediği anlaşılmıştır.



Şekil 4.15: 6 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 'ün 1 M KNO_3 içindeki **a)** Çıplak GCE, **b)** Modifiye GCE **c)** Çıplak ve Modifiye GCE'nin üst üste dönüşümlü voltamogramları.

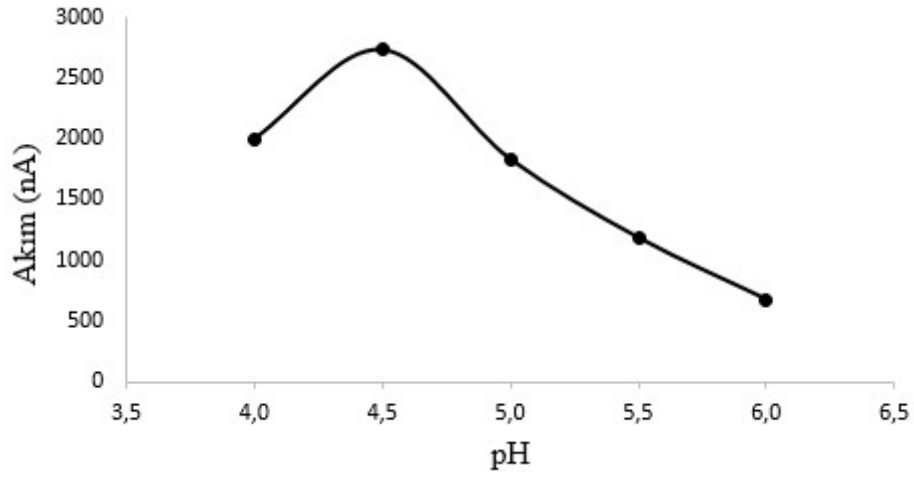
4.3 FF Analiz Parametrelerinin Optimizasyonu

4.3.1 Elektrolit pH etkisi

Başlangıçtaki çalışmalarda en uygun elektrolit türü Na_2SO_4 olarak belirlenmiştir. Na_2SO_4 elektrolitinin pH'sı, 0.491 mM FF içeren ortamda, optimum koşullarda (4 segment kalınlığında, 200 mM 3-MTFderişiminde, 120 mV/s polimer tarama hızında) elde edilmiş olan poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde 4.00, 4.50, 5.00 ve 5.50 pH değerlerinde çalışılmış ve Şekil 4.16'dan en uygun elektrolit pH'sının 4.50 olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen voltamogramlardan okunan E_p - I_p değerleri Çizelge 4.4'de ve elektrolit pH'sı-pik akımı ilişkisi eğrisi Şekil 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.4: Na₂SO₄ elektrolitinin pH'sına karşılık gelen E_p ve İ_p değerleri.

Elektrolit pH	E _p (mV)	İ _p (µA)	Net İ _p (µA)
Zemin	-616	1.553	
4.00	-504	3.551	1.998
4.50	-492	4.292	2.739
5.00	-524	3.388	1.835
5.50	-568	2.739	1.186
6.00	-544	2.228	0.675



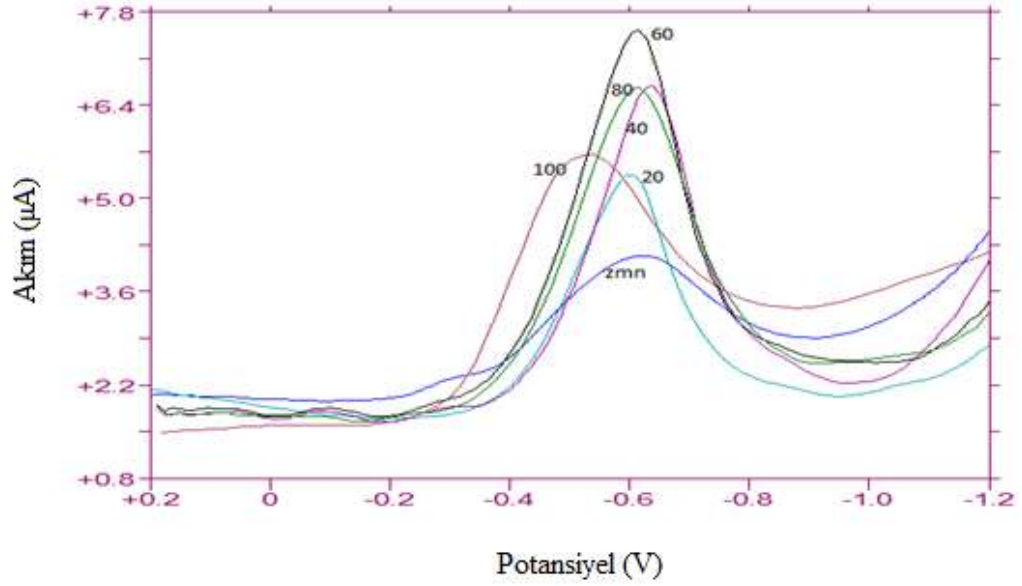
Şekil 4.16: Na₂SO₄ elektroliti pH-İ_p ilişkisi.

4.3.2 Tarama hızı etkisi

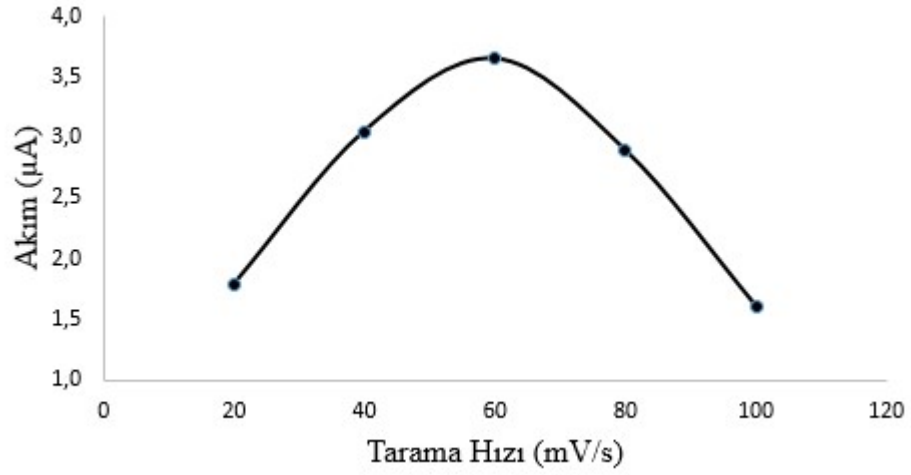
0.491 mM FF içeren pH 4.50 Na₂SO₄ elektroliti içinde optimum koşullarda elde edilmiş olan poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde elektrolit tarama hızı 20, 40, 60, 80, 100 mV/s değerlerinde çalışılmış Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'dan en uygun tarama hızı 60 mV/s olarak belirlenmiştir. Elde edilen voltamogramlardan elde edilmiş olan E_p ve İ_p değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5: Na₂SO₄ elektrolitinin tarama hızına karşılık gelen E_p ve İ_p değerleri.

Elektrolitin Tarama Hızı (mV/s)	E_p (mV)	İ_p (μA)	Net İ_p (μA)
Zemin	-616	1.553	
20	-600	3.339	1.786
40	-628	4.601	3.048
60	-616	5.200	3.647
80	-616	4.447	2.894
100	-520	3.164	1.611



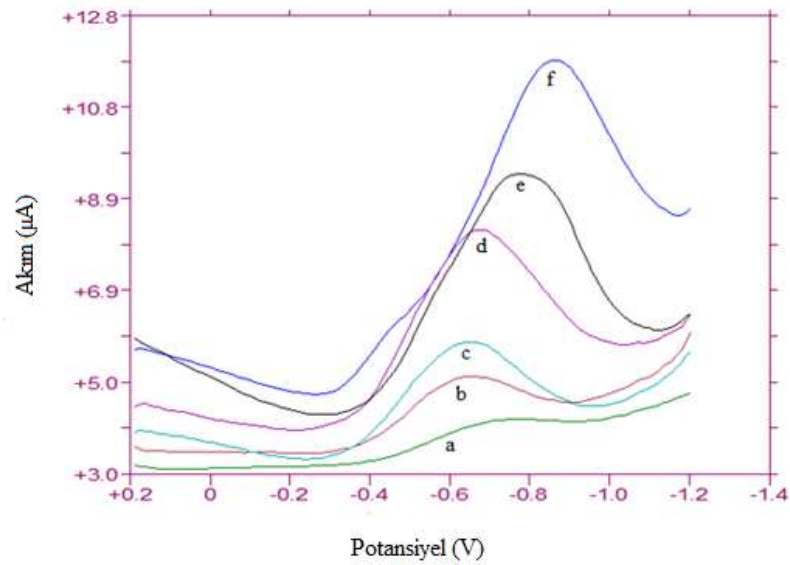
Şekil 4.17: Na₂SO₄ (pH 4.50) elektroliti içinde 3- MTF modifiye GCE üzerinde 20, 40, 60, 80, 100 mV/s tarama hızlarında 0.491 mM FF'ün DPV voltamogramları.



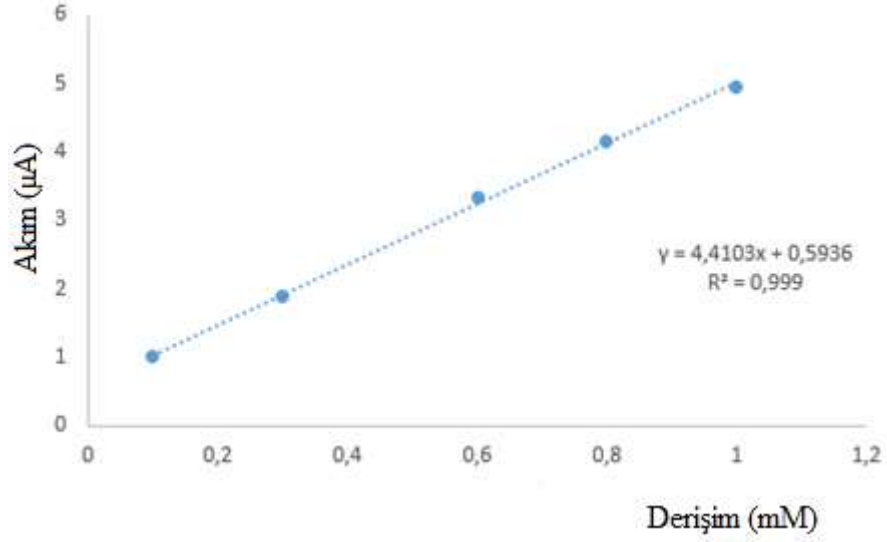
Şekil 4.18: 0.491 mM FF'ün 3-MTF modifiye GCE üzerinde DPV tarama hızı- I_p ilişkisi.

4.4 FF Tayini için Kalibrasyon Eğrileri ve Tayin Sınırı

3-MTF modifiye GCE üzerinde 0.1 M Na_2SO_4 elektroliti içinde 0.1, 0.3, 0.6, 0.8 ve 1.0 mM FF'e ait DPV'ler Şekil 4.19'da verilmiştir. Ayrıca 0.1-1 mM FF derişim aralığında elde edilen veriler ışığında oluşturulan kalibrasyon grafiğı doğru denklemi, $y=4.4103x+0.5936$, ve doğrusallığı, $R^2=0.999$ olarak, hesaplanmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.19: 3-MTF modifiye GCE üzerinde 0.1 M Na_2SO_4 elektroliti içinde **a:**0.1, **b:** 0.3, **c:** 0.6, **d:**0.8 ve **e:**1.0 mM FF'e ait DPV'ler.

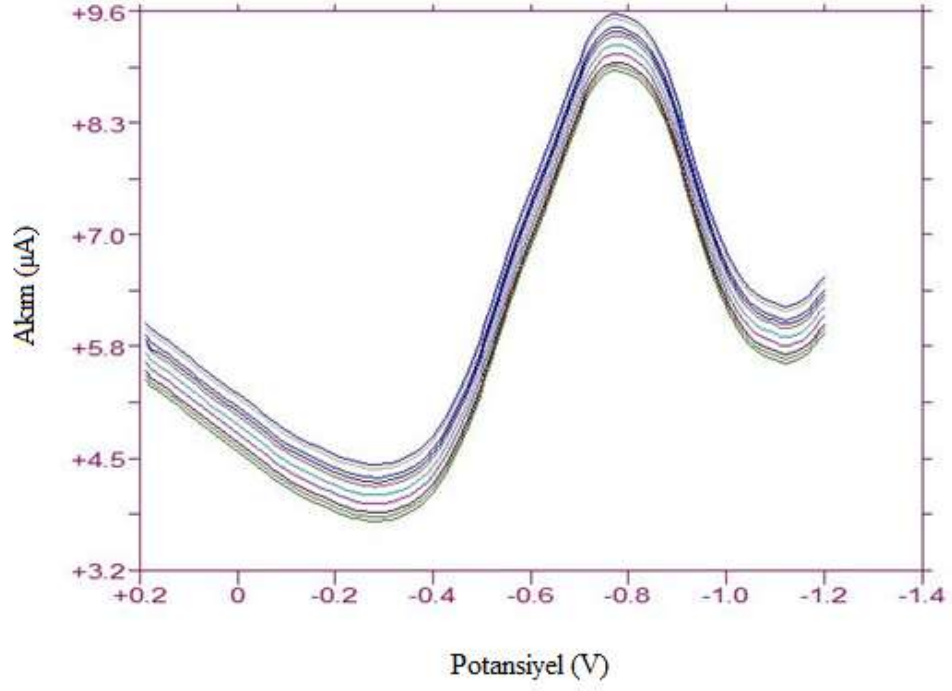


Şekil 4.20: 0.1-1.0 mM FF derişimi için elde edilen kalibrasyon grafiğı.

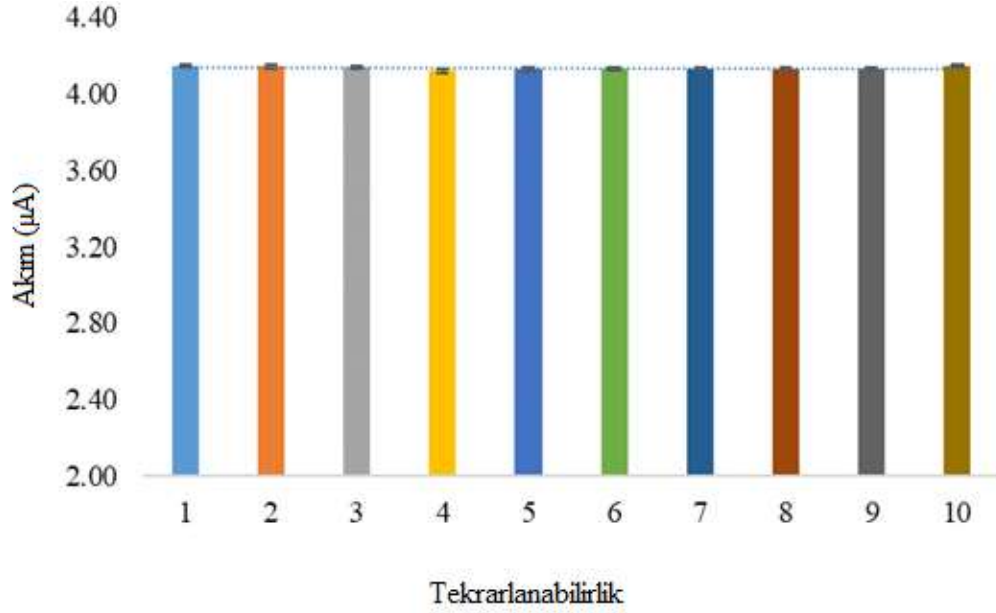
FF'nin yukarıda belirtilen optimum koşullarda elde edilmiş FF'nin 0.1-1.0 mM aralığındaki DPV sinyalleri pik akımı-derişim kalibrasyon grafiğından yararlanarak hesaplanan 0.0399 mM tayin sınırı (LOD), kantitasyon tayin sınırı (LOQ) 0.1197 mM ve 0.999 korelasyon katsayısı (R^2) değerleri hazırlanmış olan elektrokimyasal sensörün amaca uygun olduğı anlaşılmıştır. Be sensörün geliştirilme amacının FF kalıntı değerlerini ölçebilmek olmasından ötürü doğrusal aralığıın daha yüksek değerlere kadar çalışılmasına gerek görülmemiştir. Gerçek örneklerde çok yüksek değerlere ulaşabilen FF derişimi sözkonusu olsa bile bu durum seyreltme işlemleriyle kalibrasyon aralığıında çalışılmasına imkan verebilecektir.

4.5 Tekrarlanabilirlik

Belirlenmiş olan optimum koşullarda hazırlanmış 10 farklı modifiye elektrot üzerinde 0.6 mM FF'ün DPV'leri üçer kez tekrarlanarak alınmıştır. Şekil 4.21'de verilen tekrarlanabilirliğı gösteren voltamogramlar ve Şekil 4.22'de verilen grafikten standart sapma 0.008 ve % bağıl standart sapma 0.844 hesaplanmıştır. Bu değerler göz önüne alındığında, yöntemin tekrarlanabilir, son derece kararlı ve son derece duyarlı (% 99,2) olduğı kanıtlanmıştır.



Şekil 4.21: Poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde 0.6 mM FF'ün DPV'leri (n=10).

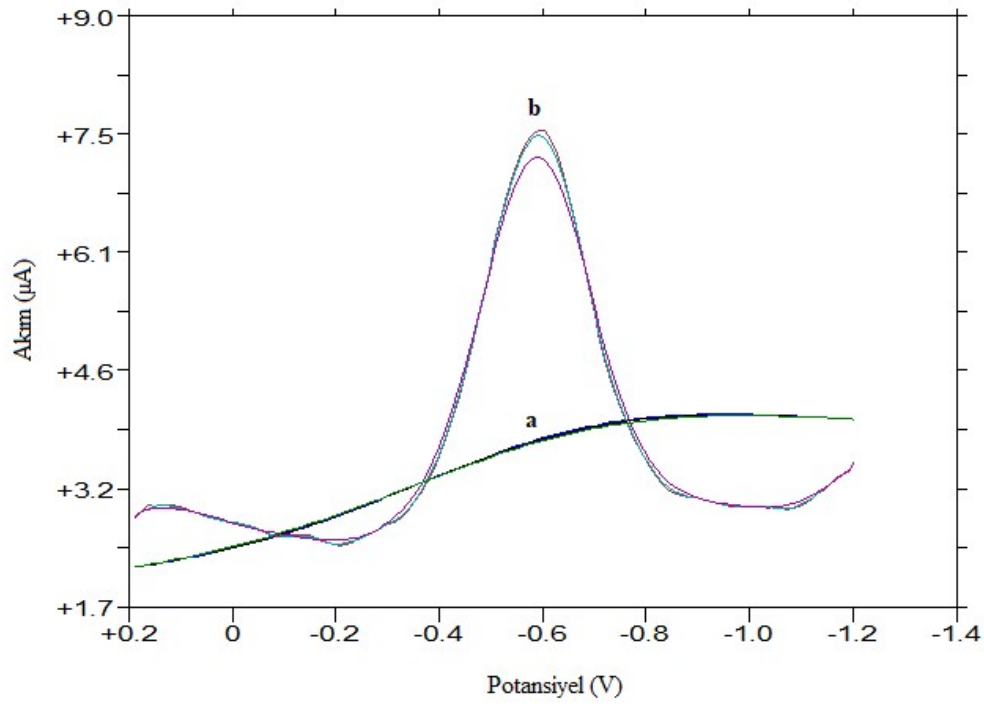


Şekil 4.22: 0.6 mM FF'ün poli 3-MTF GCE üzerindeki voltamogramlarına ait hata grafiği (n=10).

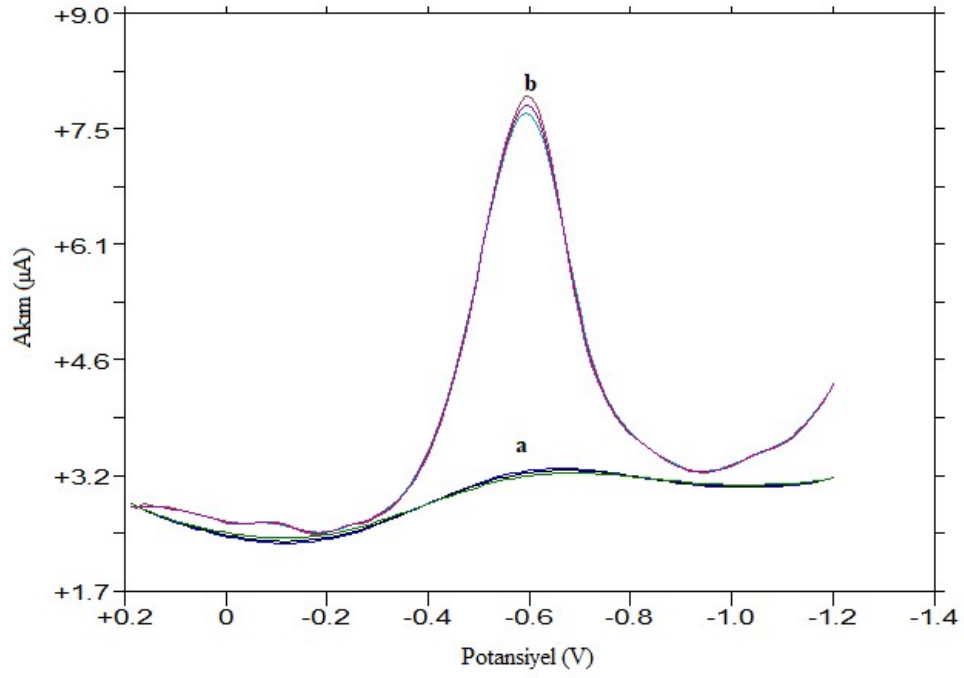
4.6 Gerçek Örnek Çalışması

Marketten alınan üç farklı kırmızı et ve beyaz et (tavuk eti) numuneleri rondodan geçirilip küçük parçalara ayrılmıştır. Sonra kırmızı etten ve beyaz etten yaklaşık 3'er g'lık numuneler alınarak 3 paralel şekilde çalışılmıştır. 215 mL asetonitril ve 35 mL ultra saf

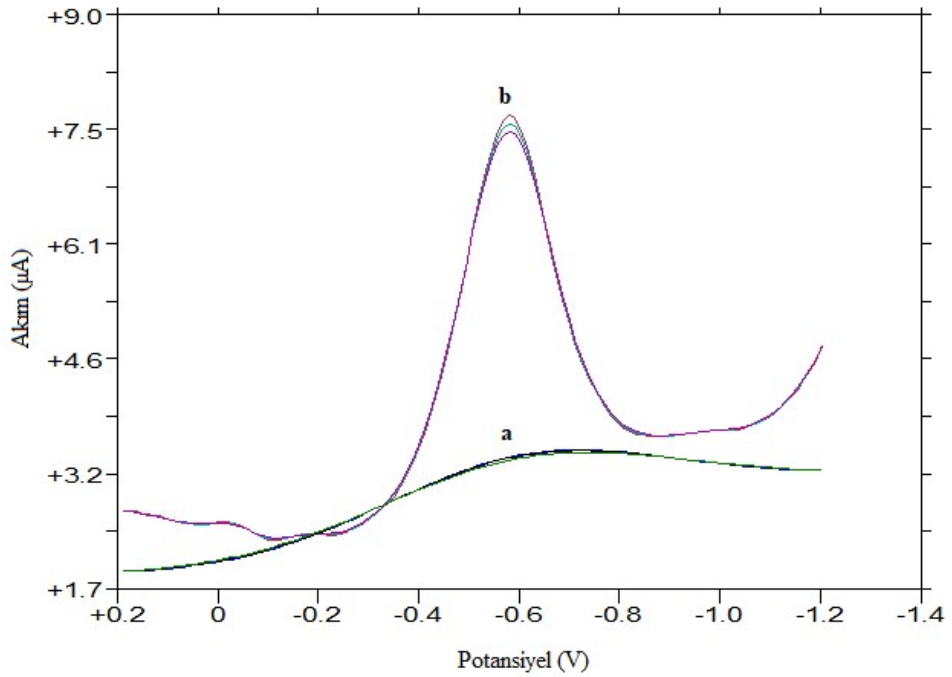
su birbirine karıştırılarak 250 mL'lik çözelti hazırlanmış ve bu çözeltiden 30'ar mL her bir numunenin üstüne eklenmiştir. Ardından, numuneler ağızları kapatılarak 30 dk çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra süzgeç kâğıdından süzölmüş ve süzöntü AcN-H₂O çözeltisinden ilave edilerek 30 mL ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden alınan 0.5'er mL'lik kısımlar 0.1 M Na₂SO₄ çözeltisi ile 5.0 mL'ye tamamlanarak, önceden belirlenmiş olan optimum koşullarda, diferansiyel puls voltamogramları alınmıştır. Daha sonra standart katma metodu kullanılarak 0.8 mM derişimde olacak şekilde stok çözeltiden eklendikten sonra numunelerin anaizi gerçekleştirilmiştir. Et numunelerine ait voltamogramlar Şekil 4.23-4.25'da, tavuk numunelerine ait voltamogramlar ise Şekil 4.26-4.28'de gösterilmiştir. Bu voltamogramlara ait ortalama pik akımları ve hesaplanan geri kazanım verimleri et numuneleri için Çizelge 4.6'de, tavuk numuneleri için ise Çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.23: 0.1 M'lık Na₂SO₄ içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde **a)** Et 1 numunesine ait, **b)** 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler.



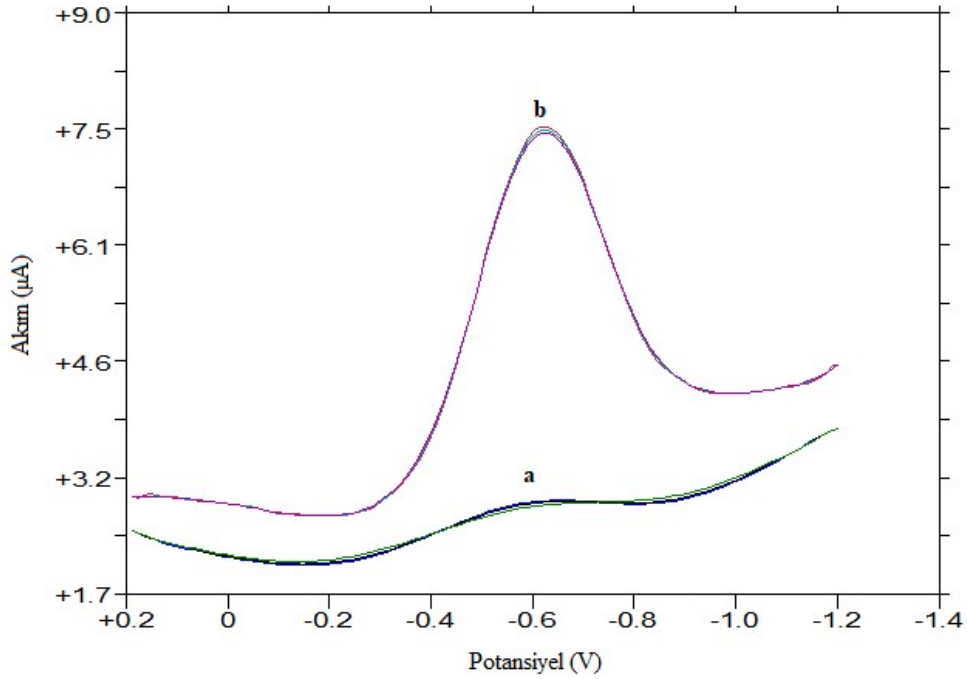
Şekil 4.24: 0.1 M'lık Na_2SO_4 içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde **a)** Et 2 numunesine ait, **b)** 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler.



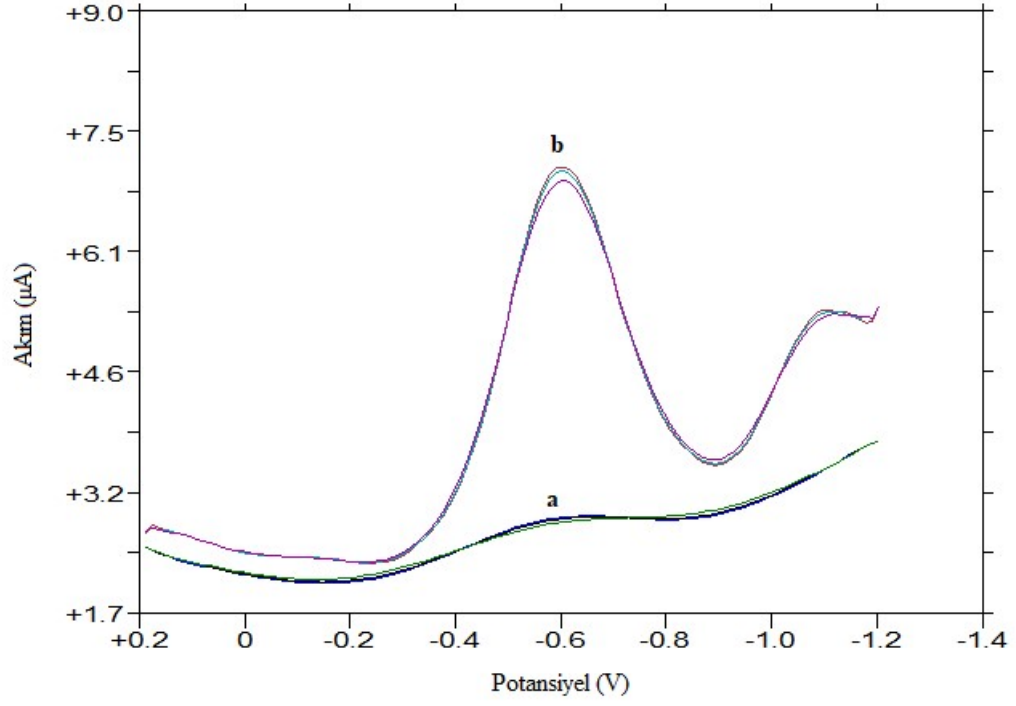
Şekil 4.25: 0.1 M'lık Na_2SO_4 içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde **a)** Et 3 numunesine ait, **b)** 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler.

Çizelge 4.6: Et numunelerine ait ortalama pik akımları ve geri kazanım verimleri.

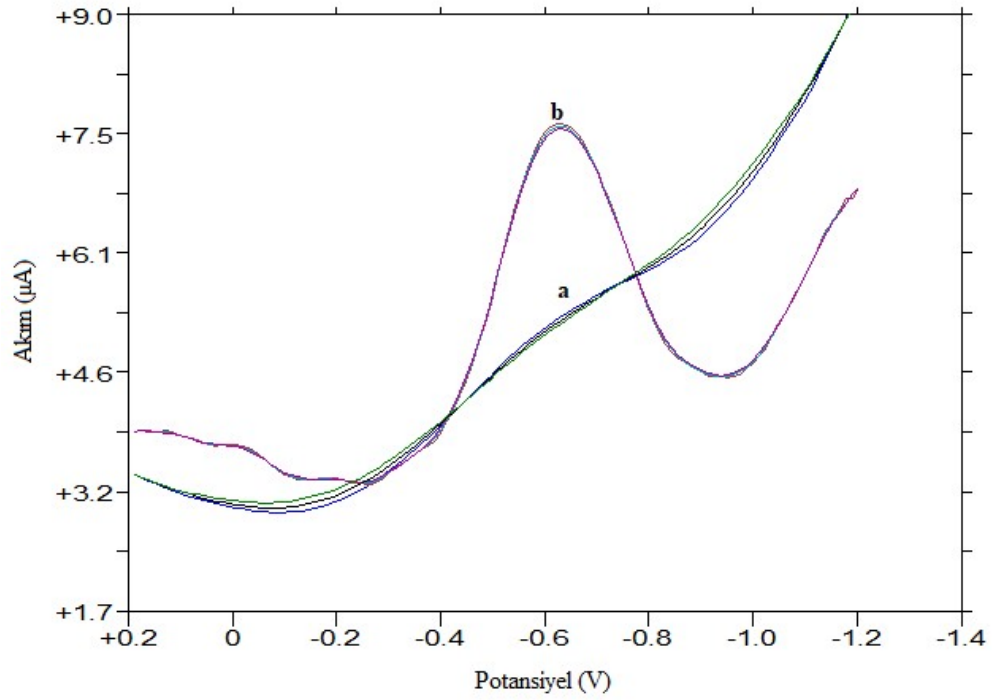
Numune	Numune Miktarı (g)	Ep (mV)	İp (μA)	0.8 mM FF ilaveli İp (μA)	Geri Kazanım Verimi (%)
ET 1	3.0046	-592	Tayin sınırının altında	4.519±0.001	109.230±0.001
ET 2	3.0044	-592	Tayin sınırının altında	4.351±0.050	105.170±0.050
ET 3	3.0042	-580	Tayin sınırının altında	4.630±0.044	111.920±0.044



Şekil 4.26: 0.1 M'lık Na₂SO₄ içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde **a)** Tavuk 1 numunesine ait, **b)** 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler



Şekil 4.27: 0.1 M'lık Na₂SO₄ içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde **a)** Tavuk 2 numunesine ait, **b)** 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler



Şekil 4.28: 0.1 M'lık Na₂SO₄ içinde poli 3-MTF modifiye GCE üzerinde **a)** Tavuk 3 numunesine ait, **b)** 0.8 mM FF ilavesine ait DPV'ler.

Çizelge 4.7: Tavuk numunelerine ait ortalama pik akımları ve geri kazanım verimleri

Numune	Numune Miktarı (g)	Ep (mV)	İp (µA)	0.8 mM FF ilaveli İp (µA)	Geri Kazanım Verimi (%)
Tavuk 1	3.0004	-616	Tayin sınırının altında	4.167±0.015	100.73±0.015
Tavuk 2	3.0025	-592	Tayin sınırının altında	4.167±0.018	100.73±0.018
Tavuk 3	3.0000	-628	Tayin sınırının altında	3.726±0.026	90.07±0.026

4.7 Diğer Florfenikol Sensör Çalışmaları

Florfenikol tayini için kimyasal modifikasyonla hazırlanmış poliüretan modifiye elektrotlar da denenmiştir. Bu elektrotların hazırlanması sırasında Laktoz, Sukroz ve GUM karbonhidrat temelli poliüretan yapıları kullanılmıştır.

4.7.1 Laktoz, Sukroz ve GUM Karbonhidrat Temelli Poliüretan Yapılarının Hazırlanışı

Her bir poliüretan yapısı öncelikle etilen glikol, disakkarit ya da polisakkarit ve izosiyanat kullanılarak çözelti polimerizasyon tekniği ile sentezlenmiştir. Sentezler sırasında etilen glikol ve sakkaritler -ol kaynağı olarak kullanılmış ve aromatik yapı 4,4'-diizosiyanojenil metan ile polimerleştirilmiştir. Bu sentezde üç boyunlu bir balon kullanılarak öncelikle etilen glikol ve sakkarit yapısı 30 mL, THF/DMSO (9/1) karışımında çözülmüştür. Homojen bir çözelti elde edildikten sonra 20 mL THF içerisinde çözülmüş diizosiyanojenat monomeri damla damla sisteme eklenmiştir. Karıştırma işlemi argon gazı altında gerçekleştirilmiş olup, yarım saat daha argon atmosferi altında homojen karışım elde edilmiştir. Daha sonra sistemin ısısı 90°C çıkartılarak 3 saat süresince reflüks edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan polimerik karışım 60 mL su ilavesi ile çöktürülmüştür. İki kere 50 şer mL etanol ile yıkanan polimerik yapı FTIR tekniği ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyonu tamamlanmış olan polimerler 0.1 g 1 mL aseton

içerisinde çözülerek farklı hacimlerde (2, 4, 6 μ L) elektrot yüzeyleri kaplanmıştır. Oda sıcaklığında 1 gün kurutma işleminden sonra florfenikol analizinde kullanılmıştır.

4.7.2 Laktoz, Sukroz ve GUM Temelli Poliüretan Modifiye Elektrotlarla Elektrokimyasal Çalışmalar

Florfenikol tayini sırasında poliüretan modifiye elektrotlarla elde edilmiş olan CV ve DPV yanıtları hem kararlı olmamış hem de florfenikol analiti için çıplak elektroda göre daha düşük pik akımı ve yayvan pik yapısı göstermiştir. Bu nedenle poliüretan modifiye elektrotlar kullanılarak hazırlanmış olan sensörlerin florfenikol tayini için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının temel amacı, modifiye edilmiş elektrot yardımıyla florfenikol tayini için; basit, ucuz, doğru, kesinliği yüksek ve duyarlı bir elektrokimyasal metot geliştirmektir.

Çalışmanın ilk aşamasında öncelikle piyasada satılan ve besi hayvanlarına uygulanabilen florkem ilacı saflaştırılarak Florfenikol etken maddesi saf olarak elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise çıplak ve polimer kaplı GC elektrotların CV ve DPV yanıtlarının değerlendirilmesiyle florfenikol analiti için; voltametrik parametreler ayrıntılı olarak optimize edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8: FF sensör gelişimi için optimize edilen parametreler

3-MTF modifikasyonu için optimum parametreler	
Monomer Derişimi	200 mV
Polimer Kalınlığı	4 segment
Polimer Tarama hızı	120 mV/s
Analiz (DPV) için optimum parametreler	
Elektrolit Türü	Na ₂ SO ₄
Elektrolit pH	4.50
Tarama hızı	60 mV/s

Optimum koşullar altında, modifiye elektrot ile artan derişimlerdeki FF yanıtlarına pik akımlarının 0.1-1.0 mM aralıkta doğrusal olarak ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan yararlanarak çizilen kalibrasyon grafiğinden tayin sınırı (LOD) 0.0399 mM, kantitasyon tayin sınırı (LOQ) 0.1197 mM ve korelasyon katsayısı (R^2) 0.999 olarak bulunmuştur.

DPV yöntemiyle elde edilen tekrarlanabilir voltamogramından hesaplanan standart sapma (0.008) ve % bağıl standart sapma (0.844) göz önüne alındığında, yöntemin tekrarlanabilir, son derece kararlı ve son derece duyarlı (% 99.2) olduğu kanıtlanmıştır.

Poli (3-metiltiyofen) membranının kolay hazırlığı, kimyasal stabilitesi, seçiciliği, iyi tekrarlanabilirliği, düşük maliyetli, hızlı tepki özelliklerinden dolayı, geliştirilen sensör, gerçek örneklerde (kırmızı ve beyaz et numunelerinde) FF'nin belirlenmesinde başarıyla kullanılmıştır.

Et numuneleri için belirsizliğin 0.001-0.050 aralığında, % geri kazanım veriminin ise 105.17-111.92 aralığında olması geliştirilen sensörün son derece duyarlı ve doğruluğunun kabul edilebilir aralıkta olduğunu kanıtlamaktadır.

Aynı şekilde, tavuk numunelerei için de belirsizlik 0.015-0.026, % geri kazanım verimi 90.07-100.73 aralığında bulunmuştur.

Sonuç olarak; poliüretan temelli kimyasal modifikasyonla elde edilmiş olan elektrotların florfenikol tayini için uygun olmadığı, buna karşın elektrokimyasal modifikasyonla geliştirilmiş olan sensörün uygun olduğu anlaşılmış olup, gerçek örneklerde (süt, et, tavuk ve işlenmiş şarküteri ürünleri) FF antibiyotiği kalıntı miktarının tayininde kullanılabileceği önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Chen, H.-Y., Wang, J., Meng, L., Yang, T. ve Jiao, K. (2016). Thin-layered MoS₂/polyaniline nanocomposite for highly sensitive electrochemical detection of chloramphenicol, *Chinese Chemical Letters*, **27**, 231–234.
- [2] Katz, S.E. ve Levine, P.R., (1978). Determination of neomycin residues in eggs and stability of residues after cooking, *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, **61**, 1103-1106.
- [3] Norcross, M.A. and Brown, J.L. (1991). Food safety and inspection service initiatives for tissue residue reduction in meat and poultry, *J. Am. Vet. Med.Assoc.*, **198**, 819-824.
- [4] Norcross, M.A. and Post, A.R.(1990). New food safety initiatives in the food safety and inspection service, U.S. department of agriculture, *J. Anim. Sci.*, **68**, 863-869.
- [5] Doyle Me. (2006). Veterinary drug residues in processed meats - potential health risk. A review of the scientific literature.
- [6] McEwen, S. A., Fedorka-Cray, P. J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals, *Clinical Infectious Diseases*, **34**, 93-106.
- [7] Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á., Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **29**, 1038-104.
- [8] Filazi A., Şireli U. T., Yurdakök B., Aydın F. G., Küçükosmanoğlu A. G., Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Kesin Raporu, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara, 2011.
- [9] Aydoğan H., Bazı Antibiyotiklerin Voltametrik Davranışlarının İncelenmesi ve Kantitasyon Koşullarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, 2015.
- [10] Yıldız T., Tavuk Etinde Antibiyotik Kalıntılarının HPLC Yöntemiyle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2014.
- [11] Başoğlu, A., Veteriner İç Hastalıklarında Genel Tedavi. Selçuk Üniv. Basımevi, Konya, 2000, 109-160.
- [12] Dökmeci, İ., Akçasu, A., Banoğlu, N., Berkarda, Ş., ve ark., (1992). Farmakoloji. İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar, Nobel Tıp Kitabevleri, 705-785.
- [13] Akkan, A.G., Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, İstanbul, s. 53-62, 2-3 Mayıs 1997
- [14] Picco E.J., Diaz D.C., Valtorta S.E., Boggio J.C. (2001). Chronotoxicology of florfenicol, *Chronobiol Int*, **18**, 567-572.

- [15] Kaya, S., Veteriner Farmakoloji, Cilt:2 Baskı: 4, Medisan Yayınevi. Ankara. s: 329-488. MOORE, E. (2007). Florfenicol. Journal of Exotic Pet. Medicine. 16(1): 52-54.
- [16] Craene B.A., Deprez P., D'Haese E., Nelis H.J., Van den Bossche W., De Leenheer P. (1997). Pharmacokinetics of florfenicol in cerebrospinal fluid and plasma of calves, *AAC*, **41**, 1991-1995.
- [17] Butaye P., Devriese L.A., Haesebrouck F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on grampositive bacteria, *Clinic. Microbiol. Rev.*, **16**, 175 -188.
- [18] Nouws, J.F.M. (1981). Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals, *Arch. Lebensmittelhyg.*, **32**, 92-140.
- [19] Commission Regulation (EC) No.1181/2002 (2002). Amending Annex I of Council Regulation (EEC) No.2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Communities. 01.07.2002.
- [20] Kaya, S., Ünsal, A. (2000): Besinlerdeki ilaç kalıntıları ve denetimi. sf713-730 Veteriner uygulamalı farmakoloji Cilt 2. Baskı 2. Ed. Kaya, S., Pirinçci, Bilgili, A. Medisan yayınevi. Ankara.
- [21] Rose M.D., Bygrave J., Sharman M. (1999). Effect of cooking on veterinary drug residues in food. Part 9, *Nitroimidazoles. Analyst.*, **124**, 289-294.
- [22] Fischer, L.J. ; Thulin, A.J.; Zabik, M.E.; Booren, A.M.; Poppenga, R.H.; Chapman, K.J. (1992). Sulfamethazine and its metabolites in pork: Effects of cooking and gastrointestinal absorption of residues, *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(9).
- [23] Waksman, S. A. (1947). What is an antibiotic or an antibiotic substance?, *Mycologia*, **39**, 565-569.
- [24] Gaudin, V., (2017). Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review, *Biosensors and Bioelectronics*, **90**, 363-377.
- [25] Bektemuroğlu B., Şireli M. (2011). Kobaylarda kloramfenikol ve florfenikol'ün elektrokardiyogram üzerine etkisi, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **58**, 155-160.
- [26] Botsoglou N.A. (2001). Fletouris, Drug residues in foods. Marcel Dekker, Inc. USA.
- [27] Donoghue D.J. (2003). Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: Human health concerns? *Poult. Sci.*, **82**, 618-621.
- [28] Kaya S., Şahal M. (1989). Besinlerimizdeki ilaç kalıntıları, bunlara ilişkin tolerans düzeyleri, ilaç verilmiş hayvanlarda uyulması gereken kesim öncesi bekletme veya sütün kullanılmama süreleri. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **36**, 390-403.

- [29] Paige J.C., Tollefson L., Miller M. (1997). Public health impact on drug residues in animal tissues. *Vet. Hum. Toxicol.*, **39**, 162-169.
- [30] Güreli H. (2009). Sığırlarda solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler, *Vet Hekim Der Derg.*, **80**, (3): 29-33,.
- [31] Yıkılmaz Y., Alabalıklarda Florfenikol Kalıntılarının GC-MS Yöntemiyle Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 2014.
- [32] Neu H.C. and Fu K.P. (1980). In vitro activity of chloramphenicol and thiamphenicol analogue. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **18**; 311-316.
- [33] Soback S., Paape M.J., Filep R. And Varma K.J. (1995). Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous intramuscular and intramammary administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **18**, 413-417.
- [34] Syripoulou V.P., Harding A.L., Goldman D.A. and Smith A.L. (1981). In vitro antibacterial activity of fluorinated analogues of chloramphenicol and thiamphenicol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **19**, 294-297.
- [35] Berendsen B., Stolker L., de Jong J., Nielen M., Tserendorj E., Sodnomdarjaa R., Cannavan A., Elliott C. (2010). Evidence of natural occurrence of the banned antibiotic chloramphenicol in herbs and grass, *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 1955-1963.
- [36] Blasco C., Torres C.M., Pico Y. (2007). Progress in a antibacterials analysis of residual in food. *Trends Anal. Chem.*, **26**, (9), 895-913.
- [37] Anthemidis A.N., Ioannou K.-I.G. (2009). Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination - a review, *Talanta*, **80**, 413-421.
- [38] Barreto F., Ribeiro C., Hoff R.B., Dalla Costa T. (2012). Determination and confirmation of chloramphenicol in honey, fish and prawns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with minimum sample preparation: validation according to 2002/657/EC directive. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **29**, 550-558.
- [39] Lu Y., Yao H., Li C., Han J., Tan Z., Yan Y. (2016). Separation, concentration and determination of trace chloramphenicol in shrimp from different waters by using polyoxyethylene lauryl ether-salt aqueous two-phase system coupled with high-performance liquid chromatography, *Food Chem.*, **192**, 163-170.
- [40] Chen-Hao Zhai and Yun Zou.(2008). Determination of tetracyclines in chicken by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Agilent technologies october food safety* John Wiley and Sons.
- [41] De Ruyck H, De Ridder H, Vanrenterghem R, Vanwambeke F. (1999). Validation of HPLC method of analysis of tetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to a feeding trial. *Food Addit. Contam.*, **16**, 47-56.
- [42] Ya-Min Kao, Mei-Hua Chang, Chieu-Chen Cheng and Shin-Shou Chou. (2001). Multiresidue Determination of Veterinary Drugs in Chicken and Swine Muscles

by High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Food and Drug Analysis*, **9**, 2, 84-95.

- [43] Fernandez-Torres R., Bello Lopez M.A., Olias Consentino M., Callejon Mochon M., Ramos Payan M. (2011). Enzymatic-microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **54**, 1146-1156.
- [44] Kawano S.-I., Hao H.-Y., Hashi Y., Lin J.-M. (2015). Analysis of chloramphenicol in honey by on-line pretreatment liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Chin. Chem. Lett.*, **26**, 36-38.
- [45] Cetinkayaa F., Yibara A., Soyutemiz G.E., Okutan B., Ozcan A. and Karaca M.Y. (2012). Determination of tetracycline residues in chicken meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants: Part B Vol. 5*, No. 1, March 2012, 45-49
- [46] Rodziewicz L., Zawadzka I. (2007). Rapid determination of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry and the validation of method based on 2002/657/EC, *Apiacta*, **42**, 25-30.
- [47] Li P., Qiu Y., Cai H., Kong Y., Tang Y., Wang D., Xie M.. (2006). Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry, *Chin. J. Chromatogr.*, **24**, 14-18.
- [48] Icardo M.C., Misiewicz M., Ciucu A., Mateo J.V.G, Calatayud J.M. (2003). FI-on line photochemical reaction for direct chemiluminescence determination of photodegraded chloramphenicol, *Talanta*, **60**, 405-414.
- [49] Ji Young Song, Soo Jung Hu, Hyunjin Joo, Joung Boon Hwang, Mi Ok Kim, Shin Jung Kang, Dae Hyun Cho. (2011). Determination of penicillins residues in livestock and marine products by LC/MS/MS World academy of science, *Engineering and tecnology*, **81**,809-811.
- [50] Paşahan A., Ayhan N., Özcan İ., Titretir Duran S., Köytepe S. (2019). Development of gallic acid sensors based on polyimide-modified platinum electrode, *Polymer-Plastics Technology and Materials*, **58**, 10, 1125-1139.
- [51] Titretir Duran S. (2018). Preparation of *poly*(pyromellitic dianhydride-co-thionin) modified voltammetric sensor for the determination of epicatechin, *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, **5**, 3, 1021-1028.
- [52] Titretir Duran, S., Paşahan, A., Ayhan, N., Güngör, Ö., Cengiz, M.A. & Köytepe, S. (2017). Synthesis, characterization of guar-containing polyurethane films and their non-enzymatic caffeic acid sensor applications, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **56**, 16, 1741-1751.
- [53] Kutluay Baytak, A. & Aslanoğlu M. (2017). Sensitive determination of capsaicin in pepper samples using a voltammetric platform based on carbon nanotubes and ruthenium nanoparticles, *Food Chemistry*, **228**, 152–157.

- [54] Burç M., Köytepe, S., Titretir Duran S., Ayhan, N., Aksoy, B. & Seçkin T. (2020). Development of voltammetric sensor based on polyimide-MWCNT composite membrane for rapid and highly sensitive detection of paracetamol, *Measurement*, **151**, 107103.
- [55] Güngör, Ö., Özcan, İ., Erdogan, M.A., Ateş, B., & Köytepe, S. (2020). Differential Pulse Voltammetric (DPV) Determination of the Local Anesthetic Bupivacaine using Polyimide Membrane-Based Electrodes, *Analytical Letters*, **53**, 2, 228-244.
- [56] Yang R.R., Zhao J.L., Chen M.J., et al. (2015). Electrocatalytic determination of chloramphenicol based on molybdenum disulfide nanosheets and self-doped polyaniline, *Talanta*, **131**, 619-623.
- [57] Aliyu M., Reza H., Nor Azah Y., Nafiseh S., Jaafar A., Pei Meng W. and Hamid G. (2018). A screen printed carbon electrode modified with carbon nanotubes and gold nanoparticles as a sensitive electrochemical sensor for determination of thiamphenicol residue in milk, *RSC Adv.*, **8**, 2714-2722.
- [58] Pilehvar S., Gielkens K., Trashin S.A., Dardenne F., Blust R. & De Wael K. (2016). (Electro)Sensing of Phenicol Antibiotics-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **56**, 2416–2429.
- [59] Pilehvar S., Dardenne F., Blust R., De Wael K. (2012). Electrochemical Sensing of Phenicol Antibiotics at Gold, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **7**, 5000 – 5011.
- [60] Dumont, V.; Huet, A. C.; Traynor, I.; Elliott, C.; Delahaut, P., A surface plasmon resonance biosensor assay for the simultaneous determination of thiamphenicol, florefenicol, florefenicol amine and chloramphenicol residues in shrimps, *Analytica Chimica Acta*, 2006, **567**, 179-183.
- [61] Huet, A. C., Charlier, C., Singh, G., Godefroy, S. B., Leivo, J., Vehniäinen, M., Nielen, M. W. F., Weigel, S., Delahaut, P. (2008). Development of an optical surface plasmon resonance biosensor assay for (fluoro)quinolones in egg, fish, and poultry meat, *Analytica Chimica Acta*, **623**, 195-203.
- [62] Ferrini, A. M., Mannoni, V., Carpico, G., Pellegrini, G. E. (2008). Detection and identification of β -lactam residues in milk using a hybrid biosensor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 784-788.
- [63] Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (1996). Fundamentals of Analytical Chemistry. Florida: Sanders College Publishing
- [64] Perçin Özkorucuklu S., Şahin Y., Alsancak G., (2011). Polipirolün Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografide Potansiyometrik Dedektör Olarak Kullanımı, *SDU Journal of Science (E-Journal)*, **6** (2): 127-139.
- [65] Aksoy B., Güngör Ö., Köytepe S., Seçkin T. (2016). Preparation of Novel Sensors Based on Polyimide Membrane for Sensitive and Selective Determination of Dopamine, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **55**: 119-128
- [66] Aksoy B., Paşahan A., Güngör Ö., Köytepe S., Seçkin T. (2017). A Novel Electrochemical Biosensor Based on Polyimide- Boron Nitride Composite

Membranes, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **66**:4, 203-212.

- [67] Skoog and Leary, 1992, Principle of Instrumental Analysis. Saunders College Publishing, Florida.
- [68] Aksoy, B., Köytepe, S., Ateş, B., Seçkin, T. (2016). Biyosensörlerin Hazırlanmasında Poliüretan Membranlar, *Putech & Composites*, **8**(30), 12-18.
- [69] Schmidt, C.E., Guimard, N.K. and Gomez, N. 2007. Conducting polymers in biomedical engineering, *Journal of Progress in Polymer Science*, **32**, 876-921.
- [70] Leon, A., Advincula, R.C. (2014). Conducting Polymers with Superhydrophobic Effects as Anticorrosion, *Intelligent Coatings for Corrosion Control*, **22**, 409-430.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: İmren TAŞKIN

Doğum Yeri ve Tarihi: DİYARBAKIR/ 17.06.1990

Adres: Barış mah.1002. sok. Başkent Gold sitesi B/4 blok no:6
Kayapınar/DİYARBAKIR

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lise: Birlik Lisesi (2005-2009)

Lisans: Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi (2011-2016)

Yüksek Lisans: İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (2017
– Devam ediyor)

TEZDEN TÜRETİLEN SUNUM

[1] İmren Taşkın, Öznur Güngör, Serap Titretir Duran, Determination of Fluorophenicol Antibiotics By Using Poly(3-Methylthiophene) Modified Glassy Carbon Electrode, *International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD 2019)*, 1-3 Temmuz, Malatya.