MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALDAKİ AMİNOGLİKOZİTLERİN TEK TÜP İÇERİSİNDE İN-SİTU SULU FAZ TÜREVLENDİRME SONRASINDA KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE TAYİN EDİLMESİ

SEZER ACAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

İSTANBUL, 2023

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALDAKİ AMİNOGLİKOZİTLERİN TEK TÜP İÇERİSİNDE İN-SİTU SULU FAZ TÜREVLENDİRME SONRASINDA KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE TAYİN EDİLMESİ

SEZER ACAR
520420003

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

İSTANBUL, 2023

ÖNSÖZ

Bu Yüksek Lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya programında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamın her aşamasında süreç boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, tez içeriğini belirleme ve çalışma sürecinde yol gösteren tez danışmanım, Prof. Dr. Ece Kök YETİMOĞLU'na, tecrübeleri ve bilimsel anlamda her zaman destek olan değerli yöneticim İsmail Emir AKYILDIZ'a,

Çalışmamın analiz aşamasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Altıparmak Gıda A.Ş (Balparmak) Ar-Ge Merkezi çalışanlarına,

Bu hazırlık sürecinde gösterdiği sabır ve destekleri için değerli eşim Habibe ACAR'a ve gülüşü ve kokusuyla beni motive eden küçük kızım Nil ACAR'a,

Sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız…

MAYIS, 2023 **Sezer ACAR**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ÖZET ..... **v**
ABSTRACT ..... **viii**
SEMBOLLER ..... **x**
KISALTMALAR ..... **x**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xii**
TABLO LİSTESİ ..... **xiii**
BÖLÜM 1. GİRİŞ **1**
1.1. Amaç 3
1.2. Arı Hastalıkları 4
1.3. Balın Bileşimi ve Genel Özellikleri 5
1.4. Baldaki Kalıntı Kaynakları ve Antibiyotikler 5
1.5. Baldaki Antibiyotik Kalıntılarının Sağlık Üzerindeki Olumsuz Etkileri 8
1.6. Antibiyotik Kalıntılarının Tespitinde Kullanılan Doğrulama metodları 8
1.7. Aminoglikozitler ve Genel Özellikleri 9
1.8. Balda Aminoglikozit Kalıntı Analizinde Kullanılan Yöntemler……. 10
1.9. Numune Ekstraksiyon Teknikleri……..…….…….12
1.10. Aminoglikozit Analizlerindeki Analitik Problemler…….……..14
1.11. Aminoglikozitlerin Enstrümental Tayin yöntemleri 14
1.12. Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS) 15

BÖLÜM 2. MALZEME VE METOT **17**
2.1. Malzemeler 17
2.1.1. Bal örnekleri 17
2.1.2. Kimyasallar 17
2.1.3. Gerekli Donanım ve Araç-Gereçler 18
2.1.3.1. Kullanılan araçlar ve cam malzemeler 18
2.1.3.2. LC-MS/MS sistemi ve donanımı 18
2.1.4. Reaktiflerin hazırlanması 19
2.1.4.1. Kullanılan fazların ve çözeltilerin hazırlanışı 19

2.1.4.2. Ana ve Ara Stok Standartların Hazırlanması 19
2.2. Yöntem 20
2.2.1.Kalibrasyon ve numune hazırlık çözeltilerinin hazırlanması 20
2.2.2.Numune hazırlama prosedürü 20
2.2.3. UHPLC / MS Yöntem Değişkenleri…… ……..……...22
2.3. Yöntem Geliştirme Çalışmaları 23
2.3.1. UHPLC-PDA kullanarak yapılan ön araştırma değerlendirmesi 23
2.3.2. UHPLC kromatografi optimizasyonu 24
2.3.3. MS valfin atık-dedektör zamanlamasının ayarlanması 24
2.3.4. Numune hazırlık optimizasyonu 25
2.4. Metodu geçerli kılma çalışmaları 25
2.4.1. Özgüllük (Seçicilik) 25
2.4.2. Aralık ve doğrusallık 26
2.4.3. Doğruluk 26
2.4.4. Presizyon (Kesinlik) 26
2.4.5. Hassasiyet (CCα-CCβ) 26
2.4.6. Sağlamlık (Ruggedness) 27
2.4.7. Sağlamlık (Robustness) 27
2.4.8. İç standart belirlenmesi 27
BÖLÜM 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE DEĞERLENDİRME 28
3.1. Araştırma Sonuçları 28
3.1.1. Balların polen analizleri 28
3.1.2. UHPLC optimizasyon sonuçları 28
3.1.2.1. UHPLC-PDA ön araştırma sonuçları 28
3.1.2.2. Aminoglikozit Analizleri İçin Seyrelt ve Enjekte Et Ön İşleminin LC-MS Sistemi ile Birleştirilmesi 32
3.1.2.3. Tek tüp içinde sulu fazda türevlendirme ve seyrelt-enjekt et metod optimizasyonu 32
3.1.2.4.Kütle Spektrometresi Edinim(Acqusition) Optimizasyonu . 37
3.1.2.5. LC Yöntemi ile ilgili Değerlendirmeler 38
3.1.3. Yöntem Geçerli Kılma Verileri 42
3.1.3.1. Özgüllük verileri 42

3.1.3.2. Hassasiyet sonuçları (CCα-CCβ) 43
3.1.3.3. Aralık ve doğrusallık sonuçları 44
3.1.3.4. Doğruluk sonuçları 44
3.1.3.5. Kesinlik sonuçları 45
3.1.3.6. Sağlamlık (Ruggedness) sonuçları 47
3.1.3.7. Sağlamlık (Robustness) sonuçları 47
3.1.4. Çalışılan örneklerin STR ve DSTR Değerleri 49
3.2. Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi 49
3.2.1. Yöntemin iyileştirilmesi 49
3.2.2. Kullanılan Hareketli Fazların ve Gradient Profilin Seçimi 49
3.2.3. Akış hızının seçimi 50
3.2.4. Farklı otoörnekleyici sıcaklıklarının etkisi 50
3.2.5. Tandem MS metot optimizasyonu sonuçları 50
3.2.6. Kütle spektrometresi valf optimizasyonu sonuçları 51
3.2.7. Numune hazırlık optimizasyon sonuçları 51
3.2.8. Yöntem Geçerli Kılma Verilerinin Değerlendirilmesi 51
3.2.8.1. Özgüllük 51
3.2.8.2. Hassasiyet (CCα-CCβ) 52
3.2.8.3. Aralık ve doğrusallık 52
3.2.8.4. Doğruluk 52
3.2.8.5. Kesinlik 53
3.2.8.6. Sağlamlık (Ruggedness) 53
3.2.8.7. Sağlamlık (Robustness) 53
3.2.9. Analiz edilen bal numune sonuçları 53
BÖLÜM 4. SONUÇ VE ÖNERİLER 55
4.1. Genel Sonuç 55
4.2. Öneriler 55
KAYNAKLAR 57
EKLER 67
ÖZGEÇMİŞ 71

ÖZET

BALDAKİ AMİNOGLİKOZİTLERİN TEK TÜP İÇERİSİNDE İN-SİTU SULU FAZ TÜREVLENDİRME SONRASINDA KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE TAYİN EDİLMESİ

Anahtar Kelimeler: Bal, Aminoglikozitler, In-Situ Türevlendirme, UHPLC-MS/MS

Günümüzde arıcılıkta birçok zararlı böcek ve hastalıklarla mücadele söz konusudur. Bu hastalıklardan en yaygın olanları Amerikan yavru çürüklüğü (AFB), Avrupa yavru çürüklüğü (EFB) ve Nosemosis'tir. Arıcıların kovanlarını bu hastalıklardan korumak için yaygın olarak kullandığı tekniklerden biri de antibiyotik ilaçların kullanılmasıdır. Arı hastalıklarını azaltmak veya önelemek için kullanılan antibiyotikler, baldaki kalıntı sorununun ana nedenlerindendir. Arıcılıkta yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerden biri de aminoglikozit grubu olanlardır. Aminoglikozitler gram-negatif bakteriler üzerinde protein sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösteren, geniş spektrumlu farmasötik moleküllerdir. Gıda ve ilaç endüstrisinde kalite kontrol ve Ar-Ge amaçlı analizleri gerçekleştirilen birçok alt grubu bulunmaktadır. Streptomisin ve dihidrostreptomisin, arıları çeşitli hastalıklara karşı korumak için yaygın olarak kullanılan aminoglikozidlerin en bilinen alt tipleridir. Bunlar yanlış uygulamalar nedeniyle arı ürünlerinde kalıntıya sebep olabilmektedirler. Aminoglikozit analizleri için piyasada özel sentezlenmiş antikorlar ile üretilen katı faz ekstraksiyon kartuşları veya ELISA kitleri bulunmaktadır. Bunlar tekrarlanabilirlikten uzak, total aminoglikozit sonucu veren, hassasiyetleri ve geri kazanım seviyeleri düşük analiz kitleridir. Buna karşın literatürde hassasiyet seviyeleri nispeten daha yüksek fakat tekrarlanabilirlik açısından problemli olan kromatografik teknikler de mevcuttur. Bu yöntemler genel olarak Katı-Faz Mikroekstraksiyon, Kolon sonrası eş zamanlı türevlendirme, UV, FL Dedektörler, Kütle spektrometresi ile kombine edilebilen İyon Çifti Kromatografisi ve Kapiler Elektroforez teknikleridir. Ancak bu tekniklerin de ön hazırlık süreçleri uzun ve yorucudur. Bu tez çalışmasında baldaki aminoglikozit grubu antibiyotiklerden

streptomisin ve dihidrostreptomisin kalıntılarının belirlenmesi için numune hazırlama yaklaşımı in-situ sulu faz türevlendirme tekniği ile seyrelt ve enjekte et şeklinde geliştirilmiştir. UHPLC-MS / MS sistemi kullanılarak pratik, düşük maliyetli, 5 dakika gibi kısa süreli ve düşük limitlerde dedeksiyon sağlayan bir analiz yöntemi ile numune hazırlama işlemleri minimuma indirilmiştir. Kullanıcı dostu olan yeni yöntemle yurtdışı tedarikli kit bağımlılığını ortadan kaldırmış olarak, daha hassas, tekrarlanabilir ve her aminoglikozit grubu antibiyotiğe ayrı ayrı cevap verebilme imkanı sağlanacaktır. Ayrıca referans nitelik sağlayacak olan bu yöntem, et, süt gibi diğer gıda numuneleri ve ilaç etken madde kalite kontrol testlerinde analiz edilen diğer aminoglikozit grubu antibiyotiklerin tespitinde de yurtiçi ve yurt dışı, kalite-kontrol, Ar-Ge ve akademik laboratuvarlara büyük katkı sağlayacaktır.

Seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve CCα & CCβ parametreleri üzerinden validasyon çalışmaları yapılmış olup, 5,10, 15, 20, 50, 100 µg/kg konsantrasyonlarında doğrusallık çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanım değerleri, streptomisin için %102,65 iken, dihidrostreptomisin bu değer %101,26 olarak tespit eddilmiştir. Kesinlik çalışmalarında, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için her iki parametrede de ortalama % RSD değerleri %0,7 ile %13,2 arasında gözlenmiştir. CCα ve CCβ değerleri, streptomisin için 5,69 ve 6,18 iken, dihidrostreptomisin bu değerler 5,82 ve 6,40 olarak tespit edilmiştir. Toplam 110 adet bal numunesi analiz edilmiş olup, 5 adet numunede streptomisin tespit edilmiş olup, 27 adet numunede de dihidrostreptomisin kantitasyon limiti üzerinde tespit edilmiştir.

MAYIS, 2023 **Sezer ACAR**

ABSTRACT

ONE POT IN-SITU AQUEOUS DERIVATIZATION AND SUBSEQUENT DETERMINATION OF AMINOGLYCOSIDES IN HONEY BY MEANS OF MASS SPECTROMETRY

Keywords: Honey, Aminoglycosides, In-Situ Derivatization, UHPLC-MS/MS

In beekeeping, there is a struggle against many pests and diseases. The most common bee diseases are American foulbrood (AFB), European foulbrood (EFB) and Nosemosis. One of the techniques commonly used by beekeepers to protect their hives from these diseases is the use of antibiotics. Antibiotics used to reduce or prevent bee diseases are one of the main causes of the residue problem in honey. One of the antibiotics commonly used in beekeeping is the aminoglycoside group. Aminoglycosides are broad-spectrum pharmaceutical molecules that show bactericidal action by inhibiting protein synthesis on gram-negative bacteria. There are many subtypes that are analyzed for quality control and R&D purposes in the food and pharmaceutical industry. Streptomycin and dihydrostreptomycin are the most well-known subtypes of aminoglycosides widely used to protect bees against various diseases. However, due to misapplication, they can cause drug residue in bee products. In the literature, for aminoglycoside analysis, there are many applications that use immunoaffinity solid phase extraction (SPE) cartridges or ELISA kits produced with specially synthesized antibodies. However, these techniques are far from repeatability, giving a total aminoglycoside result, low sensitivity, and low recovery levels. On the contrary, there are also chromatographic techniques in the literature with relatively high sensitivity levels but problematic in terms of reproducibility. These techniques include solid-phase microextraction, post-column simultaneous derivatization, UV, FL detectors, ion-pair chromatography combined with mass spectrometry and capillary electrophoresis.However, the preliminary preparation processes are tedious and time-consuming at these techniques. In this thesis, the sample preparation approach for the determination of aminoglycoside group antibiotics streptomycin and

dihydrostreptomycin residues in honey was developed as dilute and shoot using in-situ aqueous derivatization technique. Using a UHPLC-MS/MS system, sample preparation was minimized with a practical, low-cost, short-time (5 minutes) and low-limit detection method. The new user-friendly method will eliminate the dependency on foreign-supplied kits and will provide a more sensitive, reproducible and individual response to each aminoglycoside group of antibiotics. Furthermore, this method will make a great contribution by serving as a reference method for many R&D, quality control, and university laboratories in the determination of other aminoglycoside-type active substances in meat, milk, and pharmaceuticals matrices.

We have performed validation studies on selectivity, linearity, accuracy, precision, robustness and CCα & CCβ parameters, and linearity studies were performed at concentrations of 5, 10, 15, 20, 50, 100 µg/kg. The recovery value is 102,65% for streptomycin and 101,26% is for dihydrostreptomycin. For accuracy studies, % RSD values were observed on average between 0,7% and 13,2% in both parameters for reproducibility and reproducibility. CCα & CCβ values are 5,69 and 6,18 for streptomycin and for dihydrostreptomycin CCα & CCβ values are 5,82 and 6,40. Streptomycin was screened in 5 samples above 5ug/kg level on a total of 110 honey samples analyzed and dihydrostreptmycin was screened in 27 samples above 5ug/kg level on a total 110 honey samples.

MAY, 2023 **Sezer ACAR**

SEMBOLLER

CCα **:** Karar Limiti
CCβ **:** Tespit Limiti
Dp **:** Partikül Çapı
g : Gram
kg : Kilogram
kV **:** Kilo Volt
pKa **:** Asitlik Sabiti
S/N **:** Sinyal / Gürültü

KISALTMALAR

ACN **:** Asetonitril
APCI **:** Atmosferik Basınçlı Kimyasal İyonizasyon
BEH **:** Etilen Köprülü Hibrit Parçacık
CE **:** Kapiler Elektroforez
CV **:** Laboratuvarlar Arası Değişim Katsayısı
CRM **:** Sertifikalı Referans Malzeme
d-SPE **:** Dispersif Katı Faz Ekstraksiyonu
DAD **:** Diode Array Detector
EDTA **:** Etilendiamin tetraasetik asit
ESI **:** Elektrosprey İyonizasyon
EI **:** Elektron Bombardıman İyonizasyonu
ECD **:** Elektron yakalama dedektörü
ELISA **:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EC **:** Avrupa Komisyonu (European Comission)
FL **:** Floresans
FAO **:** Food and Agicultural Organization
FLD **:** Fluorometrik Dedektör
HPLC **:** Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

HSS	**:** High Strength Silica
LC-MS/MS	**:** Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi
LOQ	**:** Kantitasyon Limiti (Limit of Quantitation)
LOD	**:** Dedeksiyon Limiti (Limit of Detection)
MS	**:** Kütle Spektrometresi
MRL	**:** Maksimum Kalıntı Limiti
MS/MS	**:** Tandem Kütle Spektrometresi
MRPL	**:** Maksimum Kalıntı Performans Limiti
RPA	**:** Referance Point for Action
MRM	**:** Multiple Reaction Monitoring (Çoklu Reaksiyon Görüntüleme)
PPB	**:** Per Part Billion (milyarda bir- µg/kg)
QUECHERS	**:** Quick-Easy-Cheap-Rugged and Safe
SD	: Standart Sapma
RSD	**:** Relatif Standart Sapma
RP-LC	**:** Ters Faz Sıvı Kromatografisi
ROSA	**:** Rapid One Step Assay
SPE	**:** Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction)
SRM	: Selected Reaction Monitoring (Seçilmiş Reaksiyon İzleme)
TOF	**:** Uçuş Zamanı (Time of Flight)
UPLC	**:** Ultra Basınçlı Sıvı Kromatografisi
UV	**:** Ultraviyole (mor ötesi)
USS	**:** Ultra Saf Su
UPLC-ESI-MS/MS	**:** Ultra Basınçlı Sıvı Kromatografisi -Elektrosprey İyonizasyonlu Tandem Kütle Spektrometresi
µg	**:** Mikrogram

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1. Aminoglikozitlerden streptomisinin molekül yapısı 10
Şekil 1. 2. Kütle spektrometresine ait temel bileşenleri 15
Şekil 1. 3. Üç kademeli kuadrupol (TSQ) kütle analizörü 16
Şekil 2. 1. Numune hazırlama şeması 21
Şekil 3. 1. UHPLC-PDA sisteminde uygun türevlendirme ajanı belirlemek için yapılan ön araştırmaların sonuçları 31
Şekil 3.2. Optimize edilmemiş STR türevlendirme reaksiyonunun türevlendirme şeması ve kütle spektrumu …… 33
Şekil 3.3. Optimize edilen LC koşulları sonucundaki kantitasyon ve doğrulama iyonlarının temsili kromatogramları 39
Şekil 3.4. MRM kütüphanesindeki streptomisin, dihidrostreptomisin ve internal standardın tarama aralığı 39
Şekil 3.5. Kör numuneye streptomisin eklenerek hazırlanan kalibrasyon noktalarının kromatogramları ……...40
Şekil 3.6. Kör numuneye dihidrostreptomisin eklenerek hazırlanan kalibrasyon noktalarının kromatogramları …….. 41
Şekil 3.7. Trimetoprimin kalibrasyon standartlarının eklenmesiyle alınan kromatogramlar …..……. 41
Şekil 3.8. Kalibrasyon grafikleri ve rakamsal verileri……44

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 1. Arıcılıkta kullanılan antibiyotikler ve sınıfları 7
Tablo 2. 1. Kalibrasyon noktaları ve numune hazırlık tablosu 20
Tablo 2. 2. UHPLC metot şartları 22
Tablo 2. 3. UHPLC faz akış programı 22
Tablo 2. 4. Kütle spektrometresi ve tune parametre değerleri 22
Tablo 2. 5. Metot kantitasyon parametreleri 22
Tablo 2.6. Kütle spektrometresinin akış halindeki valf programı……..23
Tablo 3. 1. Balda Fmoc.Cl ile farklı koşullarda gerçekleştirilen türevlendirme reaksiyon verimlerinin karşılaştırılması 36
Tablo 3. 2. Aminoglikozitlerin ana ve parçalanma iyonları ile bunlara ait cone voltajı ve çarpışma enerjileri 40
Tablo 3. 3. Streptomisine ait spesifiklik ve seçicilik sonuçları..... 42
Tablo 3. 4. Dihidrostreptomisine ait spesifiklik ve seçicilik sonuçları..... 43
Tablo 3. 5. Geri kazanım sonuçları..... 44
Tablo 3. 6. Streptomisin tekrarlanabilirlik verileri 45
Tablo 3. 7. Dihidrostreptomisin tekrarlanabilirlik verileri..... 46
Tablo 3. 8. Streptomisin tekrarüretilebilirlik verileri..... 46
Tablo 3. 9. Dihidrostreptomisin tekrarüretilebilirlik verileri 47
Tablo 3. 10. Sağlamlık çalışmasında değiştirilen parametreler 48
Tablo 3. 11. Streptomisin sağlamlık çalışması sonuçları..... 48
Tablo 3. 12. Dihidrostreptomisin sağlamlık çalışması sonuçları..... 48

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Bal, bal arılarının nektar toplayarak ürettiği fenolik bileşikleri, mineralleri, proteinleri ve enzimleri içeren şeker içeriği yüksek doğal bir üründür. Günümüzde arıcılıkta birçok zararlı böceğe, akarlara ve önemli böcek kaynaklı hastalıklara karşı mücadele vardır. En yaygın arı hastalıkları Amerikan yavru çürüklüğü (AFB), Avrupa yavru çürüklüğü (EFB) ve Nosemosis'tir. Amerikan yavru çürüklüğü, bal arılarında bilinen en ölümcül yavru hastalığıdır. Hastalığa spor oluşturan bakteri Paenibacillus larvaları neden olur (Genersch, 2006). Avrupa yavru çürüklüğü (EFB) semptomatolojide AFB ile yakından ilişkilidir. Bununla birlikte, neden olan organizma, Melissococcus plutonius bakteri spor oluşturmaz ve bu nedenle hastalığın AFB'den daha az sorunlu olduğu düşünülmektedir. Bakteri genellikle kapaksız hücrelerdeki daha genç larvalara saldırır (Genersch, 2006). Nosema apis veya N. ceranae'nin neden olduğu nosemoz, açık arayla en zarar veren yetişkin arı hastalığıdır. Enfeksiyonlar, beslenme veya bakım sırasında sporların alınmasıyla elde edilir. Nosema apis, yetişkin arının sindirim kanalının arka bağırsağının (ventrikül) epitel hücrelerini enfekte ederek kısa sürede çok sayıda spor oluşumuna neden olur ve arıların ömrünü kısaltan polenlerin sindirimini bozar. Nosema'nın yüksek insidansları, uzun hapis veya beslenme dengesizliği dönemleri gibi doğrudan stresle ilgilidir.

Arıcılar, kovanlarını bu hastalıklardan korumak için antibiyotik ilaçları kullanırlar ancak bu durum balda antibiyotik kalıntısına neden olabilir. Yanlış arıcılık uygulamaları, sağlık amaçlı kullanılan bu ürünlerin tüketimini engellemektedir. Kalıntı içeren balların tüketimi insanların sağlığını olumsuz etkileyebilir. Baldaki antibiyotik kalıntıları, olası alerjik reaksiyonlara ve tedavide kullanılacak antibiyotiklere bakteriyel dirence neden olabilir. Tetrasiklinler, aminoglikozitler (streptomisin), sülfonamidler, eritromisin, linkomisin, kloramfenikol, nitrofuranlar, florokinolonlar (fumagillinozu önlemek için) tipik olarak arı hastalıklarını tedavi etmek için kullanılan antibiyotik çeşitlerindendir.

Geniş spektrumlu antibiyotiklerden biri olan kloramfenikol (CAP) ve streptomisin, 1997'de büyük bir AFB salgınını kontrol etmek için tercih edilen antibiyotiklerdendi (Ortelli ve diğerleri, 2004). Ayrıca Meksika'da arıcıların arı kovanlarında takviye ürünü

olarak streptomisini kullandıkları kaydedilmiştir. (Bogdanov ve Fluri, 2000). Streptomisin (STR) ve dihidrostreptomisin (DSTR), arıları çeşitli kuluçka hastalıklarına karşı korumak için arıcılıkta yaygın olarak kullanılan aminoglikozitlerin alt tipidir ve bu aynı zamanda bir antibiyotik kalıntı problemi olarak da ortaya çıkar. Bazı kodeks ve komisyonu kararlarına göre arı ürünlerinde antibiyotik kalıntısı olmamalıdır. Yönetmelikte aminoglikozid antibiyotik kalıntıları için Maksimum Kalıntı Sınırı (MRL) değeri belirtilmemiştir. Bu, görüntüleme yöntemlerinin mümkün olan en düşük sınırlarda dedekte etme gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu noktada, referans laboratuvarlar bu maddelerin tespiti için gerekli minimum performans limiti (MRPL) belirlemiştir ki yeni adıyla artık RPA (Reference point for action). Bu performans kriterlerine göre, geliştirilen yöntem kalıntıları MRPL konsantrasyonlarına göre ölçmelidir.

Literatür taramasında, aminoglikozid antibiyotiklerin analizi için piyasada katı faz ekstraksiyon kartuşları veya ELISA kitleri bulunmaktadır. Bu teknikler, tekrarlanabilir olmaktan uzak, toplam aminoglikozid sonuçları veren, düşük duyarlılığa ve düşük geri kazanım seviyelerine sahip, maliyetli analiz kitleridir. Öte yandan, literatürde göreceli olarak daha yüksek duyarlılık seviyelerine sahip kromatografik tekniklere dayalı yöntemler de bulunmaktadır. Ancak ön hazırlık süreçleri uzundur. Bu çalışmada UHPLC-MS / MS sistemi kullanılarak analiz süresi daha kısa olan yöntem geliştirilmiş ve numune hazırlama işlemleri en aza indirilmiştir. Balda sıklıkla karşılaşılan streptomisin ve dihidrostreptomisin aminoglikozid türlerinin belirlenmesi, çok düşük limitler ve beş dakikalık analiz süresi ile geliştirilmiştir. Baldaki aminoglikozit kalıntılarının belirlenmesi için numune hazırlama yaklaşımı, in-situ sulu faz türevlendirme tekniği seyrelt ve enjekte et yöntemi ile zahmetsiz, ekonomik olarak uygun, analiz süresi uzun olmayan bir inkübasyona dayalı, kullanıcı dostu bir analiz prosedürü olarak geliştirilmiştir. Çok düşük limitlerde görüntüleme imkanı tanımıştır.

Arıcılık sektöründe birçok sınıf antibiyotik grubunun kullanımı mevcuttur. Bunlardan aminoglikozit grubunda yer alan streptomisin ve dihidrostreptomisin antibiyotiklerin, ballarda kalıntısına sıkça rastlanması, çalışmamızı özellikle bu iki antibiyotiğin üzerine yoğunlaşmamızı sağlamıştır. Tez kapsamında geliştirdiğimiz yeni yöntemle 2 farklı AG grubu antibiyotiklerin bal örneklerinde kalıntı analizleri, mevzuat kriterlerine uygun olarak hızlı ve dikkatli şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda 110 tane bal

numunesi analiz edilmiş olup, bu balların AG grubu antibiyotik sonuçları değerlendirilmiştir.

1.1. Amaç

Tez çalışmamızın amacı aminoglikozit grubu antibiyotiklerden streptomisin ve dihidrostreptomisinin bal numunelerinde tespitine dair, güvenilir, hassas ve kullanıcı dostu olan bir yöntem geliştirilmesidir ve metod gerekli mevzuatlara uygun şekilde valide edilmiştir. Yanlış arıcılık uygulamaları nedeniyle aminoglikozit grubu antibiyotiklerden streptomisin ve dihidrostreptomisin balda kalıntı olarak karşımıza çıkabilmektedir. Bu grubun analitik yöntemler ile tespiti hem çalışma matrisinin kompleks olması hem de hedeflenen aminoglikozit grubu parametrelerin moleküler yapıları dolayısı ile oldukça zordur. Balda aminoglikozit analizleri, literatürde yapılan araştırmalar sonucunda, oldukça uzun, yorucu ve maliyetli sarf malzeme gerektiren ancak hassas ve güvenilir sonuç üretemeyen metodolojiler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bunlar genellikle: İyon Çifti- Ters Faz Kromatografisi, SPE veya SLE Temizleme Teknikleri, Kolon sonrası eş zamanlı türevlendirme, Kapiler Elektroforez ile Ayrım Tekniği, UV, FL gibi spesifik olmayan dedektör seçenekleri, kütle spektrometresi ile yukarıda bahsedilen birkaç tekniğin kombine edildiği yöntemleridir. Ancak bu tekniklerin de uzun ön hazırlık süreçleri mevcuttur. Buna ek olarak pek çok laboratuvar yurt dışından tedarik edilen antikor tabanlı, yüksek maliyetli analiz kitleri kullanmaktadır. Bu kit ile elde edilen analiz sonuçlarındaki tekrarlanabilirlik problemi, hassasiyet yetersizliği, yüksek maliyeti ve her aminoglikozit grubu antibiyotiğe cevap üretememe problemlerinden dolayı alternatif bir yöntem geliştirmek amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında baldaki streptomisin ve dihidrostreptomisin kalıntılarının belirlenmesi için numune hazırlama yaklaşımı in-situ sulu faz türevlendirme tekniği ile geliştirilecektir. Türevlendirme ile oluşturulmuş aminoglikozitleri temsil eden hidrofobik karakterdeki moleküllerin görüntülenmesi için ters faz kromatografi tekniği kullanılacaktır. Öngörülen türevlendirme reaksiyonlar sonucu oluşacak moleküller amino grubuna bağlı türevlendirme ajanlarından türetilmiş moleküller olacaktır. UHPLC-MS / MS sistemi kullanılarak düşük limitlerle, çok daha kısa bir analiz yöntemi geliştirilecek ve numune hazırlama işlemleri minimuma indirilecektir. Pratik, düşük maliyetli, kısa süreli inkübasyonlu analiz yöntemi ve düşük

seviyelerde dedeksiyona imkan tanıyan hassasiyeti yüksek bir numune hazırlama prosedürü geliştirilme amaçlanmaktadır. Ayrıca referans nitelik sağlayacak olan bu yöntem, et, süt gibi diğer gıda numuneleri ve ilaç etken madde kalite kontrol testlerinde analiz edilen diğer aminoglikozit grubu antibiyotiklerin tespitinde de yurtiçi ve yurt dışı, kalite-kontrol, Ar-Ge ve akademik laboratuvarlara büyük katkı sağlanması amacını taşımaktadır.

1.2. Arı Hastalıkları

Arı hastalıkları, son yıllarda daha fazla öneme sahip olmaya başlamıştır. Ülkemiz, 1976 yılına kadar varroa parazitini tanımazken, artık bu parazit arıcılığımızın en önemli problemlerinden biri haline gelmiştir. Buna benzer durum birçok ülkede meydana gelmektedir. Arı yetiştiricileri genellikle salgın hastalıklar için antimikrobiyal ajanlar kullanarak tedavi uygulamakta veya önlem almaktadırlar. En sık karşılaşılan, bulaşıcı hastalıklara baktığımızda sırasıyla, Amerikan yavru çürüklüğü, Avrupa yavru çürüklüğü ve Nosemosis şeklinde belirtilebilir. Amerikan yavru çürüğü hastalığı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizdede arılar ve arıcılarımız için büyük sorun oluşturmaktadır. Etmeni Paenibacillus larvae'dır. Gram (+), flagellalı ve spor oluşturan bir yapıya sahiptir ve ergin arılar üzerinde bir hastalık oluşturmaz. Olumsuz çevre koşullarında spor oluşturarak uzun yıllar canlı kalabilir. Ülkemizde ihbarı mecburi tek arı hastalığı olmakla birlikte, türler içinde en bilineni ve en geniş çapta zararı olan bir tür kuluçka dönemi hastalığıdır. (Ashiralieva ve Genersch, 2006). Bütün koloninin kaybına neden olacak etki yaratmaması adına zamanında müdahale veya tedavi edilmesi elzemdir (Williams, 2000).

Melissococcus plutonius orjinli diğer tür hastalık olan Avrupa yavru çürüğü hastalığı ise, semptomları ve tedavi prosedürleri farklıdır. Antibiyotik ve diğer antimikrobiyallerin kullanılması bu bakteriyel hastalıkların önlenmesini sağlamaktadır. Arı hastalıklarından Nosema apis. yaygın olarak görülürken, diğer önemli hastalıklardan olan Varroa'ya karşı neonikotinoidler, akarisitler gibi ilaçlar kullanılmaktadır.

1.3. Balın Bileşimi ve Genel Özellikleri

Balın literatürde birçok tanımı bulunmaktadır, bunlardan en yaygın bilinen tanımıyla bal; arılar tarafından çiçeklerden ve meyve tomurcuklarından alınarak yutulan nektarın arıların bal midesi denilen organlarında invertaz enzimi sayesinde kimyasal değişime uğramasıyla oluşan ve kovandaki petek hücrelerine yerleştirilen birçok sağlık faydası bulunan faydalı bir üründür. Balın içeriği bulunduğu floraya, çevre şartlarına ve koloni gibi birçok parametreye bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Anklam, 1998 ve White, 1979). Genel olarak bal ortalama %75 şeker, %18 su içermekte ve yapısında, proteinler, flavonoidler ve fenolik bileşikler ve amilaz, katalaz gibi bazı enzimler ve düşük miktarda mineraller bulunur.

Balın yapısında %1 civarında aminoasit vardır ve bu oranın büyük çoğunluğunu da prolin oluşturur (Anklam, 1998). Yapısında bulunan enzimler ise invertaz, glikoz oksidaz ve diastazdır. Bal asidik yapıdadır ve pH 4.0 civarında değişmektedir. Bu asitlik, glikonik asit içeriğinden kaynaklanmaktadır (White, 1975). Sindirimi kolay, besleyici ve sindirim sistemi bozuklukları, kalp-damar hastalıkları, sinir sistemi ve solunum sistemi gibi hastalıklar için koruyucu ve iyileştirici özelliği olan fonksiyonel bir üründür (Özmen ve Aklın, 2006).

1.4. Baldaki Kalıntı Kaynakları ve Antibiyotikler

Besinlerdeki organik kalıntılar; pestisitler, doğal toksinler, çevre etkili kimyasallar ve veteriner ilaçları olmak üzere dört başlık altında değerlendirilmektedir.

Antibiyotikler, mantar veya bakteri gibi mikroorganizmalar tarafından veya sentez ile meydana gelirler. Çok düşük miktardaki konsantrasyonlarda bile bakterilerin gelişimini yavaşlatır ya da tamamen yok edebilirler. Makrolidler, aminoglikozidler ve floksasin grupları, arıcılıkta sıkça karşılaşılan gruplar olarak görülmektedir. Bu ilaçlar kullanılan canlı metabolizmalarda orijinal haliyle veya başka formları olarak bulunmaktadır (Thiele-Bruhn, 2003). Orman yangınları, arı kovanlarının sanayi bölgelerine yakın olması, fabrika atıklarından ve de yanlış arıcılık uygulamalarından dolayı balda karşımıza çıkan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) da grupları arasında bulunmaktadır.

Arıcılıkta varroa engelleme amaçlı kullanılan pestisitlerin ve kovanların korunması için kullanılan naftalin, balda birikerek tüketilmesiyle de insanlara geçebilmektedir. (Wallner, 1999). Bundan dolayı da bal ve balmumuna ait analiz sonuçlarında pestisit ve ilaç kalıntısı tespit edilmesi gayet normal görülmektedir. Tarım alanlarındaki bitkilere uygulanan pestisitlerin kalıntı kaynağı olarak değerlendirilme sebebi, rüzgâr, yağmur gibi etkilerle etraftaki bitkilere saçılmasından kaynaklanmaktadır (Bogdanov ve ark., 2003).

Ballarda antibiyotik kalıntı analizlerinin yapılması gerekliliği düşüncesi, doksanlı yılların sonlarında arı hastalıklarının tedavisinde kullanılan streptomisinin balda kalıntısının görülmesinin ardından gündeme gelmiş ve o tarihten itibaren bazı analizler yapılmaya başlanmıştır. O tarihlere kadar bu analizler yoğun olarak gerçekleştirilmiyordu. Bu nedenle, arıcılıkta antibiyotik kullanımı konusu hem tüketicilerin hem de gıda kalite kontrolü yapan laboratuvarlar için daha fazla zaman harcanması gereken bir konu haline gelmiştir (Sunay, 2006). Arıcılık uygulamalarında yapılan yanlışlıklar, dozaj ayarlamasının hatalı yapılması gibi etmenler başlıca arı ürünü olan balda antibiyotik kalıntısı yaratarak olumsuz etki vermektedir. Bu antibiyotikler balda doğrudan görülebilmekte birlikte farklı formlarda da tespit edilebilmektedir. Arıcılıkta kullanılan ilaçların yayınlanmış tebliğ ve mevzuatlara göre tamamı yasaklanmış ya da belirli kullanım sınırları olabilmektedir. Yasaklanmış ilaç grupları nitroimidazoller, nitrofuranlar, amfenikoller iken, bazı antibiyotik grupları ise sınırlı kullanıma tabi tutulmuştur. Kinolonlar, sülfonamidler, makrolidler, tetrasiklinler bu gruptadırlar. Arıcılıkta yaygın olarak kullanılan antibiyotikler Tablo 1.1'de gösterilmiştir.

Antibakteriyel ilaçlar: aminoglikozitler, nitrofuranlar, amfenikoller, β-laktamlar, makrolitler, imidazoller, floksasinler, sülfonamidler, tetrasiklinler ve diğer ilaçlar şeklinde gruplandırılabilirler. Gıdalardaki antibakteriyel kalıntıları dirençli bakteri soylarının gelişmesine imkan sağlamaktadır.

Mevzuatlara uygun düşük limitlerde görüntüleme yapmak için hassas ve uygun kriterlerde analitik yöntemler geliştirmemiz gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan metodların performansı ve geçerlilik şartları ilgili komisyonlar tarafından belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem valide edilerek gerekli kriterlere uygunluğu gösterilecektir.

2002/657 / EC Komisyon Kararının dökümanı analitik yöntemlerin ve sonuçların yorumlanmasında kullanılan rehber dokümandır. Bu dökümanda teknik yönergeler ve gerekli performans kriterleri, detaylı belirtilmiş olup, kantitatif yöntemlerin validasyonu için yapılacak spesifik çalışmalar şu şekilde belirtilmiştir; Özgüllük, Doğrulama Noktası, Teşhis Noktası, İyon Oranı, Relatif Alıkonma Süresi, Kalibrasyon Grafikleri, Geri Kazanım, Gerçeklik, Kesinlik, Analitik Limitler (Hassasiyet).

Tablo 1. 1. Arıcılıkta kullanılan antibiyotikler ve sınıfları

NİTROFURANLAR	SÜLFONAMİDLER	MAKROLİDLER	TETRASİKLİNLER	AMİNOGLİKOZİTLER
Nitrofurazon	Sülfatiazol	Eritromisin	Tetrasiklinler	Streptomisin
Furaltadon	Sülfadiazin	Josamisin	Demokloksiklin	Dihidrostreptomisin
Nitrofurantoin	Sülfametazin	Tilmikosin	Oksitetrasiklinler	Neomisin
Furazolidon	Sülfomerazin	Karbomisin	Doksisiklin	Kanamisin
Nifuraldazon	Sülfobromometazin	Oleandomisin	Klortetrasiklin	Gentamisin
	Süfometaksazol	Spiramisin		Tobramisin
	Sülfasitin	Tilozin		Amikasin
	Sülfakloropridazin			Paromomisin
	Sülfakloropirazin			Lividomisin
	Sülfadimetoksin			Spektinomisin
	Sülfametoksidiazin			Apramisin
	Sülfafenazol			Netimisin

Tablo 1.1. (Devam) Arıcılıkta kullanılan antibiyotikler ve sınıfları

SEFALOSPORİNLER	PENİSİLİNLER	FENİKOLLER	KİNOLONLAR	NİTROİMİDAZOLLER
Sefradin	Siklasillin	Kloramfenikol	Lomefloksasin	Metronidazol
Sefaleksin	Penisilin V	Thiamfenikol	Nalidiksik asit	Ronidazol
Sefaloglisin	Fenetisilin	Florfenikol	Oflaksosin	İpronidazol
Sefadroksil	Azidosilin		Flumekuin	Nimorazol
Sefaklor	Oksasillin		Sinoksasin	Dimetridazol
Sefatrazin	Amoksisilin		Sarafloksasin	Tinidazol
Sefalotin	Tekarasilin		Enoksasin	Ornidazol
Sefalazin	Pivampisilin		Oksolinik asit	
Sefotaksim	Bakampisilin		Pipemidik asit	
Sefasetril	Piperasillin		Pefloksasin	
Sefoksitin	Azlosilin		Nadifloksasin	
Sefamandol	Penisin G		Fleroksasin	

Sefuroksim	Mezlosilin	Danofloksasin
Sefaloridin	Episilin	Marbofloksasin
Sefotetan	Talampisilin	Enrofloksasin
Sefapirin	Karbenisilin	Siprofloksasin
Sefoperazon	Hetasilin	Sparfoksasin
Seftazidim	Ampisilin	Difloksasin
Seftriakson	Kloksasilin	Pazufloksasin
Seftizoksim	Dikloksasilin	Norfloksasin
Sefaksazol	Nafsilin	Orbifloksasin

1.5. Baldaki Antibiyotik Kalıntılarının Sağlık Üzerindeki Olumsuz Etkileri

Antibiyotik kalıntısı bulunan gıdaların uzun süreli tüketilmesine bağlı olarak, insan vücudunda bazı hastalıklar görülebilmektedir. (Rose ve ark., 1999). Antibiyotik kalıntılarının, vücuda alınması sonucunda, vücudumuza zarar vermeyen bakteri türleri ölürken ve tam tersi olumsuz etki yapan bakteriler artar. Kalıntı olarak transfer olan antibiyotikler vücudun doğal floral yapının bozmaktadır. Çünkü bunlar bağırsak sisteminde yer alan yararlı bakterilere zarar vermektedirler. Gıda ürünlerinde ilaç kalıntılarına rastlanılmasının en bilinen nedenleri arasında yüksek konsantrasyonda veya yanlış dönemde yapılan veteriner ilaç uygulamaları ve bunların verilme dozajları, ruhsatsız ilaçlar ve uygulandığı hayvandaki hastalıkların yanlış teşhisi söylenebilir (Impens ve ark., 2003).

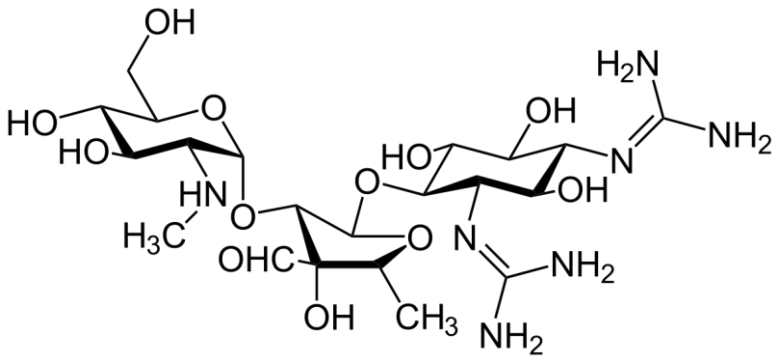
1.6.Antibiyotik Kalıntılarının Tespitinde Kullanılan Doğrulama Metodları

Uluslararası yetkili kuruluşlar tarafından gıdalardaki kalıntı tespiti ve doğrulanması konusuna bazı kısıtlamalar koyulmuştur. Teşhis amaçlı kullanılan yöntemlerin sıfır tolerans olarak belirlenmiş maddelerin tespitinde kullanılabileceği, bunun yanında miktarlandırmaya yönelik yöntemlerin ise maksimum kalıntı limiti belirlenmiş olanlar için gerekli olduğu Avrupa Komisyonunca belirtilmiştir (Brabander ve ark., 1996). Kalitatif analiz yöntemlerinden en bilineni ELISA analizidir. Bu yöntem antijen-antikor reaksiyonunun meydana gelmesi sonucunda enzim-substrat ilişkisi ile spektrofotometrede göürünür hale gelerek dedeksiyon edilmesine dayanmaktadır. Bu

yöntem ile alınan verilerin, MS ile doğrulanması elzemdir. (Rodziwicz, 2008). Antibiyotiklerin analizlerinde en yaygın olarak kullanılan teknikler: Kapiler elektroforez, sıvı ve gaz kromatografisi teknikleridir. Son yıllardaki araştırmalar, LC-MS tekniğinin diğer dedeksiyon sistemlerine göre daha seçici olması, hedef moleküle ait detaylı bilgiler vermesi ve uzun ön işlem gerektiren ve zaman alıcı prosedürlerin yerine kullanılması nedeniyle tüm kalıntıların teşhisinde yararlanılabilecek en hassas yöntem olduğunu ortaya koymaktadır. HPLC tekniği kullanılarak yapılan analitik yöntemler yerine, günümüzde kütle spektrometrelerinin varlığı ile LC-MS/MS'te geliştirilmiş analitik yöntemler tercih edilmektedir (Vinas ve ark., 2004). Kütle spektrometreleri, daha özgül ve kesin sonuçlar vermektedir. HPLC veya farklı tarama metodları ile dedekte edilmiş antibiyotik kalıntıları 2002/657/EC kararlarına göre MS sistemi ile doğrulanmalıdır. LC-MS sisteminin güvenirliğinin çok yüksek olarak değerlendirilmesi sebebiyle günümüzde, antibiyotiklerin tespiti için bu teknik kullanılarak düşük limitlerde ve birçok antibiyotik gruplarını tespit etmek adına çoklu analiz metotları geliştirilmeye devam edilmektedir (Nakazawa ve ark., 1999).

1.7. Aminoglikozitler ve Genel Özellikleri

Arı hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotik gruplarından biri olan aminoglikozitler gram-negatif bakteriler üzerinde protein sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösteren, geniş spektrumlu farmasötik moleküllerdir. Bu gruptaki antibiyotikler çeşitli streptomyces ve micromonospora türü mikroorganizmalardan elde edilen doğal veya yarı-sentetik bileşikler olabilmektedir. Amikasin, Apramisin, Dihidrostreptomisin, Gentamisin, Higromisin B, Kanamisin A, Neomisin, Netilmisin, Paromomisin, Spektinomisin, Streptomisin ve Tobramisin bilinen alt gruplarıdır. En sık bilinen alt grupları ise streptomisin ve dihidrostreptomisindir. Genel olarak, ısı ve değişik pH derecelerine dayanıklıdırlar. İçermiş oldukları amin grubu nedeniyle kuvvetli bazik yapıdadırlar ve alkali ortamlarda daha etkindirler. Etkilerine karşı hızla dirençli suşlar ortaya çıkabilir



Şekil 1. 1. Aminoglikozitlerden streptomisinin molekül yapısı

Kuvvetli bazik yapıda olduklarından polar özellik gösterirler ve yağda kolay çözünmezler. Vücutta sınırlı ölçüde dağılırlar. Hücrelere zor girerler. Anaerob ortamda bakterilere de zor girdikleri için etkileri zayıflar. Bazıları bakteriyostatik (streptomisin), bazıları bakterisit (gentamisin) etkilidir. Spektinomisin ve apramisin dışındakiler molekül olarak birbirlerine glikozidik bağlarla bağlanmış heksoz ve amino şekerlerden yapılmışlardır.

Arıcılıkta en sık karşılaşılan aminoglikozit grubu antibiyotikler Streptomisin, Dihidrostreptomisindir. Streptomisin 1947 yılında Selman Waksman ve ark. tarafından Strep.griseus kültüründen elde edilmiştir. Kuru toz halinde oda sıcaklığında 2 yıl etkisini korur. Ağızdan biyoyaralanımları düşük olduğu için parenteral verilmelidirler. pH 8'de gram (-) basillere pH 5.8'dekinden 20-80 kat daha fazla etkilidirler. Bu nedenle idrar yolu enfeksiyonlarının sağaltımında idrarı asit tepkimeli olan etçillerde idrar bazik hale getirilir (100-200 mg/kg sodyum bikarbonat). Kanatlılara Kİ 44-99 mg/kg uygulanır. Antibiyotik sonrası etkiye sahip oldukları için günde 1 kez uygulanmaları da yeterli olmaktadır. 1.25g streptomisin sülfatın 1g streptomisine eşit olduğu dikkate alınmalıdır.

1.8. Balda Aminoglikozit Analizlerinde Kullanılan Yöntemler

Aminoglikozit analizleri için piyasada özel sentezlenmiş antikorlar ile üretilen katı faz ekstraksiyon kartuşları veya ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kitleri bulunmaktadır. Buna karşın literatürde hassasiyet seviyeleri nispeten daha yüksek fakat

tekrarlanabilirlik açısından problemli olan kromatografik tekniklere dayalı yöntemler mevcut olup, rutin kalite kontrol laboratuvarları tarafından kullanılabilmektedir. Bu yöntemler genel olarak İyon Çifti Kromatografisi ve Kapiler Elektroforez tekniklerinin içerir ve bunlar Katı-Faz Mikroekstraksiyon, Katı Destekli Sıvı Faz Mikroekstraksiyon Temizleme teknikleri, kolon sonrası eş zamanlı türevlendirme, UV, FL Dedektörler, Kütle spektrometresi kombine edilir. Ancak bu tekniklerin de ön hazırlık süreçleri uzun ve yorucudur. Kapiler elektroforez (CE), iyonları elektroforetik hareketliliklerine göre uygulanan bir voltaj kullanarak, yüksek verimlilikte, düşük numune miktarı ve elektrolit tüketimi ile ayıran analitik tekniktir (Opekar ve ark., 2009).

Ters faz kromatografisi (RP-LC), Normal faz sıvı kromatografisine zıt olarak, hidrofobik etkileşimleri kullanmaktadır. Sabit ve mobil faz polariteleri ters olarak bilinmektedir. Sabit fazın yüzeyi hidrofobik ve mobil faz ise çoğunlukla polar bileşenlerden oluşur. Ters faz kromatografi, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin büyük çoğunluğunun analizlerinin gerçekleştirildiği en yaygın kromatografik tekniklerdendir.

İyon-Çifti Kromatografisi, yapılarında birden fazla amino grubunun bulunması nedeniyle AG molekülleri, çözeltide çok değerlikli katyonlar oluşturma eğilimindedirler. Bu tür katyonlar negatif yüklü bileşiklerle etkileşime girebilir. Ortaya çıkan iyon çiftleri AG'lerden belirgin şekilde daha az polardır. Bu LC ayrıştırması sırasında bu olgudan yararlanılabilir, LC kolonları kullanarak AG'lerin tutma ve ayırma seçiciliğini artırma polar olmayan sorbentlerle (örn. C8, C18, vb.) paketlenmiştir. Ana dezavantajlar IPLC kullanımının avantajları arasında kromatografik ömrün azalması ekipman ve kolonların yanı sıra kütle tespit problemleri spektrometri kullanılır. En yaygın kullanılan iyon çifti (IP) reaktifleri aşağıdakileri sağlar: en iyi AG ayırma, uçucu perflorlu organik maddelerdir. Asitler, örneğin heptaflorobütirik asit (HFBA), pentafloropropiyonik asit (PFPA) veya trifloroasetik asit (TFA). IP ajanları mobil faza %0,1 ile %1 (v/v) arasında değişen konsantrasyonlarda ile %1 (v/v) arasında değişen konsantrasyonlarda eklenir.

Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisi (HILIC), aminoglikozid antibiyotikler gibi polar, suda çözünen kimyasal bileşiklerin ayrılması istendiğinde kullanılabilir. Ancak analitin alıkonma davranışını tahmin etmek oldukça zordur çünkü mobil fazın bileşimi (organik bileşen yüzdesi ve türü), sabit fazın karakteri, pH, tampon türü ve konsantrasyonu, sıcaklık ve benzeri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. HILIC'te kullanılan

sabit fazlar arasında saf, diol, pentaflorofenil, siyanopropil veya amino-modifiye silika jeller bulunur. Bu fazlar, farklı sınıfların ayrıştırılması için kullanılabilir.

Bal matrisinde antibiyotik analizleriyle ilgili yapılan araştırmalarda aminoglikozit antibiyotiklerinin miktarını tayin etmek için birçok çalışma mevcuttur. HPLC, GC-MS, LC-MS bu amaçla kullanılan analitik yöntemlerden bazılarıdır. Kütle spektrometrisi yöntemleri, çok daha spesifiktirler. Yapılan çalışmalarda, kullanılan analitik cihazların farlılığına ek olarak, numune çeşidine bağlı olarak da farklı örnek hazırlama yöntemleri kullanılmıştır. Bu örnek hazırlama basamaklarında SPE yaygın olarak kullanılırken, LLE (Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu), Quechers teknikleri de uygulanmaktadır. Ayrıca aminoglikozit dedeksiyon çalışmalarında türevlendirme yaklaşımları ile de yayınlanmış çalışmalar mevcuttur.

1.9. Numune Ekstraksiyon Teknikleri

Literatürde en sık karşılaşılan numune ekstraksiyon teknikleri: Quechers, Dispersif SPE (d-SPE), Dilute & shoot (Seyrelt-Enjekte Et) tekniğidir.

Quechers tekniği ilk olarak pestisit kalıntısının analizi için uygulanmıştır. Bu yaklaşımda, tuzların ($MgS0_4$, NaCl) varlığında, su içeriği yüksek olan numunelerin, genellikle asetonitril veya etil asetat gibi organik çözücü yardımıyla ekstraksiyonu sözkonusudur. Tuz eklenmesiyle matriksin iyonik gücü artırılmış olur ve böylece ilgili analit organik solvente daha kolay difüze olur. 'Salting Out' olarak da bilinen bu basamakta sulu kısım ve organik arasında faz farkı oluşur. Pestisitler dışında antibiyotik kalıntıları için de yaygın olarak bu uygulama kullanılabilir.

Dispersive-SPE (d-SPE), 2000'li yıllarda icat edilmesinden bu yana yaygın olarak kullanılan, karmaşık matrislerden farklı analitlerin ekstraksiyon izolasyonu ve temizlenmesinde sıvı numunelerde katı bir sorbentin dağılmasına dayanmaktadır. Antibiyotik kalıntılarının belirlenmesinde d-SPE'de kullanılan sorbentler, afinitelerini değiştiren çeşitli kimyasal bileşiklerin eklenmesiyle kimyasal olarak modifiye edilmiş katılardır. Genellikle silika veya polimer bazlı katı bir sorbentin doğrudan numune çözeltisine eklenmesinden oluşur. Bu işlem SPE temizliğini basitleştirir, tek seferde daha fazla numunenin analiz edilmesini sağlar, oldukça hızlıdır ve düşük solvent tüketimi gerektirir. Hayvancılık endüstrisinde kullanılan çok çeşitli veteriner ilaçlarının

analitik işleminde bir ekstraksiyon, izolasyon ve temizleme yöntemi olarak başarıyla uygulanmıştır. d-SPE çeşitli alanlarda geniş bir uygulama alanı bulmuştur ve seçici, sağlam ve çok yönlü bir teknik olarak kabul edilmektedir. Dispersif tekniklerin farklı matrislerdeki veteriner ilaçlarının analizindeki uygulamaları arasında, manyetik sorbentler, moleküler baskılı polimerler, karbon bazlı nanomalzemeler ve Hızlı, Kolay, Ucuz, Etkili, Sağlam ve Güvenli (QuEChERS) yöntemi yer almaktadır. Birçok analit için iyi bir tekrarlanabilirlik ve yüksek geri kazanım sağlayan hızlı, kullanımı kolay ve düşük maliyetli bir tekniktir.

Dilute & shoot (Seyrelt-Enjekte Et) tekniğinde ise numune seyreltilip ve filtre edilerek cihazda enjeksiyona hazır hale getirilme prosedürüdür. Birçok avantaj ve dezavantaja sahip olan bir yöntem olarak bilinir. Numune hazırlama basamağının çok basit, kısa süreli ve maliyetsiz olması büyük avantaj sağlarken, analizde kullanılacak yönteme bağlı olarak cihaz ve diğer ekipmanlarda zamanla kirliliğe neden olabilmesi ve alınan sonuçların olası girişim nedeniyle yorumlanması esnasında zor durumlara sebep olabilmesi yönünden de dezavantaja sahiptir.

1.10. Aminoglikozit Analizlerindeki Analitik Problemler

Aminoglikozitlerin molekül yapılarına bakıldığında oldukça yüksek polariteye sahip, pKa değerinin yüksek ve bazik molekül yapısında olduğu görülmektedir. Bu polar yapıya sahip olmaları sebebiyle kütle spektromesinde iyonizasyonları düşüktür yani zayıf kromatografiye sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bu da düşük limitlere inmeye engel teşkil edeceği anlamına gelmektedir.

Aynı sınıf içerisinde polariteleri farklı olan moleküller metod geliştirme yönünden zorluk yaratmaktadır. Aminoglikozitlerin de degredasyon ve oksidasyon olasılığı (pH, sıcaklık, UV) gibi stabilite problemleri olabilmektedir. Ekstrakttaki potansiyel interferanslar ile konjügasyon afiniteleri, bağıl formda bulunma olasılığı (metal konjügasyonu, protein-peptit, şeker-glikozit afiniteleri vb.) ilaçların yapısını değiştirebilmektedir (Barbosa ve ark., 2007). Potansiyel interferans derken karbonhidrat yapıları, fenolikler, (protokateşinoik asit, 4-hidroksibenzoikasit) , glukonik asit gibi organik asti içerikleri sayabiliriz. Konjugasyon afinitesi ise , sulfanamid grubu antibiyotiklerin baldaki şekere bağlanması , tetrasiklin ve kinolon grubunun ise metallerle kompleks oluşturabilmesi değerlendirilmelidir.

Ön hazırlığı gerçekleştirilmiş olan numunede, dedekte edilecek olan aminoglikozit molekülün olası sıcaklığa veya UV ışınlara bağlı olası stabilite problemleri, inkübasyona ihtiyaç duyulması, oda sıcaklığında dedekte edilebilecek seviyede türevlenmiş sentez molekül oluşturulamaması, ön hazırlık kaynaklı tekrarlanabilirlik problemi, konsantrasyon farklılıklarının numunedeki reaksiyon stokiyometrisini bozması ve bunu takiben geri kazanım açısından farklı değerler elde edilebilmesi, tekrarlanabilirlik açısından problem teşkil etmesi, ekstrasyonda birden fazla solvent kullanımi gerekliliği, ön hazırlık veya cihaz için geliştirilen yöntemin belirtilmiş olan aminoglikozitlerden bazı moleküllere uygunsuzluğu, ekstaksiyon/stabilite ve/veya kromatografik ayrım açısından olası uygunsuzluklar gözlemlenmesi karşılaşılması olası analitik zorluklardandır. Son olarak, matriksin karmaşıklığı da dikkate alınmalıdır. Bal matrisi özelinde şunu da söylemek gereklidir; yüksek şeker konsantrasyonu, iyonizasyonun baskılanmasına yani düşük sinyal alınmasına sebep olurken, aminoglikozit yapılarının, şeker moleküllerine benzerliği de diğer bir analitik problem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Veteriner ilaç kalıntılarının düşük konsantrasyonlarda analiz edilmesi gerekliliği, diğer analitik problemlerden biridir. Bununla birlikte, geliştirilen analitik yöntemlerin düşük maliyetli olmalarının istenmesinden dolayı, mümkün olduğunca birçok bileşiği dedekte edebilen, çok aşamalı yöntemlerin geliştirilmesi kalıntıların analizinde oldukça önemli hale gelmiştir.

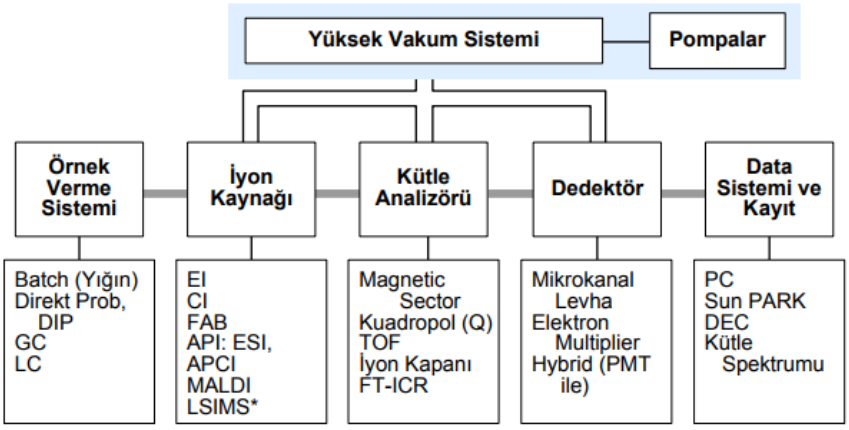
1.11. Aminoglikozitlerin Enstrümental Tayin Yöntemleri

Literatüre bakıldığında aminoglikozitlerin tayini ile ilgili genellikle ayırma teknikleri ile birlikte aminoglikozidlerin belirlenmesinde kullanılan dedeksiyon/ dedektörler şunlardır: Refraktif indeks dedektör (RID), doğal formdaki aminoglikozitlerin belirlenmesi gerçekleşirken, düşük hassasiyete sahip, izokratik elüsyonu tercih eden dedektördür. Ayrıca birçok kromatografik teknikler de mevcuttur. Bu yöntemler genel olarak iyon çifti kromatografisi ve kapiler elektroforez tekniklerinin içerir ve bunlar katı-faz mikroekstraksiyon, katı destekli sıvı faz mikroekstraksiyon temizleme teknikleri, kolon sonrası eş zamanlı türevlendirme, UV, FL Dedektörler, Kütle spektrometresi (Quadrupole kütle filtreli tandem ya da single quad ve TOF- Time of Flight Kütle filtreli sistemler) ile kombine edilir. Diode array dedeksiyon (DAD), çoğu

durumda analitlerin türevlendirilmesinin gerekli olduğu, RID ve ELSD'ye kıyasla daha iyi seçiciliği olan, geniş doğrusal yanıt aralığı ve yüksek güvenilirlikli sistemdir. Florosans dedeksiyon (FLD), analitlerin türevlendirilmesi gereklidir; DAD ile karşılaştırıldığında gelişmiş hassasiyet ve seçiciliğe sahip, hem LC hem de CE ile kullanılan sistemdir. Tandem kütle spektrometresi (MS/MS), son derece hassas ve seçici tespit yöntemi olup; çok bileşenli karışımların eşzamanlı tayini için en güçlü araçtır. Kapiler elektroforez (CE), özellikle düşük numune miktarı mevcut olduğunda tercih edilen kromatografik teknikler için uygun bir alternatiftir.

1.12. Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS)

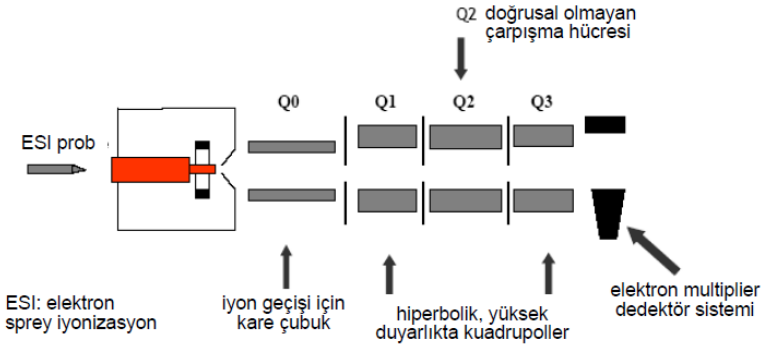
Kütle spektrometresi (MS) moleküllerin elektron iyonlaşması, parçalanması ve kütle / yük oranı (m/z) tayini ile ilgilidir. MS'de, moleküller iyon haline getirilir, parçalanır ve ardından bir kütle dedektörüne gönderilir. Buradaki ayrılma işlemi m/z oranlarına göre gerçekleşir. İyonlaşmadan sonraki işlemlerin tümü yüksek vakum altında gerçekleştirilir. Üretilen iyon akımı, hem kalitatif hem de kantitatif analiz için kullanılabilen ve orijinal analitin özelliğini taşıyan bir kütle spektrumu üretmek üzere kütle/yük oranlarına karşı çizilir.



Şekil 1.2. Kütle spektrometresine ait temel bileşenler

Genellikle, ilk kuadropolde molekülün sahip olduğu iyon seçilir. Ardından seçilen iyon, argon gazının içine sokulan ve çarpışma hücresi görevi gören ikinci bir kuadrupolde parçalanır. Oluşan fragmentler bir sonraki kısımda ayrılır ve bu teknik ayrım gücü

dolayısıyla klinik ve gıda analizleri gibi birçok alanda hızlı ve güvenilir sonuç veren bir teknik olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 1.3. Üç kademeli kuadropol kütle analizörü

Bu sistemin birçok avantajı vardır; karışım halindeki örneklerin analiz edilebilmesi, kısa sürede birçok parametrede eş zamanlı analiz imkanı tanıması, analizlerin düşük miktarda örneklerle yapılabilmesi, yalancı pozitif ve negatif sonuçların oranının düşük olması ve düşük maliyetli olması bu sistemin avantajlarındandır.

BÖLÜM 2. MALZEME VE METOT

2.1. Malzemeler

2.1.1. Bal örnekleri

Bu çalışmada kullanılan örnekler, ülkemizde arıcılığın en çok yapıldığı yerlerden toplandığı çiçek, çam, kestane ve narenciye ballarıdır. Alınan numune sayısı toplanan yerlere göre değişmekle birlikte, 2021 yılındaki numunelerden olmak üzere 57 tane çiçek, 24 tane çam, 15 adet narenciye ve 14 adet kestane balı olmak üzere toplam 110 adet olarak toplanmıştır. Numuneler cam kavanozlarda kapalı bir ortamda, düşük sıcaklıkta muhafaza edilerek analiz edilinceye dek bekletilmiştir.

2.1.2. Kimyasallar

- Formik asit (Supelco® Analytical Products, Darmstadt, Almanya)
- 9-Florenilmetoksikarbonil Klorür (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Benzoil klorür (BzCl, HPLC türevlendirme ≥ 99.0% Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
- Fenil izosiyanat (PIC, HPLC türevlendirme, LiChropur™, ≥ 99.0%) Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Asetik asit (Merck, Darmstadt, Germany)
- Asetonitril (Supelco® Analytical Products, Darmstadt, Germany)
- Metanol (Supelco® Analytical Products, Darmstadt Germany)
- Sodyum karbonat (Susuz, ≥ 99.5%, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Sodyum bikarbonat (Susuz, ≥ 99.5%, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Borik asit (Susuz, ≥ 99.9%, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Sodyum tetraborat dekahidrat (≥99.5%, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Streptomisin sülfat (HPC Standards GmbH, Cunnersdorf, Germany)
- Dihidrostreptomisin sülfat (HPC Standards GmbH, Cunnersdorf, Germany)

- Trimetoprim (HPC Standards GmbH, Cunnersdorf, Germany)

2.1.3. Gerekli Donanım ve Araç Gereçler

2.1.3.1. Kullanılan araçlar ve cam malzemeler

- pH metre (Ohaus ST 3100, New Jersey, USA)
- Terazi (Mettler Toledo TR, İstanbul, Türkiye)
- Ultrasonik Banyo (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Vortex karıştırıcı (IKA® Turkey Laboratuvar ve Proses Teknolojileri A.Ş.)
- Ultra Saf Su Sistemi (Milli-Q® Water Purification System, Darmstadt, Germany)
- Buzdolabı (Siemens, Munich, Germany)
- Balon joje 5-500 mL, (Labnet, Lab Network Store, Sarıyer, İstanbul)
- 15mL kapaklı Falkon santirfüj tüpü (Labnet, Lab Network Store, Sarıyer, İstanbul)
- Vial 2 mL, cam (Arkim Laboratuvar Malzemeleri Tic. A.Ş., Balgat, Ankara)
- Şırınga filtresi (PVDF, 0,22 μm) (Labnet, Lab Network Store, Sarıyer, İstanbul)
- 2,5 mL'lik steril plastik şırınga (Labnet, Lab Network Store, Sarıyer, İstanbul)

2.1.3.2. LC-MS/MS Sistemi ve Donanımı

- Waters Acquity model UPLC-MS/MS, Ultra Basınçlı Pompa, Oto-Örnekleyici, Xevo TQ-MS Dedektör (Waters, Milford, ABD)

2.1.4. Reaktiflerin Hazırlanması

2.1.4.1. Kullanılan Fazların ve Çözeltilerin Hazırlanışı

A Fazının Hazırlanışı

1L ultra saf su üzerine 50 µl Asetik Asit eklenir, çalkalanır ve birkaç dakika ultrasonik banyoda degaz edilerek hazır hale getirilir.

B Fazının Hazırlanışı

500 mL MeOH ve 500 mL ACN karıştırılarak 50 µl asetik asit eklenir, çalkalanır ve birkaç dakika ultrasonik banyoda degaz edilerek hazır hale getirilir.

Güçlü yıkama çözeltisi

0.5 L metanol üzerine 0.5 L asetonitril eklenir, çalkalanır ve birkaç dakika ultrasonik banyoda degaz edilerek hazır hale getirilir.

Zayıf yıkama çözeltisi

900 mL ultra saf su üzerine 100 mL MeOH konur. Çalkalanarak iyice karışması sağlanır.

Sodyum Karbonat Tampon Hazırlanışı:

pH 9.2 sodyum karbonat tamponu hazırlamak için, 0,080 L 200 mM Na_2CO_3 ile 0,920 L 200 mM $NaHCO_3$ çözeltisi karıştırılır. Bu tampon 4:1 oranında ACN ile karıştırılır ve bu son reaktif hem homojenizasyon hem de ekstraksiyon amaçları için kullanılır.

2.1.4.2. Ana ve Ara Stok Standartların Hazırlanması

Streptomisin sülfat, dihidrostreptomisin sülfat ve trimetoprim standartları (10,0 mg ± 0,05 mg) saflık seviyeleri dikkate alınarak titizlikle tartılmış ve 1000 mg/mL konsantrasyon elde etmek için 10 mL ultra saf suda ayrı ayrı çözülerek hazırlanır. Her bir stok standart çözelti, çalışma karışımı çözeltileri elde etmek için 1,0 mg/L ve 0,5 mg/L konsantrasyonlarına seyreltilir. Daha sonra soğukta saklanmak üzere buzdolabına

koyulur.Türevlendirme reaktifi olarak kullanılan Fmoc-Cl çözeltisi ise, ACN içinde çözülerek 0,2 M konsantrasyonda hazırlanmıştır.

2.2 Yöntem

2.2.1. Kalibrasyon ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

Kalibrasyon noktaları 0, 5, 10, 15, 20, 50, 100 µg/kg olacak şekilde her gün tazelenir. 15 mL'lik falkon tüpe 0,2 g bal tartılır, Tablo 2.1.'de belirtilen oranlarda reaktifler eklenir. 1,0 mg/L olarak hazırlanan STR ve DSTR ara stok çözeltilerinden 1:1 karışım yaparak 0,5 mg/L standart mix yapılır. (Mix S1) Daha sonra bunu da 1:10 oranında ultra saf su ile seyrelterek 0,05 mg/L Mix S2 standardını elde edilir. Bu iki standart karışımları kalibrasyon çizdirmek için boş bala spike yapılır. 15 mL' lik falkon tüpünde aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda eklemeler yapılır ve homojen hale getirilir. Filtre yardımıyla süzerek viale alınır ve enjeksiyona verilir.

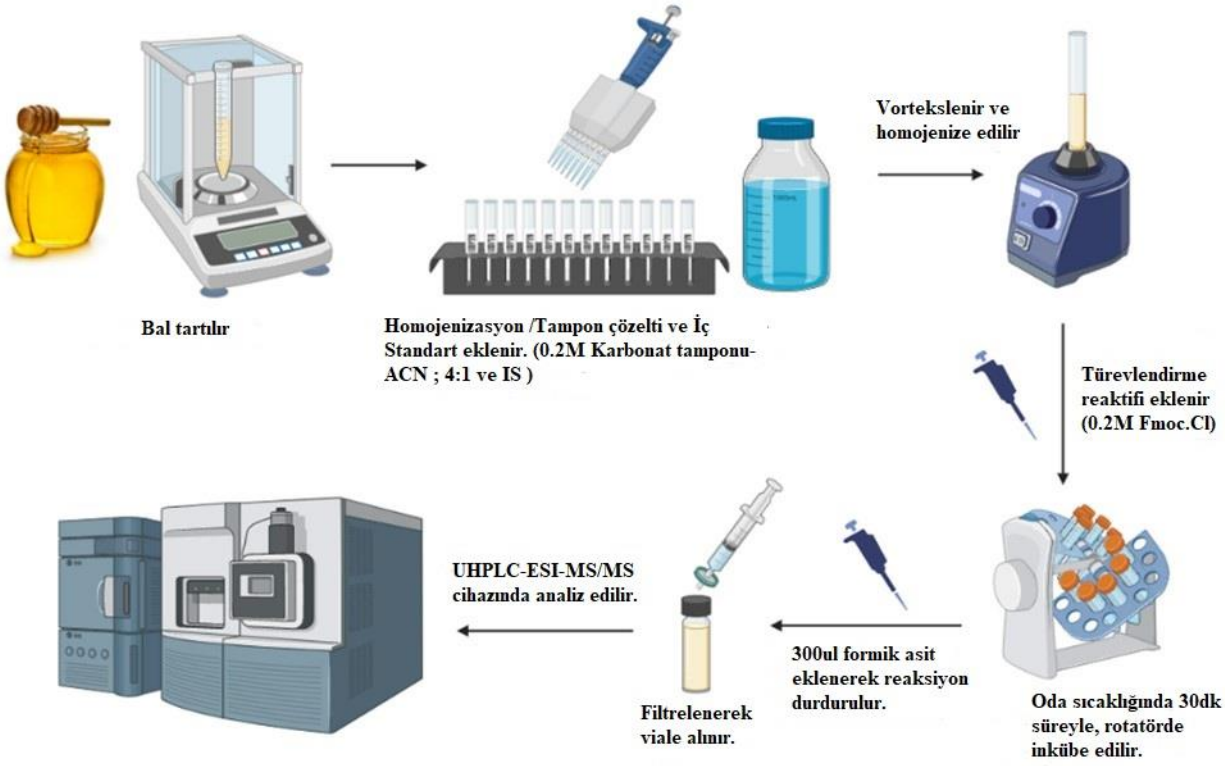
Tablo 2. 1. Kalibrasyon noktaları ve numune hazırlık tablosu

Kalibrasyon Nok. / Numune	**IS- (µl) (Trimethoprim iç standart)**	**Str+DStr Mix S_1 (µl)**	**Str+DStr Mix S_2 (µl)**	**Ekstraksiyon çözeltisi (µl)**
Blank	100	-	-	4000
5 ppb	100	-	20	3980
10 ppb	100	-	40	3960
15 ppb	100	-	60	3940
20 ppb	100	-	80	3920
50 ppb	100	20	-	3980
100 ppb	100	40	-	3960
Numune	100	-		4000

2.2.2 Numune Hazırlama Prosedürü

0,2 ± 0,005 g bal örneği 15 mL'lik falkon tüpe tartılarak üzerine 100 µl iç standart eklenir. Normalizasyon yaklaşımını gerçekleştirmek ve analiz sırasında herhangi bir numune ön işlemi ve/veya sisteme bağlı yanlılığı belirlemek için bu çözeltiye IS çözeltisi eklenir. 4,0 mL homojenizasyon/ekstraksiyon tamponu (sodyum-karbonat tamponu (pH 9,2)-ACN karışımı (4:1, v/v, %) numuneye eklenir ve çalkalanarak homojenize edilir. Daha sonra 1 mL 0.2 M Fmoc-Cl çözeltisi eklenir ve 20 saniye vortekslenir. Numune, döner çalkalayıcı kullanılarak sürekli çalkalanmak suretiyle

30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. 300 µL formik asit eklenir ve türevlendirme reaksiyonu sonlandırılır ve çalkalanır. Elde edilen çözelti bir şırınga filtresinden geçirilerek partiküllerden arındırılmış ve enjeksiyon için amber cam viale aktarılır. Vialler, cihazda ilgili yerine koyulur ve 50 µl enjeksiyon yapacak şekilde sisteme verilir.



Şekil 2.1. Numune Hazırlama Şeması

2.2.3. UHPLC / MS Yöntem Değişkenleri

Tablo 2. 2. UHPLC metot şartları

Kolon	Waters® Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm 50x2,1 mm
Mobil faz A	USS- %0,05 Asetik Asit
Mobil faz B	MeOH-ACN (1:1)- %0,05 Asetikik Asit
Kolon sıcaklığı	40 °C
Otosampler sıcaklığı	4 °C

Enjeksiyon hacmi	50 µl
Enjeksiyon türü	Kısmi loop
Zayıf Yıkama Çözeltisi	800 µl (90/10: USS/MeOH)
Güçlü Yıkama Çözeltisi	500 µl (%50 ACN- %50 MeOH)

Tablo 2.3. UHPLC faz akış programı

Süre (dak.)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)	Akış mL/dak.
0	95	5	0,35
2,50	95	5	0,35
3,50	5	95	0,35
3,51	95	5	0,35
5,00	95	5	0,35

Tablo 2.4. Kütle spektrometresi ve tune parametre değerleri

Kapiler Voltaj (kV)	1
Desolvatasyon Sıcaklığı (°C)	450
Desolvatasyon Gaz Akışı (L/saat)	850
Cone Akışı (L/Hr)	50
Low Mass Rezolüsyon 1	2,5
High Mass Rezolüsyon 1	14,00
İyon Enerji 1	0,8
İyon Enerji 2	1,5
Çarpışma Gaz Akışı (mL/dak.)	0,15

Tablo 2. 5. Metot kantitasyon parametreleri

İntegrasyon	Pik alanı
Tanımlama	Alıkonma zamanı, MRM Minumum 3 kütle 1 tanımlama 2 ölçme için
Kalibrasyon	İç standart ile Altı noktalı kalibrasyon
Kalibrasyon standartları	S0, S5, S10, S15, S20, S50, S100
Enjeksiyon	1x50µl

Tablo 2. 6. Kütle spektrometresinin akış halindeki valf programı

Zaman / Dakika	Aksiyon
0	Atık
2,00	Atık
2,01	Dedektör
4,50	Dedektör
4,51	Atık
5,00	Atık

2.3. Yöntem Geliştirme Çalışmaları

2.3.1. UHPLC-PDA Kullanılarak Yapılan Ön Araştırma Değerlendirmesi

Tahmin edilen türevlendirme ajanlarından hangisinin en etkili şekilde çalışabileceğini görmek için STR molekülü ile çeşitli türevlendirme ajanı uygun tamponlar kullanılarak ideal pH'da reaksiyona sokulmuştur. Benzoil klorür, fenil izosiyanat ve Fmoc.Cl ile paralel olarak test edilmiştir. Karbonat (pH; 9.2, 0.1M), borat tamponları (pH; 9.0, 0.1 M) ve alkali pH koşulları olarak TEA (ACN içinde %5, v/v) katkısı da AMG'leri etiketlemek için karşılaştırılmıştır. Bu ön araştırma analizinde STR, 5 mL 50:50 ACN: tampon (v/v, %) çözeltilerine sırasıyla 50, 100 ve 150 mg/mL konsantrasyonlarda eklenmiştir. Belirlenen türevlendirici ajanların 0.1M konsantrasyonda eklenmesinden sonra, reaksiyon kapları sürekli karıştırılarak oda sıcaklığında maksimum 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, çözeltiler filtrelendi ve reaksiyon durdurulmadan UHPLC sistemine enjekte edildi. Reaksiyon ürünleri ilk olarak Accela 600 pompa, Accela otomatik örnekleyici, kolon fırını ve Accela PDA dedektör ile donatılmış Thermo Scientific® Accela UHPLC sistemi (Waltham, Massachusetts, ABD) kullanılarak 200 ila 750 nm aralığında taranmıştır. UV spektrumları analiz edildi, ardından sabit dalga boyu seçeneği seçilerek numune yeniden enjekte edildi. Thermo Scientific® (Waltham, Massachusetts, ABD) C18 kolon (Hypersil 150 uzunluk x 4,6 mm i.d., 5 μm) kullanarak ve mobil fazlar olarak %0,1 formik asit içeren su ve ACN ile doğrusal bir gradyan elüsyonu kullanarak türevli moleküller kromatografik olarak incelendi. Kolon sıcaklığı 40◦C'de tutuldu ve enjeksiyon hacimleri 20 μL idi. Akış hızı 1 mL/dak ve analiz süresi de 10 dakika olarak belirlendi.

2.3.2 UHPLC kromatografi optimizasyonu

Kromatografik ayırma, Waters® (Milford, Massachusetts, ABD) ACQUITY UPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ters fazlı etkileşime dayalı ayırma, Waters® ACQUITY BEH (Bridge Ethylene Hybride) C18 kolon (2,1 mm i.d., x 50 mm uzunluk, 1,7 μm) üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Analiz metodunda yer alan ve enjeksiyonu yapılan her parametre yüksek derişimde saf standart olarak hazırlanmıştır. Parent (ana) ve parçalanma iyonları (daughter) tarama çalışması ile belirlenmiştir. Bu tarama sonunda bileşenlerin cone voltaj ve çarpışma enerjileri optimize edilerek MRM tablosu oluşturulnuştur.

Aşağıdaki maddeler özelinde denemeler yapılarak ve en ideal kromatografik şartlar belirlenerek metod son haline getirilmiştir ve bunlara ait sonuçlar Bulgular ve Tartışma bölümünde değerlendirilmiştir;

- Mobil fazı oluşturan solventlerin birleşme oranları test edildi (%50 ve %48 MeOH)
- Mobil fazın farklı akış hızları denendi: (0,35 ve 0,4 mL /dak.)
- Farklı gramlarda sodyum karbonat tartılarak hazırlanan ekstraksiyon tamponları test edildi (16,5g ve 21,2g).
- Kolon fırını farklı sıcaklıklarda denendi (35°C ve 40°C).
- Farklı saflıktaki asetonitrillerin kullanımı (Mass Grade ve UV Grade)
- Farklı oto örnekleyici sıcaklıkları test edildi (10°C ve 13°C).
- Türevlendirme reaksiyonunu durdurmak için kullanılan formik asit miktarı test edildi (0.30 ve 0.35ml)

2.3.3. MS Valfin Atık-Dedektör Zamanlamasının Ayarlanması

Metodun örnek hazırlama basamağında, numuneye herhangi bir clean-up (Temizleme) işlemi uygulanmamasına bağlı olarak, numunenin enjeksiyon sonrasında, sistem içinde bazı sorunlara yol açabilmektedir. Bu sorunlardan başlıca olanları; MS sistemi girişinde oluşabilecek kirlilik görülmesine dayalı sinyal düşmesidir. Balın yapısında bulunan yüksek şeker içeriği bu kirliliğe sebep olan başlıca etkendir. Bu şeker içeriğin direk MS

sistemine girişi engellenmezse, ilk olarak yüksek sıcaklık ve mobil faz desolvatasyonu dolayısıyla elektrosprey iğnesinde kalıntı birikmesine, tıkanıklığa veya kirliliğe sebep olabilir. Ardından da iyonların, vakum arayüzüne girdiği inlet kısmındaki parçalar üzerinde (cone) kirlilik ve kalıntıya neden olabilir. Numune hazırlama basamağında bertaraf edilmeyen şeker ve bunun dışındaki molekülleri kütle dedektörüne ulaşmadan atığa gönderebilmek ve bu sırada STR ve DSTR'nin kolonda alıkonmuş halde beklemesi için bir MS valf prosedürü geliştirilmesi gerekmektedir. Numune hazırlama prensibini, AMG'leri bir C18 kolonunda tutarken türevlendirilmemiş hidrofilik maddeleri atığa göndererek on-line bir temizleme gerçekleştirecek şekilde tasarladık. Sonrasında valf konumunu değiştirerek kolondan ayrılan grupları MS sistemine ulaşabilir hale getirmiş olduk. MS sisteminde hassasiyeti yüksek ve tekrarlanabilir analiz sonuçlar elde etmek adına MS valf programı ideal şekilde düzenlenmiştir.

2.3.4. Numune Hazırlık Optimizasyonu

Geliştirilecek metod için kullanılacak ekstraksiyon/tampon çözeltisi, cinsi ve seyreltme miktarı değerlendirilmiştir. Tampon sistemleri için fosfat, borat, sitrat ve EDTA tamponları, farklı pH değerlerinde ve farklı inkübasyon sıcaklıkları ve sürelerinde denemeler yapıldı. Bu denemelerde kullanılacak tampon cinsi ve pH seviyeleri cihazdan en yüksek seviyede sinyal alınabilecek şekilde değerlendirilmiştir. Homojenizasyon basamağında eklenecek çözelti miktarını belirlemek adına 4 mL, 5 mL ve 6 mL hacimleri test edilmiştir. (Tüm denemelerde iç standart 100 µl hacimde eklenmiştir.)

2.4. Yöntemi Geçerli Kılma Çalışmaları

2.4.1. Özgüllük

Aminoglikozit antibiyotiği içermeyen kör numune ile bilinen derişimde aminoglikozit standardı eklenen numune karşılaştırılarak, geliştirilen yöntem özgüllük açısından test edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen metodla blank (kör) numune ve bu bala 10 ppb düzeyinde AG standardı eklenerek çalışılmıştır. Ayrıca tez kapsamında çalışılan dört farklı orjininden numunelerle de çalışılarak sistemin seçiciliği test edildi ve farklı türdeki bal numunelerinin aminoglikozit antibiyotiklerinde interferansa neden olmadığı görülmüştür.

2.4.2. Aralık ve Doğrusallık

Metod içeriğindeki iki aminoglikozit antibiyotiği için minimum ve maksimum görüntülenebilir değerler belirlenerek için aralık ve doğrusallık çalışmaları çalışılmıştır. Bu yöntemle en düşük 5ppb ve en yüksek 200ppb seviyesi aralığındaki kalibrasyon sırası ile Blank-5ppb-10ppb-20ppb-50ppb-100ppb-200ppb olarak 7 noktalı, matris eşleşmiş olarak çizilmiştir.

2.4.3. Doğruluk

Bu tez çalışmasında, doğruluk (accuracy), aminoglikozitler için geri kazanım çalışması üzerinden değerlendirilmiştir. Çalışmalar, 5ppb / 20ppb / 100ppb konsantrasyonlarında 7 tekrarlı olarak hazırlanmış ve cihaza verilmiştir. Sonuçlara göre %RSD ve yüzde geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. AG bileşeni olmadığı bilinen bal numunesine 3 farklı seviyede derişimi bilinen miktarda antibiyotiklerin eklenmesi sonucu oluşturulan numunelerle gerçekleştirilmiştir.

2.4.4 Presizyon

Tez çalışmasında, gün içi tekrarlanabilirlik ve farklı günlerden oluşan tekrarüretilebilirlik çalışması kesinlik (presizyon) verilerini oluşturmuştur. Numune hazırlık prosedüründe düşük, orta ve yüksek olarak 3 farklı seviyede 7 tekrarlı 5 ppb / 20 ppb / 100 ppb konsantrasyonlarında numunelerle çalışılmıştır. Gün içi arası tekrarlanabilirlik testi için blank bal kirletilerek hazırlanmış bu düzeylerde aynı gün analiz edilmiştir. Ardından, iki analist tarafından, numuneler ardışık üç gün için günler arası ve analistler arası tekrarlanabilirliği belirlemek içinhazırlanmış ve cihaza verilmiştir. AG bileşenleri için üç farklı düzeyde % RSD değerleri üzerinden kesinlik değerleri belirlenmiştir.

2.4.5. Hassasiyet

Metodun validasyonunda, hassasiyet, tespit edilebilen en düşük limitlerden hesaplanan CCα ve CCβ değerlerinin belirlenmesiyle bulunmuştur.

2.4.6. Sağlamlık (Ruggedness)

Sağlamlık (Kararlılık) testlerinde, 2 farklı analist aynı numuneleri ve yöntemi kullanarak iki farklı cihaz üzerinde çalışmıştır. Sonuçlar ortalama geri kazanım olarak raporlanmıştır.

2.4.7. Kararlılık (Robustness)

Sağlamlık (Kararlılık), metod parametrelerini bilinçli olarak değiştirerek yapılan analizlerin sonuçlarına göre değerlendirilir. Bu çalışmada, kolon sıcaklığında ±5°C ve mobil faz akışında ±%10 değiştirilerek denemeler yapıldı. Bu çalışmalar 5 ppb düzeyinde karışım standardı eklenmiş bal numunesi kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, sonuçlardaki değişkenlikler %RSD üzerinden değerlendirilmiştir.

2.4.8. İç Standart Belirlenmesi

Cihazda enjeksiyondan kaynaklanan veya operatörün numune hazırlık basamağında yapmış olduğu bir hatadan dolayı analiz sonucunda oluşabilecek yanlış pozitif veya negatif sonuç vermeyi önlemek adına iç standart kullanılabilir. Tez çalışmasında iç standart olarak AG bileşenlerinin döteryum izotoplu halleri bulunmadığından, yapısı aminoglikozit bileşenlerine benzeyen ve balda bulunmayan bir molekül olan ve guanidyum içeren yapısı nedeniyle trimetoprimi seçtik. Bal örneklerinde trimetoprim kalıntısının bulunması durumunda, guanadrel, guanoksan, guanetidin veya fenformin gibi alternatif guanidin fonksiyonel grubu taşıyan moleküller de iç standart (IS) alternatifleri olarak değerlendirilebilir.

BÖLÜM 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE DEĞERLENDİRME

3.1. Araştırma Sonuçları

3.1.1. Numunelerin polen analizleri

Numunelerin testleri Balparmak Ar-Ge Merkezi'nde gerçekleştirildi. Mikroskobik analizler yardımıyla bal polenleri belirlendi ve bu sonuçlara göre analiz edilmek üzere dört farklı cinste ballar sınıflandırılmış ve analiz edilmiştir.

3.1.2. UHPLC optimizasyon sonuçları

Bu çalışmada, STR ve DSTR'nin ballarda UHPLC ile dedeksiyonuyla ilgili birçok değişkenin etkisi değerlendirilmiştir. UHPLC 'de Fmoc.Cl reaktifi kullanılarak farklı koşullar altında gerçekleştirilen bal matrisi varlığında türevlendirme reaksiyon verimlerinin karşılaştırma sonuçları değerlendirilmiştir. Tartılan bal miktarı, kullanılan Fmoc.Cl ajanı derişimi, inkübasyon süreleri, farklı tampon çözeltileri, türevlendirme reaksiyonunu durdurmak için kullanılan formik asitin miktarı parametreleri ayrı ayrı denenerek optimizasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

3.1.2.1 UHPLC-PDA Ön Araştırma Sonuçları

Türevlendirme ajanlarının çoğu UV kromoforlarına sahip olduğundan, optimizasyon çalışmasından önce UHPLC-PDA görüntüleme ile türevlendirme verimin performansını izlemenin makul olacağını düşündük. İlk olarak AMG'leri etiketlemek için kolon öncesi türevlendirme seçenekleri olarak birkaç türevlendirici ajanı test etmeyi amaçladık. Bunun için BzCl, PIC, etil kloroformat, 2,4-dinitroflorobenzen, N, N disüksinimidil karbonat, ninhidrin, o-ftalaldehit (OPA), sodyum 1,2 naftokinon-4-sülfonat ve Fmoc-Cl molekülleri incelenmiştir.

2,4-dinitroflorobenzen, N, N disüksinimidil karbonat, ninhidrin ve sodyum 1,2 naftokinon-4-sülfonatın belirgin STR türevleri üretmede başarısız olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle bu maddeler deneysel tasarımdan çıkarılmıştır. LC-MS analizi için alkil kloroformatlar kullanılarak amino asitlerin hem amino hem de karboksilik asit gruplarının türevlendirilmesi için kullanılabilecek bir yöntem, AMG'lerin eşzamanlı ölçümü için güçlü bir araç olarak değerlendirildi. Bu amaçla, etil kloroformat

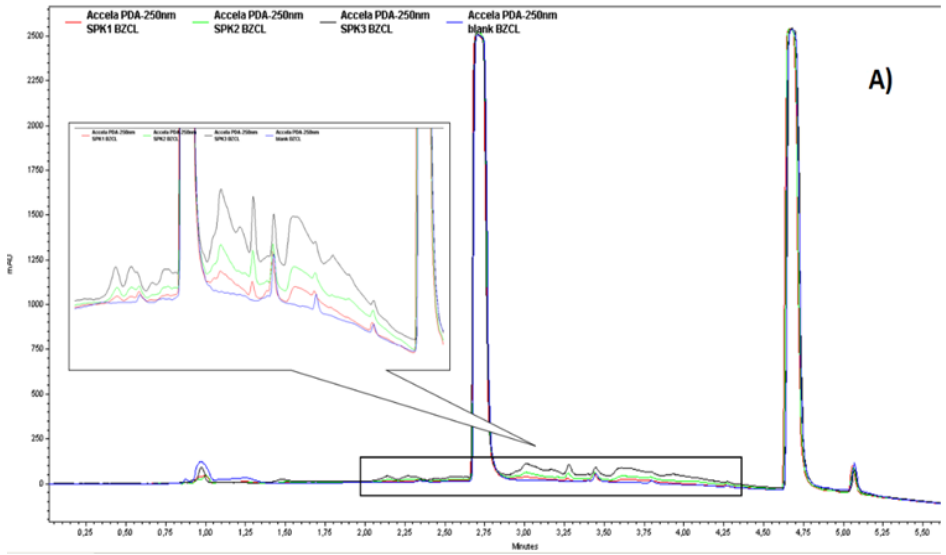
kullanmayı amaçladık. Ayrıca, literatüre göre OPA reaktifinden floresan izoindollerin oluşumu, türevlendirilecek molekül üzerinde serbest bir amino grubu da gerektirmektedir. Bu nedenle, bu ajanların STR ve DSTR hedefleri için çok yönlü türevlendirme reaktantları olduğu tahmin edilmektedir.

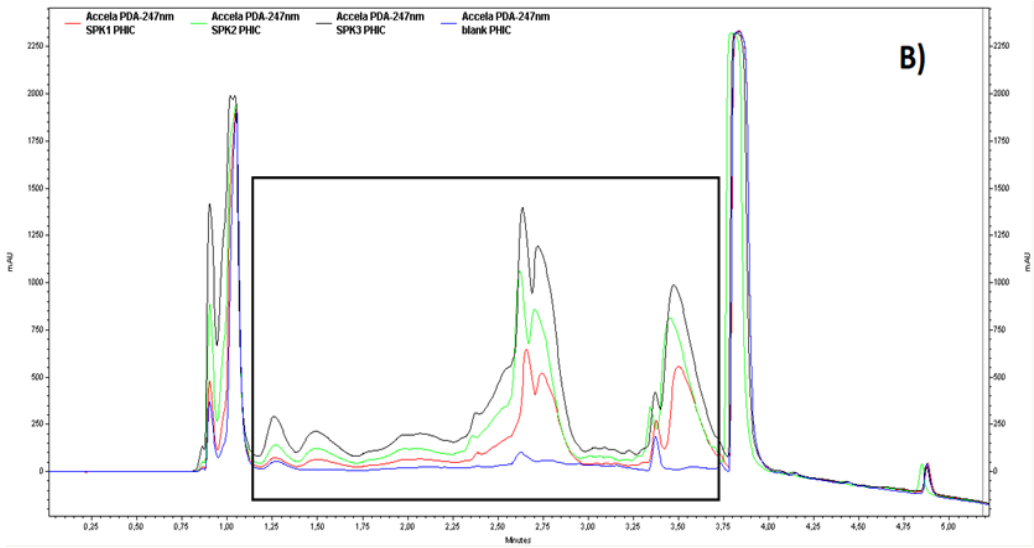
Tasarlanan reaksiyonlar piridin veya pikolin gibi organik bir baz tarafından katalize edilen organik fazlarda gerçekleşmelidir. Nihai ürünlerin uçucu doğası ve elde edilen apolar türevlerin sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve ardından çözücü değişimi uygulaması kullanılarak organik çözücü ekstraksiyonu gibi potansiyel ön koşullar, seyrelt ve enjekte et metodolojisinin uygulanmasının önündeki en büyük engellerdi. Uygulama ayrıca numune hazırlama iş akışının süresini uzatmış ve analizin yüksek maliyeti öngörülmüştür. Ayrıca, bal çok karmaşık bir gıda maddesidir ve türevlendirici reaktif, matrise bağlı birçok bileşiğin nükleofilik kısımları tarafından saldırıya uğrayabilir. Bu nedenle, çoklu fonksiyonel gruplar (örneğin amin, karboksil, aldehit, hidroksil) için türevlendirme reaktifi, özellikle AMG'ler için ideal bir yanıt elde etmek için uygun değildi. Sulu ortamda çalışabilen BzCl, PIC ve Fmoc.Cl ajanlarının etiketleme etkinliklerini karşılaştırmalı olarak değerlendirdiğimizde, BzCl ve PIC ajanlarının kullanıldığı deneylerin doğrusal STR konsantrasyonlarında çoklu AMG türevleri ürettiği gözlemlenmiştir. STR moleküllerinin işaret edilen ajanların birden fazla primer amin fonksiyonel kısmından bağlanması moleküler boyutu büyük ölçüde artırmış ve homojen bir dağılımı vurgulamamıştır. STR'lerin bir kısmı belirtilen türevlendirme reaktanları ile tek noktadan bağlantı kurarken, STR'lerin diğer kısımları birden fazla noktadan konjugasyon yapmıştır. Bu durum nihai üründe varyasyona neden olmuş ve böylece STR sinyalinde bölünme meydana gelmiştir. Minyatürize edilmiş pratik numune hazırlama amaçlandığından, uzun inkübasyon süresi gerekliliği de uygun görülmemiş ve tüm bu vurgulanan nedenlerden dolayı istenen hassasiyet elde edilememiş ve bu analitik yaklaşımlar da elemine edilmiştir. Öte yandan, Fmoc-Cl reaktifinin sadece birincil ve ikincil aminlere karşı bir afinitesi olduğunu biliyoruz (Ziegler & Abel, 2014). STR ve DSTR'deki guanidyum fonksiyonel grupları tarafından sağlanan birincil aminler, Fmoc-Cl için yüksek bir afinite sunmaktadır. Ön deneylerimizin bir sonucu olarak, Fmoc-Cl reaktifinin sulu bir çözeltide hızlı türevlendirme etkinliği gösterebildiği gözlemlenmiştir. STR molekülünü oda sıcaklığında ve sulu çözeltide kısa bir inkübasyon süresinde tek tip türevler olarak

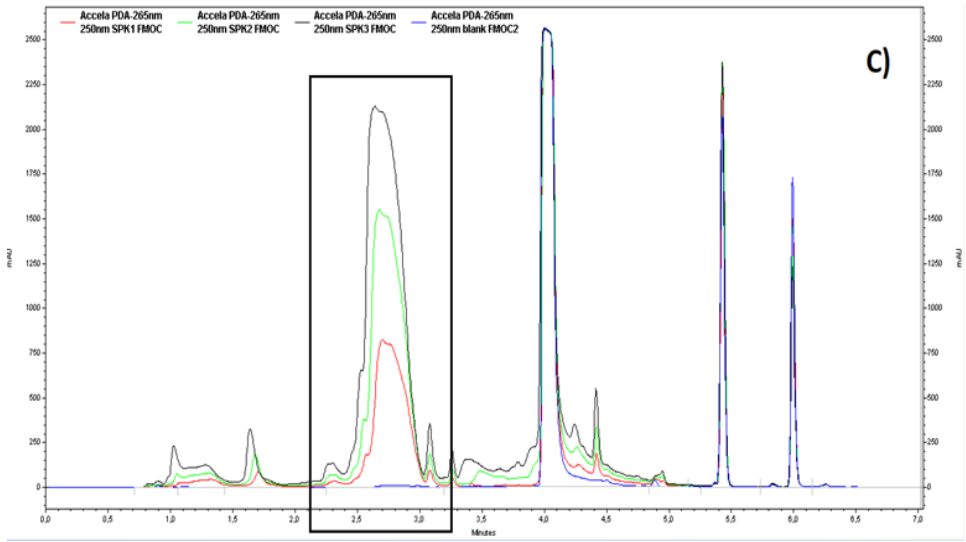
doğrusal konsantrasyonlarda türevlendirebilmektedir. Diğer türevlendirici ajanlara kıyasla birden fazla ürün oluşumu, ilave organik çözücü ekstraksiyonu gerekliliği gibi durumların olmadığı tespit edilmiştir. Fmoc kullanılarak yapılan bir başka deneyde de Fmoc-STR konjugatının sinyalinin 30 dakikaya kadar doğrusal olarak arttığı ve daha uzun sürelerin sinyale katkı sağlamadığı gözlemlenmiştir. Karşılaştırma sonuçları LC kromatogramları olarak Şekil 3.1'de verilmiştir.

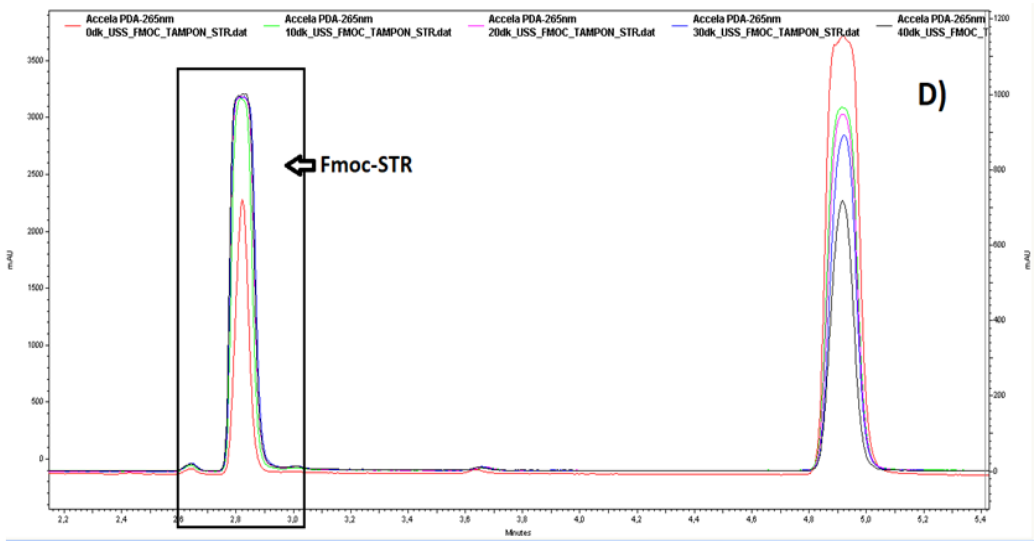
Ayrıca Fmoc'un bu reaksiyonu nispeten düşük maliyetle ve toksik etkiler olmadan gerçekleştirmek için elimizdeki tek reaktif olduğu düşünüldü. Bu bağlamda, tüm optimizasyon testleri uygun türevlendirme ajanı olarak yalnızca Fmoc-Cl seçilerek gerçekleştirilmiştir. Fmoc-Cl genellikle kromofor gruplar sunan türevlendirme ajanı olarak kullanılırken (Mohammadi ve ark., 2013), bu çalışmada yüksek apolar yapısı nedeniyle STR ve DSTR'ye RP koşullarında tutulma yeteneği kazandırmak için seçilmiştir. Ters faz kromatografi koşulları, MS'de HILIC koşullarına göre daha yüksek iyonizasyon sağlar. Bu açıdan STR ve DSTR moleküllerinin hassas ölçümü için türevlendirme sonrasında HILIC yerine RP koşullarında analiz mümkün hale gelmiş ve böylece yüksek verimli hassas bir analiz gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca, Fmoc-Cl'nin yüksek iyonizasyon kabiliyeti nedeniyle, geliştirdiğimiz yöntem STR ve DSTR'ye bağlı Fmoc konjugatlarının düşük seviyeli konsantrasyonlarını ölçme imkanı sağlamıştır. Yöntem geliştirmenin sonraki adımlarında, bal matrisini dahil ederek ve MS sisteminde reaksiyonu izleyerek devam edildi. Bal matrisi de reaksiyon tüpüne dahil edildiğinde maksimum verim elde etmek için optimum koşulları derinlemesine araştırıldı.

(Şekil 3.1. UHPLC-PDA sisteminde uygun türevlendirici ajanı belirlemek için yapılan ön araştırmaların sonuçları. A)BzCl kullanılarak gerçekleştirilen türevlendirme reaksiyonu sonucunda doğrusal STR konsantrasyonlarında çoklu türev ürünlerinin oluşumunun kromatogramı; B)PIC kullanılarak gerçekleştirilen türevlendirme reaksiyonu sonucunda doğrusal STR konsantrasyonlarında çoklu türev ürünlerinin oluşumunun kromatogramı; C)Fmoc.Cl kullanılarak gerçekleştirilen türevlendirme reaksiyonu sonucunda doğrusal STR konsantrasyonlarında tek bir türev ürünü oluşumunun kromatogramı; D)Fmoc.Cl kullanılarak uygun inkübasyon süresini belirlemek için yapılan çalışmaların kromatogram karşılaştırmaları olarak gösterilmesi)


Accela PDA-250nm SPK1 BZCL
Accela PDA-250nm SPK2 BZCL
Accela PDA-250nm SPK3 BZCL
Accela PDA-250nm blank BZCL
A)
mAU
Minutes


Accela PDA-247nm SPK1 PHIC
Accela PDA-247nm SPK2 PHIC
Accela PDA-247nm SPK3 PHIC
Accela PDA-247nm blank PHIC
B)
mAU
Minutes


Accela PDA-265nm 250nm SPK1 FMOC
Accela PDA-265nm 250nm SPK2 FMOC
Accela PDA-265nm 250nm SPK3 FMOC
Accela PDA-265nm 250nm blank FMOC2
C)
mAU
Minutes


Accela PDA-265nm 0dk_USS_FMOC_TAMPON_STR.dat
Accela PDA-265nm 10dk_USS_FMOC_TAMPON_STR.dat
Accela PDA-265nm 20dk_USS_FMOC_TAMPON_STR.dat
Accela PDA-265nm 30dk_USS_FMOC_TAMPON_STR.dat
Accela PDA-265nm 40dk_USS_FMOC_
D)
Fmoc-STR
mAU
Minutes

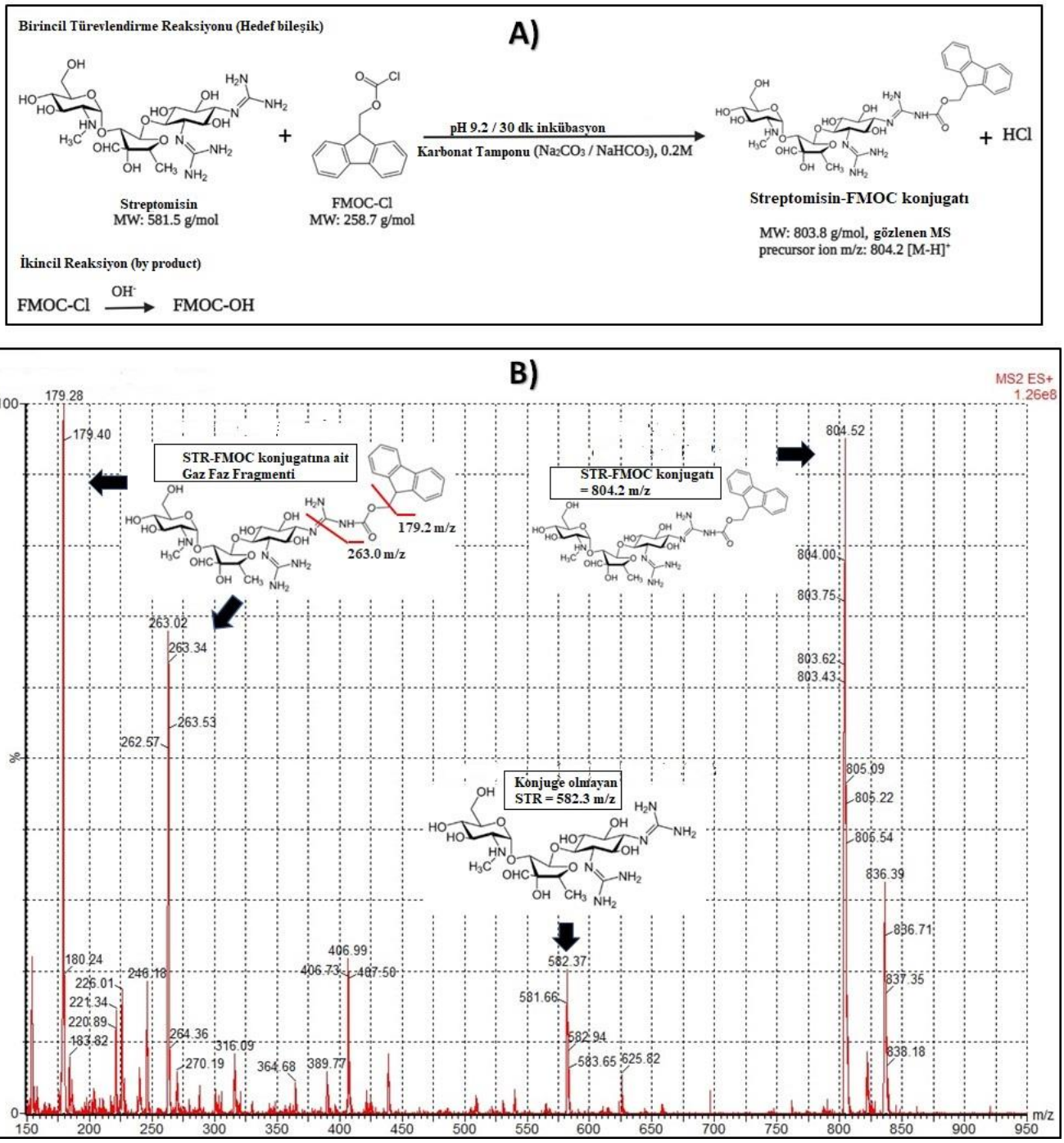
3.1.2.2. Aminoglikozit Analizleri İçin Seyrelt ve Enjekte Et Ön İşleminin LC-MS Sistemi ile Birleştirilmesi

Bal örneklerinde AMG'lerin LC-MS/MS analizinde, yüksek oranda bulunan şekerler, mineraller, amino asitler, fenolikler ve organik asitler güçlü matris etkileri yaratabilir ve zayıf kromatografik çözünürlüğe ve düşük hassasiyete neden olabilir (Machado De-Melo ve ark., 2018). Bu kompleks içerik, hedef analitlerin iyonizasyon verimliliğini de etkileyebilir. Balda eser miktarda kalıntıyı izleyebilmek için AMG'leri yukarıda bahsedilen hidrofilik ortamdan ayırmak gerekir. AMG'lerin oldukça polar guanidinyum ve glikozidik bağları nedeniyle, hedeflenen analitler, belirtilen hidrofilik moleküllerin çoğuyla benzer tutunma ve ekstraksiyon özellikleri gösterir. Bu nedenle, AMG'lerin primer aminlerini hedef alarak hızlı bir şekilde türevlendirilmesinin, amin grubu taşımayan moleküllerden (organik asitler, mineraller, fenolikler, şekerler vb.) ayırt edebileceğini öngördük. Etiketleme(türevlendirme) metodolojisi, uygun türevlendirici ajanı seçerek AMG'leri ters faz kimyasında tutmamıza da olanak sağlayabilir. Numune hazırlama prensibini, AMG'leri bir C18 kolonunda tutarken türevlendirilmemiş hidrofilik maddeleri atığa göndererek on-line bir temizleme gerçekleştirecek şekilde tasarladık. AMG'lerin elüsyon zamanından hemen önce MS gömülü altı portlu yönlendirme valfinin konumunu değiştirerek, zayıflatılmış matris etkisi ile yanıtlar almayı başardık. Türevlendirme stratejisi, STR ve DSTR'nin yüksek oranda hidrofilik matris ortamında spesifik olarak ekstraksiyonu ve ardından görüntülenmesi için zorunlu olmuştur. Bu analitik yaklaşım aynı zamanda seyrelt ve enjekte et tekniğinin uygulanmasının da yolunu açmıştır.

3.1.2.3 Tek Tüp İçinde Sulu Fazda Türevlendirme ve Seyrelt-Enjekte Et Metodunun Optimizasyonu

Bal çok sayıda UV aktif bileşiğe sahiptir, bu nedenle optimizasyon deneylerini MS tabanlı bir platforma aktarmak ve Fmoc bağlantılı STR ve DSTR aramak, veri değerlendirmesi yapmak için daha spesifik, karmaşık olmayan ve öne çıkan bir yol olurdu. Bu nedenle, ilk olarak Fmoc.Cl-STR reaksiyonunu bal matrisi olmadan gerçekleştirdik. Precursor iyonlarını bulmak için Quadrupole 1 (Q1) taraması ve ardından çarpışma kaynaklı parçalanma ile oluşan daughter iyonlarını bulmak için Quadrupole 3 (Q3) taramasından sonra, optimizasyon çalışmaları sırasında etiketli

AMG'lerin hassas ve seçici bir şekilde izlenmesini sağlayan bir SRM acquisition (edinim) tablosu oluşturduk. Optimize edilmemiş STR türevlendirme reaksiyonunun türevlendirme şeması ve kütle spektrumu aşağıdaki şekilde belirtilmektedir.



Şekil 3.2 A) Türevlendirme reaksiyon şeması; B) Optimize edilmemiş STR-Fmoc türevlendirme reaksiyonu kütle spektrumu.

Oluşturulan SRM'leri kullanarak inkübasyon sürelerini ve sıcaklıklarını, tamponlama pH'larını, homojenizasyon tampon konsantrasyonlarını ve bileşimlerini, türevlendirici ajan molaritesini ve optimum reaksiyon stokiyometrisini, reaksiyon durdurma koşullarını, kullanılan numune miktarını ve eklenen reaktiflerin hacimleri test edildi ve karşılaştırıldı. Farklı gramajlarda bal kullanılarak yapılan optimizasyon deneylerinde, yüksek miktarların MS sisteminde iyoniazyonu baskıladığı ve ayrıca türevlendirme reaksiyonunun stokiyometrisini olumsuz yönde etkileyerek verimi önemli ölçüde düşürdüğü anlaşılmıştır. STR ve DSTR dışında balda türevlendirici ajanların afinite gösterebileceği ve reaksiyona girebileceği birçok bileşen bulunmaktadır. Bu durum optimum türevlendirme reaksiyonu için gerekli stokiyometriyi olumsuz etkilemiş ve bozmuştur. Bal matriksindeki amino asitlerin, vitaminlerin, enzimlerin, arı sütü proteinlerinin amin kısımları tarafından sunulan N terminali, türevlenme reaksiyonu için uygun fonksiyonel gruplar oluşturur ve yüksek geri kazanım ile hedef moleküllerin türevlendirilmesini değiştirebilir. Bu nedenle, deneysel gözlemler doğrultusunda, gerekli hassasiyeti karşılayabilen ve olumlu geri kazanım değerleri veren numune ağırlığı olarak 200 mg seçilmiştir.

Ayrıca, AMG'lerin kısa sürede tam olarak türevlenmesi için reaksiyon kabında fazla türevlendirici reaktif bulunmalıdır. Bu nedenle, optimum stokiyometriyi elde etmek için, türevlendirme reaktifinin 0,05 M ile 1 M arasındaki doğrusal konsantrasyonu test edilmiş ve uygun molarite olarak 0,2M olarak belirlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonların STR ve DSTR yanıtlarını değiştirmediği, ancak daha düşük konsantrasyonların, türevlendirici ajanın reaksiyon kabında daha yüksek molaritede olması gerektiğini gösteren zayıflamış sinyaller gösterdiği gözlemlenmiştir. Birçok antibiyotik konjuge formdadır ve ekstraksiyondan önce ilgili hedefin serbest bırakılması için enzimatik veya kimyasal hidroliz gerektirebilir. Sülfasyon, glukuronidasyon veya proteinlere ya da metallere bağlanma eğilimi gibi konjugasyon etkileşimleri ilaçların yapısını değiştirebilir (Barbosa ve ark., 2007). Amin içeren bileşikler silika yüzeylere yapışmaya eğilimlidir. Bu nedenle, cam LC vialleri gibi cam malzemelerin kullanılması, AMG analizinde spesifik olmayan bağlanmaya ve analit kaybına neden olabilir. Bu araştırmada türevlendirme kimyası bağlanma sorununu önlemiş ve bu dezavantaj da ortadan kaldırılarak başarılı bir ekstraksiyon verimi elde edilmiştir.

İnkübasyon sıcaklığı ve süresi de optimize edilmiştir. Ampirik çıktılar, kademeli olarak artan inkübasyon süresinde yapılan bir araştırmadan sonra 30 dakikalık inkübasyon süresinin tam türevlendirme için yeterli olduğunu göstermiştir. STR ve DSTR kalıntılarının farklı konsantrasyonlarını uygulayarak belirlenen reaksiyon koşullarını derinlemesine araştırıldı. Bu deney kapsamında, daha yüksek kalıntı konsantrasyonlarının reaksiyon stokiyometrisini bozup bozmadığı kontrol edildi. Hem STR hem de DSTR'nin 2000 ug/kg'a kadar olan konsantrasyonları eş zamanlı olarak test edildi ve reaksiyonun dinamik aralığı daha yüksek konsantrasyonlar için de doğrulanmıştır. Bu yöntemde denenecek homojenizasyon reaktifinin uygun hacmi, pH'ı, bileşimi ve molaritesi de araştırılmıştır. Balın pH'ı 3.5 ile 5.0 arasındadır ve bu asidik yapı amaçlanan türevlendirmeyi azaltabilir. Balın alkali koşullarda tamponlanması, yüksek verimli in-situ sulu fazda Fmoc-Cl türevlendirmesi için gereklidir çünkü alkali pH'da Fmoc reaksiyonunun hızlı ve sağlam olduğunu biliyoruz (El-Enany ve ark., 2011). Bunun için, bal çözeltilerinin pH'ını ayarlamak üzere 2 farklı alkali tampon bileşimi test edildi. Test ettiğimiz reaktifler arasında karbonat tampon ve borat tampon çözeltileri karşılaştırıldı. Reaktifler maksimum sinyallere (pik alanları) ve geri kazanımlara göre değerlendirilmiştir. Ayrıca, homojenizasyon reaktifi hacmi, bal çözeltisinin viskozitesini ayarlamak için uygun bir hacimde olmalı, şırınga filtresinden geri basınç olmadan geçebilmeli ve kolayca enjekte edilebilmelidir. Öte yandan, belirleme hacmi tespit limitini tolere etmek için yeterli olmalıdır. Daha yüksek seyreltmeler istenen miktarların tespit edilmesini engelleyebilir. Bu varsayımlara göre, 4 mL reaktif hacmi en uygun hacim olarak bulunmuştur. AMG'lerin pik alanları ve geri kazanımları, en iyi ekstraksiyon verimlerinin karbonat tamponu ile pH 9.2'de elde edilebileceğini göstermiştir. 0,2 M karbonat tamponu, 200 mg bal ve 4 mL homojenizasyon tamponu tercih edildiğinde nihai bal çözeltisinin pH değerini 9.2'ye başarıyla ayarlamıştır.

Fmoc-Cl türevlendirme reaksiyonu sırasında, sodyum karbonat tamponunun yarattığı alkali ortam nedeniyle yan ürün olarak Fmoc-OH oluşabilir. Yan ürünün yüksek konsantrasyonu iyonizasyonu bastırır ve taşınma sorununa neden olabilir. Bu sorunu çözmek için, inkübasyon işleminden sonra, türev reaksiyonu alkali pH düşürülerek durdurulmalıdır. Durdurucu reaktif, MS uyumlu uçucu doğası ve düşük miktarının türevlendirme reaksiyonunu durdurmak için pH'ı düşürebilmesi nedeniyle formik asit

(FA) olarak seçilmiştir. Eklenen formik asit miktarı, pH'ı düşürebilecek ancak numuneyi çok seyreltmeyecek optimum hacim ve konsantrasyonu bulmak için kademeli olarak test edilmiştir. Bunun için 350 µL MS kalite FA yeterli bir miktar olarak belirlenmiştir. Hesaplanan pik alanları olarak genel karşılaştırma verileri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Balda Fmoc.Cl ajanı kullanarak farklı koşullarda gerçekleştirilen türevlendirme reaksiyon verimlerinin karşılaştırma sonuçları.

Deneyler	Değişkenler	STR-Fmoc[a] Pik Alanı (20 µg/kg konsantrasyonda TIC[b])
Bal Tartımları	1000 mg	9212
	500 mg	14230
	200 mg[c]	15617
	100 mg	8102
Fmoc.Cl Konsantrasyonları	1 M	16021
	0,5 M	15418
	0,2 M[c]	15617
	0,1 M	12170
	0,05 M	6229
Oda Sıcaklığında İnkübasyon Süreleri	60 dk	15625
	50 dk	14985
	40 dk	15755
	30 dk[c]	15617
	20 dk	14733
	10 dk	11621
	Başlangıç	4825
Homojenizasyon/ tampon çözeltileri ve pH'ları	0,2 M Karbonat Tamponu (pH 9.2)[c]	15617
	0,2 M Karbonat Tamponu (pH 8.5)	12350
	0,2 M Karbonat Tamponu (pH 8.0)	11922
	0,2 M Borat Tamponu (pH 9.0)	4871
	0,2 M Borat Tamponu (pH 8.5)	4988
	0,2 M Borat Tamponu (pH 8.0)	3717
Reaksiyon durdurucu hacimleri	700 µL FA ekleme	13560
	300 µL FA ekleme [c]	15617
	150 µL FA ekleme	14920

Her bir değişken, önceden tanımlanmış ideal koşullar altında diğer optimizasyon parametreleri sabit tutularak UHPLC-PDA analizi ile değerlendirilmiştir. UHPLC-PDA ön testi önceden belirlenmiş 30dk inkübasyon süresi, pH 9.2'de 0,2 M karbonat tamponu ve 0,2 M Fmoc.Cl analitik koşullarında konfirmedir. [a]STR-Fmoc; Türevlenme ürünü olarak görüntülenen Fmoc bağlı Streptomisin molekülü, [b]TIC; Total İyon Kromatogramı, [c]Belirlenmiş (ideal) koşullar.

3.1.2.4 Kütle spektrometresi edinim (acquisiton) optimizasyonu

LC/MS-MS metodolojisi, baldaki AMG'lerin eş zamanlı tespiti için hassas bir tekniktir (Farouk ve ark., 2015). Precursor (ana) iyonlarının ağırlıklı olarak [M+H]+ olarak bulunduğu ve MS/MS koşulları altında türeve özgü daughter iyonları oluşturmak için çarpışma kaynaklı disosiyasyon (CID) ile seçildikleri ve parçalandıkları deneyimlenmiştir. MS/MS koşulları altında her bileşik için en az iki daughter iyonun oluşması SRM geçişlerinin elde edilmesine yol açar. Bileşiğe özgü MS parametreleri, LC kombine akış durumunda her bir bileşiğin türevlendirilmiş standart çözeltisinin (100 µg/L) doğrudan infüzyonu ile belirlenmiştir. Standart infüzyon ile birleştirmek için başlangıç koşulunda mobil faz A ve B (95:5, v/v) kullanılmış ve SRM optimizasyonu pozitif ESI modunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen precursor iyonlarından cone voltajı ve çarpışma enerjisi optimize edilerek daughter iyonları elde edilmiştir. Precursor iyonlarından en bol bulunan geçiş miktar tayini için kullanılırken, diğer geçişler tanımlama için kullanılmıştır. STR türevlendirme deneyi ilk olarak optimize edilmemiş reaksiyon koşulları altında Fmoc etiketleme verimliliğini görmek için gerçekleştirilmiştir. MS spektrumundaki temel pik 804,5 m/z'de STR-Fmoc konjugatı olarak görülebilir. Elde edilen Fmoc-bağlı STR ürününün konjuge olmayan STR (582,3 m/z) ve gaz fazı fragmanları (179,2 m/z ve 263,0 m/z) da izlenmiştir ki bu da öngörülen türevlendirme reaksiyonunun doğrulayıcı bir kütle spektrumu gösterimi olarak ifade edilebilir. Türevlendirme araştırması sırasında, yalnızca Fmoc etkin konjugasyonunu görmek için fazla STR ve optimize edilmemiş koşullar kullanılmış ve bu durum MS spektrumunda serbest (konjuge olmayan) STR görülmesinin nedeni olarak değerlendirilmiştir. DSTR ve trimetoprim (IS) molekülleri için aynı reaksiyon modelleri gözlenmiştir. Guanidinyum içeren yapısı nedeniyle trimetoprim seçildi. Bal örneklerinde trimetoprim kalıntısının bulunması durumunda, guanadrel, guanoksan, guanetidin veya fenformin gibi alternatif alkaloid bazlı guanidin fonksiyonel grubu taşıyan moleküller de iç standart (IS) alternatifleri olarak değerlendirilebilir. Ön STR türevlendirme reaksiyonundan elde edilen belirgin kütlelerin gösterimi Şekil 3.2'de kütle spektrumu olarak verilmiştir.

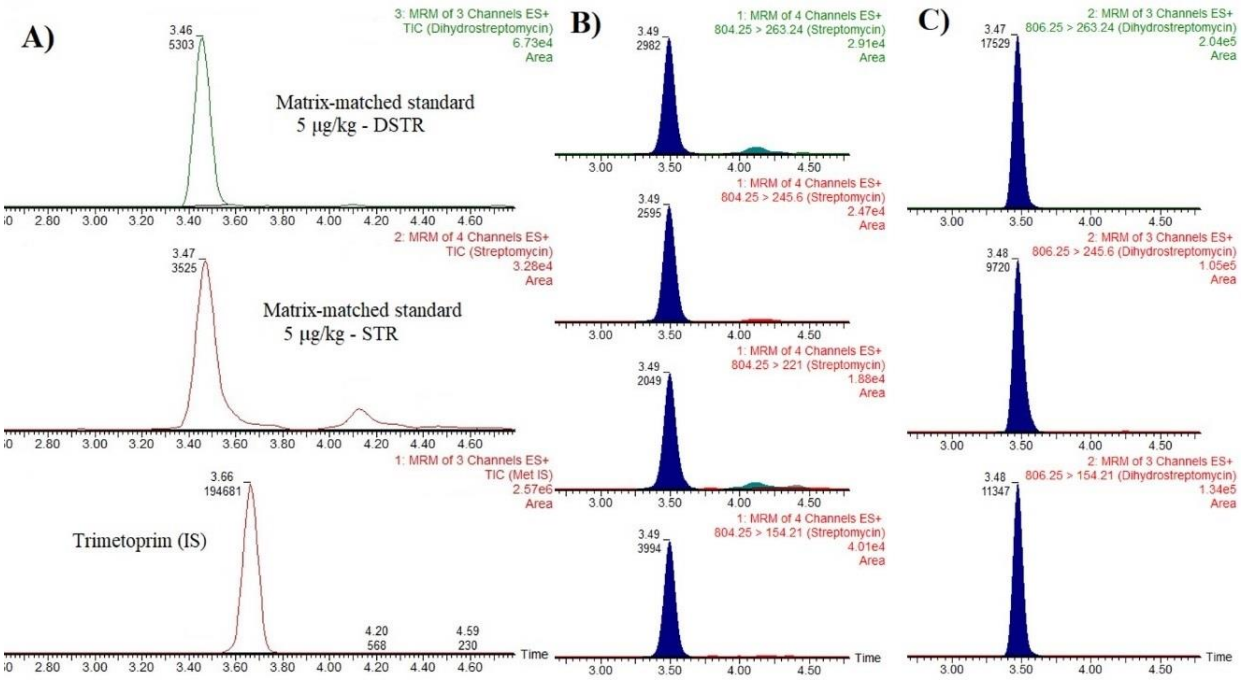
MS analizi için global parametreler olarak desolvasyon sıcaklığı, desolvasyon, kon gaz (nitrojen) akışı ve pozitif ESI kapiler iğne voltajı dikkatlice optimize edilmiştir. ESI kapiler voltajı, 3 kV, 2 kV ve 1 kV değerleri test edildi ve en iyi sinyal 1 kV'de

gözlendi. Desolvasyon sıcaklığı ve azot gazı akışı sinyal yoğunluğunu etkilemediğinden, gaz fazı iyonlarını verimli bir şekilde oluşturmak için bunları sırasıyla 450°C'de ve akış hızını 850 L/sa'de kullanmayı tercih ettik. Deneysel alıkonma sürelerine göre programlanmış bir SRM alımı gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, matris etkilerinin üstesinden gelmek için analitleri 2 dakikadan fazla tuttuk, bu da bize switching valfi kullanarak hidrofilikleri atığa göndermek için yeterli zaman verdi. Bu nedenle, yönlendirme valfini 2 dakika boyunca atık konumunda tuttuk ve bileşik elüsyonundan önce yükleme konumuna geçtik.

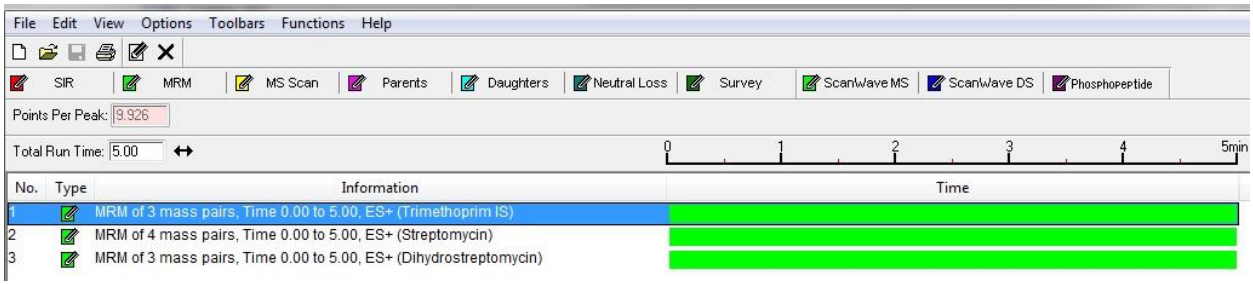
3.1.2.5 LC Yöntemi İle İlgili Değerlendirmeler

Daha iyi iyonizasyon elde etmek için uygun LC koşullarının MS tespiti ile birleştirilmesine özellikle dikkat edilmelidir. Seçilen LC koşullarının sinyal geliştirme veya bastırma etkileri araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. Enjeksiyon hacmi, kolon kimyası, kolon fırın sıcaklığı, akış hızı ve mobil faz bileşimleri değerlendirilmiş ve en iyi yanıtları elde etmek için optimize edilmiştir. AMG-Fmoc konjugatlarının pozitif polarizasyonda iyonize olma eğiliminde olduğu ve pozitif ESI'de baskın eklentinin her durumda protonlanmış molekül [M+H]+ olduğu anlaşılmıştır. Formik asit ve asetik asit, protonlamayı desteklemek için mobil fazda organik modifiye ediciler olarak farklı konsantrasyonlarda test edilmiştir. İyonizasyon sinyalini artırmak için %0,005 asetik asit katkısı seçilmiştir. MeOH, ACN ve bunların karışımı (50:50, v/v) kullanılarak çeşitli gradyanlar test edilmiştir. ACN'nin bant genişliğini azalttığı ve piklerin verimliliğini artırdığı sonucuna varılmıştır. ACN ise iyonizasyon üzerinde olumlu bir etki göstermemiştir ve istenmeyen ko-ekstraktların atığa gönderilmesi için gereken süreyi sınırlamıştır. Bu nedenlerden dolayı, MeOH ve ACN'yi 50:50 (v/v) oranında mobil faz B bileşiminde birleştirmenin daha makul olduğuna karar verdik. Enjeksiyon hacmi 50 µL olarak belirlenmiştir. Daha büyük hacimli enjeksiyonlar bant genişlemesine ve kuyruklanmaya neden oldu ve ayrıca doğrusal bir pik alanı artışı sağlamadı. Daha yüksek enjeksiyon hacimleri, kolona daha fazla matris bileşeni sokma riski olan ön temizleme adımlarının olmaması nedeniyle de tercih edilmemiştir. Akış hızı olarak analiz süresini fazla uzatmayan 0,35 mL/dak seçilmiştir. Bu çalışmada, seçilen kimya olarak C18 ligand içeren ters fazlı bir UHPLC kolonu kullanılmıştır. Kolon fiziksel özellikleri açısından 2,1 mm i.d, 50 mm kolon uzunluğu ve 1,7 µm silika partikül boyutu kullandık. Waters® UHPLC Acquity BEH C18, alıkonma süresi, pik

şekli, yanıt ve çalışma süresi açısından test ettiğimiz UHPLC kolonları arasında en etkili kolon olarak belirlendi. Kolon sıcaklığı 40°C'de, uygun geri basınçta en ideal pik şekilleriyle sonuçlanan uygun ayırma sunulmuştur. Optimize edilmiş LC koşullarının bir sonucu olarak kantitasyon ve doğrulama iyonlarının temsili kromatogramları Şekil 3.3'te verilmiştir.



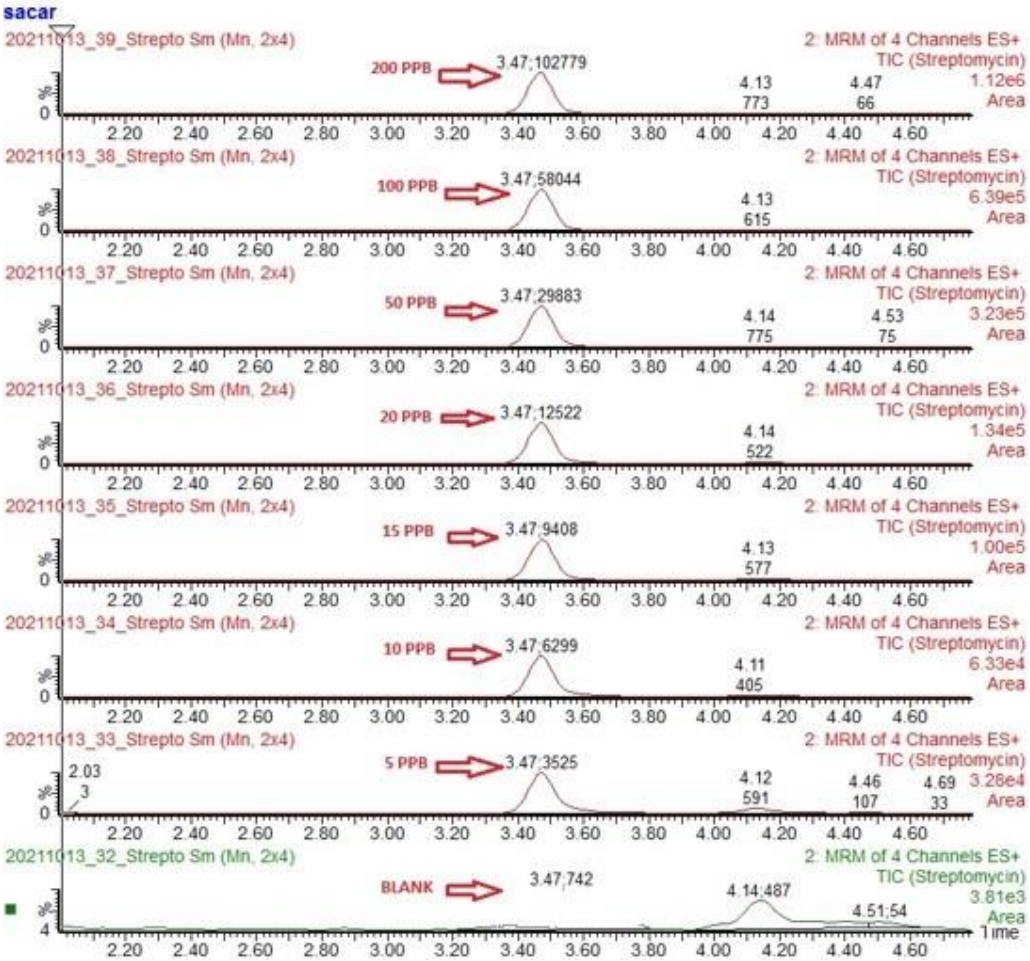
Şekil 3.3. 5 µg/kg konsantrasyonda STR ve DSTR'nin matrix-matched (matris-eşleşmiş) kalibrasyon standart kromatogramları. A) STR, DSTR ve IS için total iyon kromatogramları, B) STR için her bir kütle geçişine ait kromatogramlar, C) DSTR için her bir kütle geçişine ait kromatogramlar.



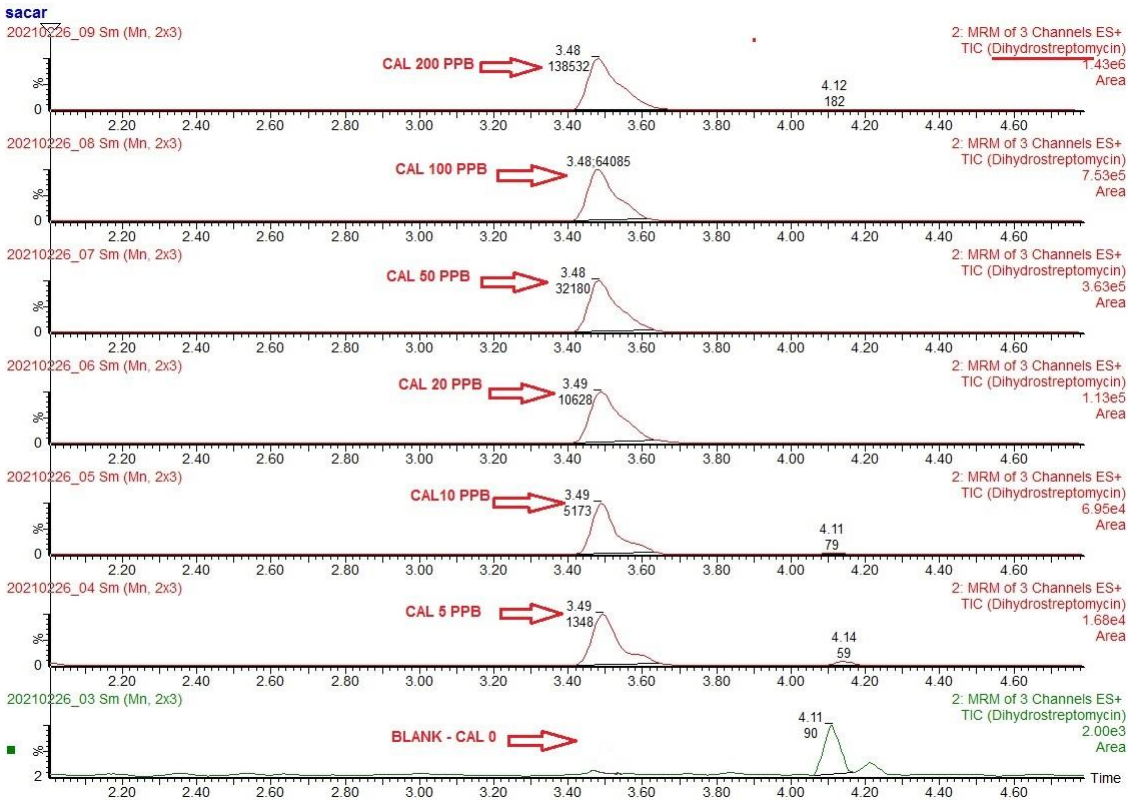
Şekil 3. 4. MRM kütüphanesindeki, STR, DSTR ve Trimetoprim bileşenlerine ait tarama aralığı

Tablo 3. 2. Aminoglikozitlerin ana ve parçalanma iyonları ile bunlara ait cone voltajı ve çarpışma enerjileri

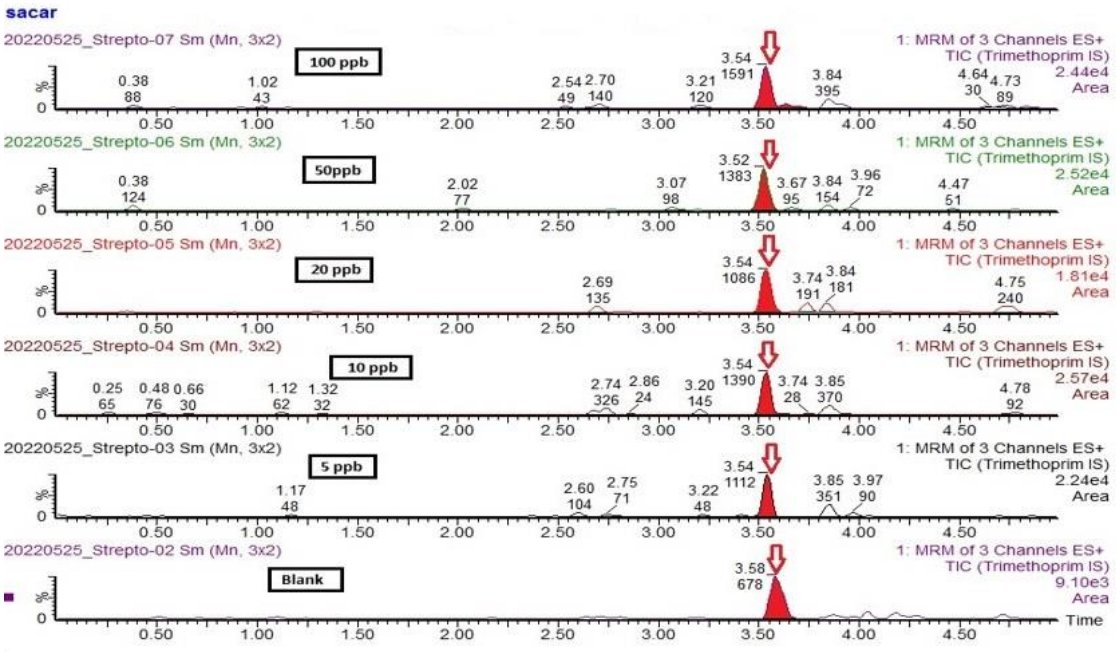
Analit	Ana İyon ([M+H]+, (m/z)	Parçalanma İyonu(m/z)	Dwell (sn) (Otomatik)	Cone Voltajı(V)	Çarpışma Enerjisi(eV)
STR-FMOC	804	154	0,005	70	50
STR-FMOC	804	221	0,005	70	50
STR-FMOC	804	245	0,005	70	50
DSTR-FMOC	806	154	0,005	70	50
DSTR-FMOC	806	245	0,005	70	50
DSTR-FMOC	806	263	0,005	70	40
Trimethoprim-FMOC	514	318	0,005	30	25
Trimethoprim-FMOC	514	292	0,005	30	25
Trimethoprim-FMOC	514	180	0,005	30	25



Şekil 3.5. Kör numuneye STR spike ederek hazırlanan kalibrasyon noktalarının kromatogramları



Şekil 3.6. Kör numuneye DSTR spike ederek hazırlanan kalibrasyon noktalarının kromatogramları



Şekil 3.7. Trimetoprim ‘in tüm standard serisine eklenmesiyle alınan kromatogramlar

3.1.3. Yöntem Geçerli Kılma Verileri

3.1.3.1. Özgüllük Verileri

Pozitif mod kullanılarak MS'de oluşan ana iyon ve daughter iyonların seçimi ile aminoglikozitlerin tayini gerçekleştirildi. Parçalanma sonucunda her bir aminoglikozit grubu için pozitif iyon modunda, MRM (molecule reaction monitoring- MRM) olarak tanımlanan en az üç farklı MS geçişi tespit edilmektedir. STR ve DSTR kromatogramlarında pik ayrımının ve rezolüsyonunun uygun olduğu ve bal matrisinden dolayı olası girişimlerin piklerin şekline etki etmediği görüldüğü için bu çalışmada geliştirilen yöntem spesifiktir yorumunda bulunabiliriz. Aşağıdaki tablolarda STR ve DSTR'ye ait spesifiklik ve seçicilik sonuçları gösterilmiştir.

Streptomisin				
Seçicilik Çalışması		**Spesifiklik Çalışması**		
	Hesaplanan Konsantrasyon (µg/kg)	**İsim (veri)**	**Analit Konsantrasyon (MRL)**	**Hesaplanan Konsantrasyon (µg/kg)**
Blank1	**0,1**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_1**	**5ug/kg**	5,8
Blank2	**0,0**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_2**	**5ug/kg**	5,4
Blank3	**0,1**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_3**	**5ug/kg**	5,8
Blank4	**0,2**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_4**	**5ug/kg**	6,0
Blank5	**0,0**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_5**	**5ug/kg**	5,5
Blank6	**0,1**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_6**	**5ug/kg**	5,4
Blank7	**0,1**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_1**	**5ug/kg**	5,0
Blank8	**0,3**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_2**	**5ug/kg**	5,8
Blank9	**0,1**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_3**	**5ug/kg**	5,5
Blank10	**0,1**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_4**	**5ug/kg**	5,5
Blank11	**0,3**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_5**	**5ug/kg**	5,1
Blank12	**0,1**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_6**	**5ug/kg**	5,5
Seçicilik		Spesifiklik		
Başarı Oranı, %	100	Başarı Oranı, %		100
Enjeksiyon sayısı	12	Enjeksiyon sayısı		12
Negatif sonuç sayısı	12	Pozitif sonuç sayısı		12
Yanlış pozitif sonuç sayısı	0	Yanlış negatif sonuç sayısı		0

Tablo 3.3. Streptomisine ait spesifiklik ve seçicilik sonuçları

Dihidrostreptomisin				
Seçicilik Çalışması		**Spesifiklik Çalışması**		
	Hesaplanan Konsantrasyon (µg/kg)	**İsim (veri)**	**Analit Konsantrasyon (MRL)**	**Hesaplanan Konsantrasyon (µg/kg)**
Blank1	**0,1**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_1**	**5ug/kg**	5,3
Blank2	**0,0**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_2**	**5ug/kg**	5,0
Blank3	**0,0**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_3**	**5ug/kg**	5,8
Blank4	**0,0**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_4**	**5ug/kg**	5,8
Blank5	**0,1**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_5**	**5ug/kg**	5,5
Blank6	**0,2**	**1. kişi tekrarüretilebilirk1_6**	**5ug/kg**	5,0
Blank7	**0,0**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_1**	**5ug/kg**	5,0
Blank8	**0,0**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_2**	**5ug/kg**	4,9
Blank9	**0,1**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_3**	**5ug/kg**	4,9
Blank10	**0,1**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_4**	**5ug/kg**	4,8
Blank11	**0,0**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_5**	**5ug/kg**	5,1
Blank12	**0,1**	**2. kişi tekrarüretilebilirk1_6**	**5ug/kg**	4,9
Seçicilik		Spesifiklik		
Başarı Oranı, %	100	Başarı Oranı, %		100
Enjeksiyon sayısı	12	Enjeksiyon sayısı		12
Negatif sonuç sayısı	12	Pozitif sonuç sayısı		12
Yanlış pozitif sonuç sayısı	0	Yanlış negatif sonuç sayısı		0

Tablo 3.4. Dihidrostreptomisine ait spesifiklik ve seçicilik sonuçları

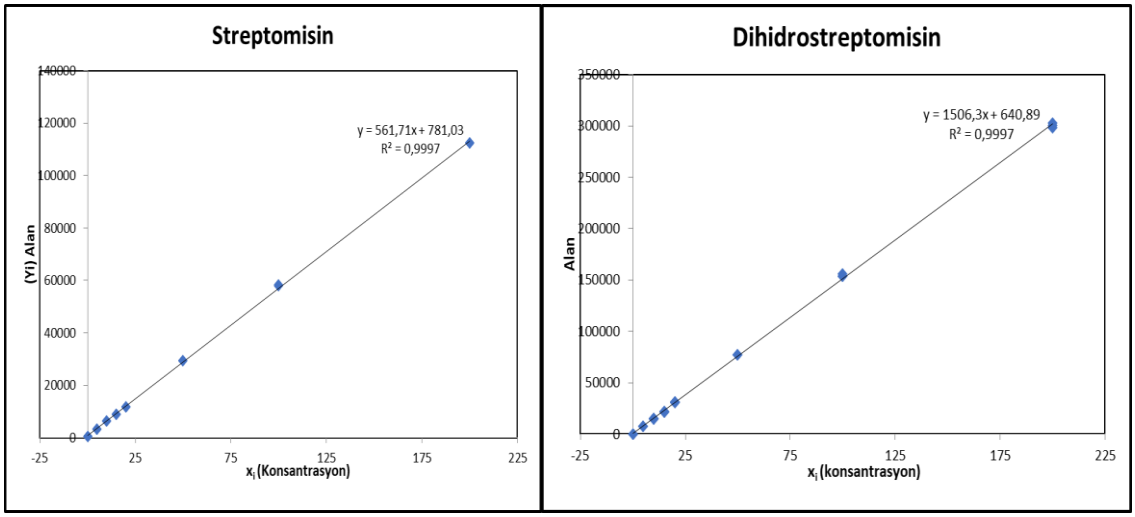
3.1.3.2. Hassasiyet verileri (CCα ve CCβ)

CCα ve CCβ değerleri belirlenirken, eğer MRL değeri var ise MRL düzeyinde laboratuar içi tekrarüretilebilirlik çalışması yapılır. CCα=SD*1,64+MRL ve CCβ=CCα+SD*1,64 formulleriyle hesaplanır. Ancak MRL değeri yok MRPL var ise MRPL / ILPL değerinin altında bir seviyede (C1 tespit edilebilecek en düşük seviye) laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışması yapılır (6 farklı zaman 2 personel 24 veriden oluşan). CCα =SD*2,33+C1, CCβ= CCα + SD*1,64 formulleriyle hesaplanır. CCα değeri her durumda MRPL değerinden küçük, CCβ değeri MRPL değerine eşit veya daha küçük olmalıdır, kriterine dikkat edilmelidir. Bu çalışmada da CCα ve CCβ değeri bulunurken, tekrarüretilebilirlikten 5ppb seviyesinde 2 personelin ilk üç günlük dataları alınmıştır.

Sonuçlara göre STR için CCα ve CCβ değerleri 5,7 ve 6,2 , DSTR için ise CCα ve CCβ değerleri sırasıyla 5,8 ve 6,4 olarak hesaplanmıştır.

3.1.3.3. Aralık Ve Doğrusallık Sonuçları

STR ve DSTR miktarlarının hesaplanması için blank numune ve bu numune bilinen konsantrasyonda antibiyotikle kirletilerek 0 ppb -100 ppb seviyeleri arasında 7 noktalı kalibrasyon eğrisi çizdirilmiştir. Aminoglikozitlerin korrealasyon katsayısının 0,99 üzerinde olduğu görülmüştür.



Şekil 3.8. Kalibrasyon grafikleri ve rakamsal verileri

3.1.3.4. Doğruluk Sonuçları

İki aminoglikozit parametresi için düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyonda çalışılarak %RSD ve yüzde geri kazanım değerleri hesaplanarak doğruluk parametresinin validasyonu değerlendirilmiştir.

Analit	Konsantrasyon (µg/kg)	Ölçülen Değer (Ortalama)	Ortalama % GK n=7
Streptomisin	5	5.4	102.6
	20	20.1	
	100	99.7	
Dihidrostreptomisin	5	5.2	101.3
	20	20.1	
	100	100.1	

Tablo 3.5. Geri kazanım sonuçları

3.1.3.5. Kesinlik (Presizyon) sonuçları

Bu çalışmada tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmaları kesinlik olarak değerlendirilmiştir. İki farklı kişiye 3 farklı konsantrasyonda ait streptomisin tekrarlanabilirlik verileri aşağıda gösterilmiştir.

5ppb					
I.Analist - I.Konsantrasyon	n	ort	II.Analist - I.Konsantrasyon	n	ort
	1	4,9		1	5,2
	2	5,4		2	5,1
	3	5,2		3	5,4
	4	5,1		4	4,9
	5	5,3		5	5,1
	6	5,1		6	5,0
Ortalama		5,19	Ortalama		5,10
Standart sapma		0,19	Standart sapma		0,19
RSD		0,0365	RSD		0,0370
n-1		5	n-1		5
(RSD^2)*(n-1)		0,0067	(RSD^2)*(n-1)		0,0068
% RSD		3,65068737	% RSD		3,70063
PRSD		17,4899	PRSD		17,5359
HORRAT		0,2087	HORRAT		0,2110
Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun	Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun

20					
I.Analist - II.Konsantrasyon	n	ort	II.Analist - II.Konsantrasyon	n	ort
	1	20,2		1	21,4
	2	20,5		2	20,3
	3	19,2		3	19,1
	4	19,8		4	20,2
	5	19,3		5	20,6
	6	20,1		6	19,9
Ortalama		19,84	Ortalama		20,23
Standart sapma		0,54	Standart sapma		0,75
RSD		0,0272	RSD		0,0372
n-1		5	n-1		5
(RSD^2)*(n-1)		0,0037	(RSD^2)*(n-1)		0,0069
% RSD		2,722743059	% RSD		3,722438
PRSD		14,3009	PRSD		14,2592
HORRAT		0,1904	HORRAT		0,2611
Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun	Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun

100ppb					
I.Analist - III.Konsantrasyon	n	ort	II.Analist - III.Konsantrasyon	n	ort
	1	99,2		1	98,8
	2	102,3		2	99,9
	3	100,8		3	99,5
	4	101,9		4	98,1
	5	99,9		5	98,8
	6	101,5		6	98,5
Ortalama		100,93	Ortalama		98,94
Standart sapma		1,21	Standart sapma		0,67
RSD		0,0120	RSD		0,0068
n-1		5	n-1		5
(RSD^2)*(n-1)		0,0007	(RSD^2)*(n-1)		0,0002
% RSD		1,197076706	% RSD		0,681704
PRSD		11,2046	PRSD		11,2381
HORRAT		0,1068	HORRAT		0,0607
Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun	Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun
I.Analist - RSDpool		0,0272	II.Analist - RSDpool		0,0306

Tablo 3.6. Streptomisin Tekrarlanabilirlik verileri

Dihidrostreptomisin tekrarlanabilirlik verileri ise aşağıda gösterilmiştir. (Tablo.3.7)

5ppb-DSTR					
I.Analist - I.Konsantrasyon	n	ort	II.Analist - I.Konsantrasyon	n	ort
	1	5,4		1	5,3
	2	5,5		2	5,4
	3	5,6		3	5,3
	4	5,3		4	5,2
	5	5,2		5	5,3
	6	5,5		6	5,3
Ortalama		5,39	Ortalama		5,29
Standart sapma		0,15	Standart sapma		0,07
RSD		0,0272	RSD		0,0132
n-1		5	n-1		5
(RSD^2)*(n-1)		0,0037	(RSD^2)*(n-1)		0,0009
% RSD		2,724178826	% RSD		1,320442
PRSD		17,3885	PRSD		17,4399
HORRAT		0,1567	HORRAT		0,0757
Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun	Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun

20ppb-DSTR					
I.Analist - II.Konsantrasyon	n	ort	II.Analist - II.Konsantrasyon	n	ort
	1	20,2		1	20,0
	2	20,0		2	20,4
	3	20,1		3	19,8
	4	20,3		4	19,7
	5	19,3		5	19,2
	6	19,7		6	19,9
Ortalama		19,92	Ortalama		19,87
Standart sapma		0,36	Standart sapma		0,39
RSD		0,0179	RSD		0,0196
n-1		5	n-1		5
(RSD^2)*(n-1)		0,0016	(RSD^2)*(n-1)		0,0019
% RSD		1,787584862	% RSD		1,956334
PRSD		14,2926	PRSD		14,2984
HORRAT		0,1251	HORRAT		0,1368
Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun	Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun

100ppb-DSTR					
I.Analist - III.Konsantrasyon	n	ort	II.Analist - III.Konsantrasyon	n	ort
	1	99,9		1	99,4
	2	100,7		2	100,7
	3	98,7		3	100,5
	4	99,8		4	99,4
	5	100,5		5	100,2
	6	100,0		6	99,9
Ortalama		99,93	Ortalama		100,02
Standart sapma		0,73	Standart sapma		0,55
RSD		0,0073	RSD		0,0055
n-1		5	n-1		5
(RSD^2)*(n-1)		0,0003	(RSD^2)*(n-1)		0,0002
% RSD		0,730196001	% RSD		0,552273
PRSD		11,2214	PRSD		11,2199
HORRAT		0,0651	HORRAT		0,0492
Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun	Tekrarlanabilirlik kontrolü		Uygun
I.Analist - RSDpool		0,0193	III.Analist - RSDpool		0,0140

Tablo 3.7. Dihidrostreptomisin Tekrarlanabilirlik verileri

İki farklı kişiye 3 farklı konsantrasyonda ait tekrar üretilebilirlik verileri de aşağıda gösterilmiştir.

Birinci konsantrasyon:		5 ppb				
Zaman dilimi	**1.zaman**	**2.zaman**	**3.zaman**	**4.zaman**	**5.zaman**	**6.zaman**
Analist-1	5,8	5,4	5,8	6,0	5,5	5,4
Analist-2	5,0	5,8	5,5	5,5	5,1	5,5
ort	5,39	5,40	5,62	5,72	5,33	5,48
std sapma	0,51	0,39	0,24	0,35	0,28	0,07
RSD	0,0945	0,0714	0,0428	0,0606	0,0518	0,0129
% RSD	9,4456	7,1439	4,2779	6,0627	5,1788	1,2903

İkinci konsantrasyon:		20 ppb				
Zaman dilimi	**1.zaman**	**2.zaman**	**3.zaman**	**4.zaman**	**5.zaman**	**6.zaman**
Analist-1	20,6	20,6	21,8	20,9	19,1	19,2
Analist-2	20,7	20,2	19,2	19,7	20,5	20,5
ort	20,65	20,28	20,49	20,32	19,82	19,84
std sapma	0,01	0,31	1,85	0,82	0,99	0,97
RSD	0,0007	0,0155	0,0901	0,0404	0,0499	0,0488
% RSD	0,0685	1,5499	9,0093	4,0366	4,9947	4,9

Üçüncü konsantrasyon:		100 ppb				
Zaman dilimi	**1.zaman**	**2.zaman**	**3.zaman**	**4.zaman**	**5.zaman**	**6.zaman**
Analist-1	101,0	101,1	98,3	101,0	99,7	100,7
Analist-2	100,2	99,5	98,9	98,7	99,2	101,8
ort	100,58	100,18	98,61	99,81	99,48	101,26
std sapma	0,54	0,80	0,40	1,63	0,33	0,74
RSD	0,0054	0,0080	0,0040	0,0164	0,0033	0,0073
% RSD	0,5414	0,7994	0,4016	1,6	0,3341	0,7333

Tablo 3. 8. Streptomisin Tekrarüretilebilirlik verileri

DSTR için ise hesaplanan tekrarüretilebilirlik verileri aşağıdaki tablo grubunda gösterilmiştir.

Birinci konsantrasyon:		5 ppb				
Zaman dilimi	**1.zaman**	**2.zaman**	**3.zaman**	**4.zaman**	**5.zaman**	**6.zaman**
Analist-1	5,3	5,0	5,8	5,8	5,5	5,0
Analist-2	5,0	4,9	4,9	4,8	5,1	4,9
ort	5,12	4,94	5,36	5,31	5,31	4,92
std sapma	0,23	0,06	0,61	0,67	0,31	0,06
RSD	0,0456	0,0122	0,1135	0,1266	0,0586	0,0115
% RSD	4,5620	1,2194	11,3454	12,6626	5,8593	1,1

İkinci konsantrasyon:		20 ppb				
Zaman dilimi	**1.zaman**	**2.zaman**	**3.zaman**	**4.zaman**	**5.zaman**	**6.zaman**
Analist-1	21,9	19,4	21,1	19,4	19,2	20,0
Analist-2	21,0	19,5	20,0	21,6	19,0	19,9
ort	21,44	19,65	20,53	20,50	19,11	19,97
std sapma	0,66	0,31	0,81	1,62	0,18	0,09
RSD	0,0310	0,0159	0,0396	0,0790	0,0096	0,0046
% RSD	3,1002	1,5872	3,9619	7,9008	0,9621	0,5

Üçüncü konsantrasyon:		100 ppb				
Zaman dilimi	**1.zaman**	**2.zaman**	**3.zaman**	**4.zaman**	**5.zaman**	**6.zaman**
Analist-1	101,8	99,7	100,3	100,0	100,8	100,8
Analist-2	102,5	99,7	100,3	100,3	100,9	99,1
ort	102,16	99,80	100,32	100,18	100,84	99,98
std sapma	0,49	0,18	0,00	0,20	0,04	1,20
RSD	0,0048	0,0018	0,0000	0,0020	0,0004	0,0120
% RSD	0,5	0,2	0,0	0,2	0,0	1,2

Tablo 3.9. Dihidrostreptomisin Tekrarüretilebilirlik verileri

3.1.3.6 Sağlamlık (Robustness) Sonuçları

Sağlamlık çalışmalarında aşağıdaki tabloda belirtilen yedi farklı parametre üzerinde değişiklik yapılarak ölçümler sağlanmış ve alınan veriler aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Değiştirilen Parametre		Orijinal Metot Şartları		Varyasyon	
A/a	Sodyum Karbonat Miktarı	A-	21,2 g	**a-**	16,5 g
B/b	Formik asit Miktarı	B-	0,3 mL	**b-**	0,35 mL
C/c	Kolon Fırını sıcaklığı	C-	40 °C	**c-**	35°C
D/d	Mobil Faz Akış hızı	D-	0,4 mL	**d-**	0,35 mL
E/e	Mobil Faz B MeOH oranı	E-	50%	**e-**	48%
F/f	Otoörnekleyici sıcaklığı	F-	10 °C	**f-**	13°C
G/g	ACN Saflık farkı	G-	Mass grade	**g-**	UV grade

Tablo 3.10. Sağlamlık çalışmasında değiştirilen parametreler

Streptomisin	Faktoriyel Kombinasyon							
Analitik Parametre	1 (Nominal Ölçüm)	2	3	4	5	6	7	8
Sodyum Karbonat Miktarı	A	A	A	A	a	a	a	a
Formik asit Miktarı	B	B	b	b	B	B	b	b
Kolon Fırını sıcaklığı	C	c	C	c	C	c	C	c
Mobil Faz Akış hızı	D	D	d	d	d	d	D	D
Mobil Faz B MeOH oranı	E	e	E	e	e	E	e	E
Otoörnekleyici sıcaklığı	F	f	f	F	F	f	f	F
ACN Saflık farkı	G	g	g	G	g	G	G	g
Sonuç (3 ölçüm)	4,93	4,85	4,96	4,96	4,81	4,72	5,12	4,57
	4,69	5,01	5,04	4,92	4,85	4,73	4,72	4,94
	4,94	4,65	4,67	4,72	5,12	4,96	4,77	4,73
Ortalama	4,85	4,84	4,89	4,87	4,93	4,80	4,87	4,75
Standart sapma	0,142	0,180	0,195	0,129	0,169	0,136	0,218	0,186
RSD_r	0,029	0,037	0,040	0,026	0,034	0,028	0,045	0,039
$\%RSD_r$	2,9	3,7	4,0	2,6	3,4	2,8	4,5	3,9

Tablo 3.1. Streptomisin Sağlamlık Çalışması Sonuçları

Dihidrostreptomisin	Faktoriyel Kombinasyon							
Analitik Parametre	1 (Nominal Ölçüm)	2	3	4	5	6	7	8
Sodyum Karbonat Miktarı	A	A	A	A	a	a	a	a
Formik asit Miktarı	B	B	b	b	B	B	b	b
Kolon Fırını sıcaklığı	C	c	C	c	C	c	C	c
Mobil Faz Akış hızı	D	D	d	d	d	d	D	D
Mobil Faz B MeOH oranı	E	e	E	e	e	E	e	E
Otoörnekleyici sıcaklığı	F	f	f	F	F	f	f	F
ACN Saflık farkı	G	g	g	G	g	G	G	g
Sonuç (3 ölçüm)	4,97	5,20	5,02	5,19	5,02	5,90	5,30	5,13
	4,67	5,19	5,69	4,86	5,22	5,86	4,58	5,30
	5,48	4,75	5,57	5,35	4,97	5,25	5,61	4,98
Ortalama	5,04	5,05	5,43	5,13	5,07	5,67	5,16	5,14
Standart sapma	0,410	0,257	0,357	0,250	0,132	0,364	0,528	0,160
RSD_r	0,081	0,051	0,066	0,049	0,026	0,064	0,102	0,031
$\%RSD_r$	8,1	5,1	6,6	4,9	2,6	6,4	10,2	3,1

Tablo 3.12. Dihidrostreptomisin Sağlamlık Çalışması Sonuçları

3.1.4. Çalışılan örneklerin STR ve DSTR Değerleri

Çalışılan bal örneklerine ait STR ve DSTR değerleri **Ekler** bölümündeki **B.1 Tablosu'nda** verilmiştir.

3.2. Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

3.2.1. Yöntemin iyileştirilmesi

Bu tez çalışmasında, mobil faz içeriği ve kombinasyonu, mobil faz akış hızı, numune hazırlık süreçleri gibi parametrelerin Bölüm 2.2'de detaylı şekilde verilen koşullar altında test edildiğinden bahsedilmiştir.

3.2.2. Kullanılan Hareketli Fazların ve Gradient Profilin Seçimi

Ters fazlı sıvı kromatografisinde, mobil fazda genellikle MeOH ve ACN kullanılmaktadır. Bu amaçla bunlar çalışmada aminoglikozitleri elüe etmek için denenmiştir. Çalışmamızda asetonitrilin tek başına su ile gradyan denemeleri kromatografik ayrımda başarılı olmamıştır. Analiz süresini kısaltmak ve düşük sistem basıncı sağlamak gibi avantaj sağlamasına karşın, pik alanlarını kötü yönde etkilemişti ve bu amaçla metanol ile eşit oranda karıştırılarak kullanımı denenmiştir. Analiz süresini kısaltması MS sisteminde kirlilik yaratacak adıma da neden olacağından aslında çok istenen bir durum olmadığı anlamına da gelmektedir. Çünkü valfi atık konumunda analize başlatarak baldan gelen yüksek şeker gibi iyonizasyonu düşürmeye sebep olacak bileşenlerin atığa gönderilmesi için gereken süreyi öne almaktadır. Bu da sistemin kirlenmesine neden olabilmektedir. Bundan dolayı mobil faz için metanol ile karışımının daha ideal olacağı değerlendirilmiştir. Hidrojen donör olan, uçucu özellikteki asitlerden, iyonlaşmayı artırıp rezolüsyonu daha da iyileştirecek olan asetik asidin sinyal gücünü arttırma özelliğinden ötürü metanol: asetonitril-su mobil fazlarına %0,05 derişimde olacak şekilde ilave edilmiştir.

En ideal kromatografik ayrımı elde etmek adına başlangıç koşulu %95 asetik asitli su ile gradyan opsiyonu belirlenmiştir. Burada eğimi, analiz süresini kısaltmak ve ideal ayrım sağlayan açıyı yakalamak için %95 MeOH: ACN çalışılarak test edilmiştir. Kolonda tutunma sürelerinin, rezolüsyonun ve bant genişliğinin mümkün mertebe az olmasına dikkat edilerek, STR ve DSTR için en yüksek pik alanları elde edilmeye çalışılmıştır. Bu sonuçlara göre MeOH: ACN 'nin artması mobil fazın polaritesini azaltmış yani hidrofobikliğini arttırmıştır diyebiliriz. Yani mobil fazın apolarlık derecesinden en fazla etkilenen, kolondan en erken çıkan analitin mümkün olduğu kadar kolondan geç çıkmasını sağlayan başlangıç yüzdesi belirlenmelidir.

3.2.3. Akış hızının seçimi

Analit ile kolon arasındaki etkileşim süresi, gradyan sistemlerde akış hızının arttırılmasına karşılık azalmaktadır. Tersi durumda da etkileşim süresi artmaktadır. Akış hızını artırmanın analiz süresini azaltmasına karşılık normal şartlarda yüksek olan UHPLC sistem basıncının daha da artmasına neden olacaktır. Bu sebepten analiz süresini ve sistem basıncını fazla artırmayan 0.4 mL/dak. akış uygun bulunmuştur.

3.2.4. Farklı otoörnekleyici sıcaklıklarının etkisi

Çalışmamızda otoörnekleyici sıcaklıklarını düşük, orta ve yüksek olmak üzere temsilen 10°C, 20°C ve 30°C sıcaklıklarıyla test edilmiş olup, en kısa sürede en uygun pik şeklini veren ve makul bir basınç sağlayan 10°C sıcaklıkta ideal kromatografik ayrımı sağladığı tespit edilmiştir.

3.2.5. Tandem MS metot optimizasyonu sonuçları

MS metot optimizasyonuna başlarken ilk adım, en yüksek iyonlaşma derecesini ana iyon (Parent iyon) tespit edilmiştir. Bu iyon hidrojen atomu eklenmiş halde olan tüm AG'ler için yalancı moleküler iyon (pseudomoleculer ion) 'dur. Her bir AG bileşeni için farklı cone voltaj ve çarpışma enerjileri uygulanarak en yüksek sinyallerin üretildiği değerler belirlenmiştir. Her bir AG ana iyonu için total en az 3 değişik daughter iyon seçilerek, STR ve DSTR için MRM tablosu oluşturulmuştur. Metotta kapiler voltaj değeri 1 kV, desolvatasyon sıcaklığı 450 °C ve azot gazı akış hızı 850 L/saat tüm AG'ler için maksimum sinyal üreten değer olarak kaydedilmiştir.

3.2.6 Kütle spektrometresi valf optimizasyonu sonuçları

Valf programının optimizasyonuna göre şekerler ve girişim yapma olasılığı bulunan bileşenler 2,0 dakika boyunca atığa gönderilirken, AG 'ler kolonda tutunmuş olarak 2,01. dakikaya kadar kolonda tutulmaktadır. 2,01. dakika sonrasında valf pozisyonu değişerek MS'e enjeksiyon yapmak ve beraberinde MeOH: ACN fazının konsantrasyonunun artmasıyla AG bileşenlerinin kolondan ayrılarak sinyal üretme konumuna geçmesi gerçekleşir. Cihazın kirlenmesine fırsat vermeden valfi bu şekilde programlayarak tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek mümkün hale gelmiştir.

3.2.7 Numune hazırlık optimizasyon sonuçları

Tampon seçme sürecinde, benzoil klorür ve FMOC-Cl türevlendirme ajanlarından biriyle devam etmeye karar verdikten sonra, bunların bazik ortamda reaksiyon verme afinitesinin fazla olduğu yapılan araştırmalarda görüldü. Literatürde yapılan araştırmalarda bazik ortam gerekliliğini sağlayan temelde iki tane tampon mekanizması mevcuttur. Bunlardan ilki borik asit-borat tamponu, diğeri ise karbonat tamponlarıdır. Farklı derişimler ve farklı pH'lar denenmiş olup, bal matrisini tamponlama kapasitesi ve türevlendirme verimi araştırılmıştır. Borik asitin yüksek konsantrasyonlarının dahi balın pH'sını istenen aralıkta (pH 7-9 aralığı) tutamadığı pH 4-5 aralığına getirebildiği görülmüştür ki buna da sebep olarak bala asidik özellik katan glukonik asit değerinin yüksek olmasıdır. Uygun pH'ı sağlayacak ve tamponlama kapasitesine sahip aynı zamanda yüksek sinyal verebilen tampon olarak karbonat tamponları en uygun tür olup, karbonat ve bikarbonat konjuge asit baz çiftinin tek başına sodyum karbonat bufferına göre balın pH'sını yukarıya çekebildiği düşük konsantrasyonlarda bile etkin olduğu tespit edilmiştir. Uygun pH olarak 9.2 karar verilmiş olup konsantrasyon 0,2M olarak karar verilmiştir.

3.2.8. Yöntem Geçerli Kılma Verilerinin Değerlendirilmesi

3.2.8.1. Özgüllük

Tez çalışmamızda, arıcılıkta sıklıkla karşılaşılan STR ve DSTR aminoglikozitlerinin ballarda tayini için UPLC-MS/MS kullanılarak pozitif iyonizasyon modunda bir metod geliştirilmiştir. Metodun özgüllüğü (seçiciliği) MRM tablosuna STR ve DSTR için

oluşturulan ana iyon ve üç farklı fragment ürünleri takip edilerek değerlendirildi. Çarpışma enerjileri optimum şekilde ayarlanarak oluşan fragmentlerin en yüksek değere sahip olanı tespit edildi.

3.2.8.2.Hassasiyet (CCα ve CCβ)

Karar limiti (CCα) ve tespit kabiliyeti (CCβ) her analit için sırasıyla yaklaşık 3 ve 10 sinyal-gürültü oranlarında (S/N) belirlenmiştir. Elde edilen CCα ve CCβ değerleri 5.7 ile 6.4 arasında olduğu daha önce de belirtilmişti. Balda AG antibiyotik kalıntıları için bir MRL değeri bulunmadığından AG kalıntılarının analizi için bu değerler laboratuvarlar tarafından kullanılabilecek maksimum kalıntı performans limiti (MRPL) yeni adıyla artık RPA (Reference point for action) açısından hassas olarak değerlendirilebilir.

3.2.8.3 Aralık ve doğrusallık

Metotta, aralık ve doğrusallık çalışmaları kapsamında STR ve DSTR parametreleri için 7 noktalı kalibrasyon grafikleri çizdirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi verileri değerlendirildiğinde, her bir aminoglikozit için minumum R^2=0.99 regrasyon katsayısı değeri görülmüştür. Geliştirilen yöntem çalışılan konsantrasyon aralıklarında doğrusaldır yorumunda bulunabiliriz.

3.2.8.4 Doğruluk

STR ve DSTR aminoglikozitleri için düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda aynı günde doğruluk çalışması değerlendirilmiştir. İki adet yeterlilik testi materyali BIPEA'dan temin edilmiş ve bulgularımız geleneksel metodolojilerle (ELISA & SPE-LC/MS) karşılaştırılmıştır. Atanmış değerleri 109,2 ug/kg STR ve 54,7 ug/kg olan STR olan numuneler için, geliştirdiğimiz yeni yöntemle sırasıyla 103 ug/kg ve 55,7 ug/kg olarak kaydedilmiştir. Öte yandan, DSTR kalıntısı için, sırasıyla 158 ug/kg ve 52,4 ug/kg atanan değerlere sahip örnekler için yeni yöntemimizle 145,2 ug/kg DSTR ve 43,4 ug/kg DSTR olarak tespit edilmiştir. Her bir molekül için bu değerler, numunelerin atanan değerlerine göre belirlenen kabul limitleri (z skorları <2.0) aralığında yer almış ve bu yaklaşımla yöntemin doğruluğu teyit edilmiştir. Ayrıca doğruluk çalışması için içerisinde aminoglikozit bulunmayan bal örneklerine, derişimi bilinen yüksek, düşük ve

orta seviyede standart eklenerek kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş ve bunlara karşı okunmuş değerlerinden %RSD elde edilmiştir. Düşük, orta ve yüksek seviye için yapılan 7 tekrarlı çalışma sonuçlarına göre geri kazanım değerlerinin %101,3 ile %102,6 arasında olduğunu göstermektedir.

3.2.8.5 Kesinlik

Kesinlik çalışmaları tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarından oluşan üç farklı konsantrasyon seviyesinde çalışılan verilerden oluşmaktadır. Güniçi, günler arası ve analistler arası yapılan bu çalışmaların sonuçlarına göre, metodun tekrarlanabilir olduğu görüldü. Değerlendirme kriteri olarak %RSD, STR, DSTR parametreleri için gün içi tekrarlanabilirlikte %9,7 ile %1,5 arasında değişmekte olup, tekrarüretilebilirlik çalışmalarında ise %RSD değerleri %9,9 ile %1,5 aralığında değişmektedir.

3.2.8.6 Sağlamlık (Ruggedness)

Gerçekleştirilen sağlamlık çalışmalarında ilk olarak, iki farklı kişi iki farklı cihazda aynı metot ile çalışmalar gerçekleştirmiş ve bu değişikliklerin sonuçlara etkisi olmadığı, stabil kaldığı %RSD değerlerinde anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. STR ve DSTR için %97,9 ile %99,9 değerleri arasında değişkenlik göstermektedir.

3.2.8.7 Sağlamlık (Robustness)

Bu çalışmada, metot parametreleri bilinçli şekilde değiştirilerek yöntemin güvenilirliği doğrulanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, kolon fırını sıcaklığı, mobil faz akış oranında (0,350 ve 0,400 mL/dak.) değişiklikler denendi. Sonuçlar geri kazanım sonuçları üzerinden değerlendirildiğinde metodun norml koşullarıyla stabil kalabildiği doğrulanmıştır.

3.2.9. Analiz Edilen Bal Numunelerinin Sonuçları

Tez kapsamındaki bu yöntemin validasyon çalışması sonunda, 57 tane çiçek, 14 tane kestane, 24 tane çam ve 15 tane narenciye ballarından oluşan toplam 110 adet örnek analize alınmış ve sonuçları EK-B, Tablo.B.1.'de gösterilmiştir. Analiz edilen 110 numunenin 29'unda AMG kalıntıları bulunmuştur. Bu analiz edilen numunelerin %26,3

'üne karşılık gelmektedir. STR kalıntıları 5 örnekte CCα değerinin üzerinde tespit edilebilirken, 27 örnekte CCα değerinin üzerinde DSTR kalıntıları gözlenmiştir. En yüksek kalıntı seviyesi 1131,8 µg/kg DSTR olarak belirlenmiştir. Eş zamanlı (STR ile DSTR) kalıntılar 3 örnekte tespit edilmiştir. Balda STR (n=5) kalıntılarından ziyade DSTR (n=27) kalıntılarının ağırlıklı olarak bulunduğu görülmüştür.

BÖLÜM 4. SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Genel Sonuç

Tez çalışmasında, UHPLC-MS sistemi ile ballarda sıklıkla karşılaşılan aminoglikozit antibiyotiklerinden streptomisin ve dihidrostreptomisin kalıntılarının saptanması için metod geliştirildi. Metod geliştirme aşamasında titizlikle optimize edilen kromatografik ve spektrometrik şartlar sonunda, metod için 5 dakikalık analiz süresi belirlendi.

Geliştirilen bu yöntem, seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve CCα & CCβ değerleri açısından doğrulanmıştır ve bu yöntem, piyasada bulunabilecek balların analizinde başarıyla uygulanabilmektedir. Yapılan çalışmalardaki analiz sonuçlarına göre, bazı ballarda streptomisin ve dihidrostreptomisin bileşenlerinin kalıntılarına rastlanmıştır. Literatürde bu tez çalışmasında geliştirilen yöntem yaklaşımıyla gerçekleştirilen, bu kadar hızlı, kullanıcı dostu, ekonomik açıdan uygun olan aminoglikozit analiz metodu bulunmamaktadır.

4.2. Öneriler

Arıcıların ilaçlama dönemini iyi bilmesi ve takip etmesi bal numunelerinde antibiyotik kalıntısını önlemek veya azaltmak için birincil öncelikli yapılması gerekenlerdendir. Arı hastalıklarına karşı yapılan mücadelede, ilaçlama dönemi iyi takip edilmelidir ve nektar toplamının olduğu bal mevsiminde ilaç kullanılmamalıdır. Diğer bir önemli konu da uygun kovan seçilmesidir. Arı kolonileri ve petekler, mümkün olduğunca 8-10°C civarında saklanmalı. Yetkili kurumlar tarafından antibiyotik kalıntılarının analizleri ve arı hastalıklarının teşhisi konusunda arıcılara çeşitli platformlarda bilgilendirmeler yapılmalıdır.

Üretici, tüketici ve satıcıların balda kalıntının önlenmesi konusunda eğitim, seminer vb. etkinliklerle bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca hava şartları ve çevre kirliliğinin de kalıntılara yol açtığının bilinmesine istinaden arıcılık faaliyetlerinin, sanayi ve yerleşim yerlerinden uzakta, zengin floraya sahip alanlarda, trafiğin yoğun olmadığı yerlerde yapılması konularında da arıcılar ilgili kurumlar tarafından yönlendirilmelidir. Bu alandaki kurumların arıcılarla birlikte yapacağı çalışmalarda, eğitim ve bilgilendirme toplantılarında, başta bal olmak üzere tüm arı ürünlerindeki kalıntı

sorununun ortadan kaldırılmasının önemi vurgulanmalı, böylece arıcılık sektörünü daha da geliştirip, katma değeri yüksek olan bu ürünlerin, daha güvenilir ve kaliteli şekilde üretilmesine katkı sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

Aksoy, A. (2019). Simultaneous screening of antibiotic residues in honey by biochip multi-array technology. Medycyna Weterynaryjna, 75(9), 6240-2019.

Akyıldız, İ.E. (2017) UPLC-ESI-MS/MS ile Kinolon Antibiyotiklerinin Ballarda Tespitine Yönelik Analitik Yöntem Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Asakawa, D., Uemura, M., Sakiyama, T., & Yamano, T. (2018). Sensitivity enhancement of aminoglycosides in hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry by post-column addition of trace sodium acetate in methanol. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 35(6), 1116-1126.

Ashiralieva, A., Genersch, E. (2006), Reclassification, genotypes and virulence of Paenibacillus larvae, the etiological agent of American foulbrood in honeybees-a review. Apidolologie. 37, 411–420.

Barbosa, J., Moura, S., Barbosa, R., Ramos, F., & da Silveira, M. I. (2007). Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta, 586(1-2), 359-365.

Beşergil, B. (2015), Enstrümental Analiz Temel İlkeler, 1.Baskı., Gazi Kitabevi, Ankara, Türkiye.

Bogdanov, S. (2003), Current state of analytical methods for the detection of residues in bee products. Apiacta; 38, 399-409.

Bogdanov, S. (2006), Contaminants of bee products, Apidologie; 37, 1-18.

Brabander, H.F.D., Pottıe, G, Coutheyn, D., Smets, F. (1996), To qualify, to quantify or to qualify and quantify? That is the question. Editors: Haagsma N, Ruıter A.

Euro Residue III, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands, 283-287.

Chang, X., & Yu, Z. (2011). Determination of etimicin in rat plasma using 9-fluorenylmethyl chloroformate precolumn derivatization by HPLC with fluorescence detection. Journal of the Brazilian Chemical Society, 22, 1246-1252.

Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á., Puchades, R. (2010), Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples, Trends in Analytical Chemistry, vol. 29, 1038 – 1049.

Chen, L., Mei, M., & Huang, X. (2017). Development of multiple monolithic fiber solid-phase microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the sensitive monitoring of aminoglycosides in honey and milk samples. J Sep Sci, 40(21), 4203-4212.

Contin, M. D., Quinsaat, J. E., Negri, R. M., Tripodi, V. P., Opris, D., & NB, D. A. (2019). Development of carbohydrate functionalized magnetic nanoparticles for aminoglycosides magnetic solid phase extraction. Anal Chim Acta, 1082, 37-48.

Dobrinas, S., Birghila, S., Coatu, V. (2008), Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania. Journal of Food Composition and Analysis, Vol: 21, 71–77.

Driver, J. L., Thiex, N., Raynie, D., Ofitserova, M., & Pickering, M. (2009). Single-laboratory validation for the quantification of neomycin B and neomycin C in animal feeds by liquid chromatography fluorescence detection with post-column derivatization. J AOAC Int, 92(1), 34-41.

El Hawari, K., Daher, Z., Verdon, E., & Al Iskandarani, M. (2017). Impact of ion-pairs for the determination of multiclass antimicrobials residues in honey by LC-MS/MS. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 34(12), 2131-2143.

El-Enany, N. M., Abdelal, A., & Belal, F. (2011). Spectrofluorimetric determination of sertraline in dosage forms and human plasma through derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. Chemistry Central Journal, 5(1), 1-8.

European Commission (2003). Commission Decision amending Decision 2002/657/EC, Official Journal of European Communities, L71.

European Commission (2010). Commission Regulation 37/2010, Official Journal of European Communities, L15.

Farouk, F., Azzazy, H. M., & Niessen, W. M. (2015). Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. Anal Chim Acta, 890, 21-43.

Galarini, R., Saluti, G., Giusepponi, D., Rossi, R., Moretti, S. (2014), Multiclass determination of 27 antibiotics in honey, Food Control, 48, 12-24.

Glinka, M., Wojnowski, W., & Wasik, A. (2020). Determination of aminoglycoside antibiotics: Current status and future trends. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 131, 116034.

Hubicka, U., Krzek, J., Woltyska, H., & Stachacz, B. (2009). Simultaneous identification and quantitative determination of selected aminoglycoside antibiotics by thin-layer chromatography and densitometry. Journal of AOAC International, 92(4), 1068-1075.

Huidobro, A., Garcia, A., & Barbas, C. (2009). Rapid analytical procedure for neomycin determination in ointments by CE with direct UV detection. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 49(5), 1303-1307.

Husek, P., & Simek, P. (2006). Alkyl chloroformates in sample derivatization strategies for GC analysis. Review on a decade use of the reagents as esterifying agents. Current Pharmaceutical Analysis, 2(1), 23-43

Impens, S., Reybroeck, W., Vercammen, J., Courtheyn, D., Ooghe, S., Wasch, K., Smedts, W., Brabander, H., (2003), Screening and confirmation of

chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC–MS2 and LC–MS2. Analytica Chimica Acta, 483, 153–163.

İsmail Emir, A., Ece, Y. K., Sinem, R., Sezer, A., & Özge, E. (2021). Validation of two UHPLC-MS/MS methods for fast and reliable determination of quinolone residues in honey. Food Additives & Contaminants: Part A, 38(5), 807-819.

Jiang, L., Wei, D., Zeng, K., Shao, J., Zhu, F., & Du, D. (2018). An enhanced direct competitive immunoassay for the detection of kanamycin and tobramycin in milk using multienzyme-particle amplification. Food Analytical Methods, 11(8), 2066-2075.

Jin, Y., Jang, J. W., Lee, M. H., & Han, C. H. (2006). Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin. Clin Chim Acta, 364(1-2), 260-266.

Khondker, A., Bider, R. C., Passos-Gastaldo, I., Wright, G. D., & Rheinstadter, M. C. (2021). Membrane interactions of non-membrane targeting antibiotics: The case of aminoglycosides, macrolides, and fluoroquinolones. Biochim Biophys Acta Biomembr, 1863(1), 183448.

Kim, Y. R., & Kang, H.-S. (2021). Multi-residue determination of twenty aminoglycoside antibiotics in various food matrices by dispersive solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Control, 130, 108374.

Liu, C., Jiang, Y., Xiu, L., Qian, R., Zhao, M., Luo, P., Ke, Y., Li, G., & Jiang, W. (2021). Ultratrace Analysis of Neomycin Residues in Milk at Femtogram Levels by Flow-Through Immunoaffinity Chromatography Test. Food Analytical Methods, 14(11), 2298-2307.

Lopez, M. I., Pettıs, J. S., Smıth, I. B., Chu, P.S. (2008), Multiclass Determination and Confirmation of Antibiotic Residues in Honey Using LC-MS/MS, Journal of Agricultural Food Chemistry, 56, 1553–1559.

Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. d., Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of Apis mellifera honey: A review. Journal of Apicultural Research, 57(1), 5-37.

McGlinchey, T. A., Rafter, P. A., Regan, F., & McMahon, G. P. (2008). A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. Anal Chim Acta, 624(1), 1-15.

Megoulas, N. C., & Koupparis, M. A. (2004). Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic determination of neomycin based on highly volatile mobile phase, high-molecular-mass ion-pairing reagents and controlled peak shape. Journal of Chromatography A, 1057(1-2), 125-131.

Mohammadi, B., Tammari, E., Fakhri, S., & Bahrami, G. (2013). Applicability of LC–MS/MS to optimize derivatization of topiramate with FMOC-Cl using reacted/intact drug ratio. Journal of Chromatography B, 928, 32-36.

Moosbeckhofer, R., Wallner, K., Pechhacker, H., Luh., M., Womastek, R. (1995), Residue Level in Honey. Wax and Propolis After Ten Years of Varrao Treatment in Austria. The XXXIVth International Apicultural Congess, 15-19.

Moreno-Gonzalez, D., Lara, F. J., Jurgovska, N., Gamiz-Gracia, L., & Garcia-Campana, A. M. (2015). Determination of aminoglycosides in honey by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry and extraction with molecularly imprinted polymers. Anal Chim Acta, 891, 321-328.

Nakazawa, H., Ino, S., Kato, K., Watanabe, T. (1999), Simultaneous determination of residual tetracyclines in food by highperformance liquid chromatogaphy with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 732(1), 55-64.

Opekar, F., Coufal, P., Stulvk, K. (2009), Rapid capillary zone electrophoresis along short separation pathways and its use in some hyphenated systems: A critical review, Chemical Reviews, vol. 109, 4487–4499.

Ortelli, D., Edder, P., & Corvi, C. (2004). Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Chromatographia, 59(1), 61-64.

Özmen, N. ve Alkın, E. (2006), Balın antimikrobiyel özellikleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. Uludağ Arıcılık Dergisi, 155-160.

Pang, G.-F., Zhang, J.-J., Cao, Y.-Z., Fan, C.-L., Lin, X.-M., InlI, Z.-Y., & Jia, G.-Q. (2004). Evaluation of analyte stability and method ruggedness in the determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography with post-column derivatization. Journal of AOAC International, 87(1), 39-44.

Peru, K. M., Kuchta, S. L., Headley, J. V., & Cessna, A. J. (2006). Development of a hydrophilic interaction chromatography–mass spectrometry assay for spectinomycin and lincomycin in liquid hog manure supernatant and run-off from cropland. Journal of Chromatography A, 1107(1-2), 152-158.

Reybroeck, W. (2003), Residues of antibiotics and sulfonamides in honey on the Belgian Market. Apiacta, 2003; 38, 23-30.

Rodzıewıcz, L. (2008), Rapid determination of chloramphenicol residues in milk powder by liquid chromatogaphy–elektrospray ionization tandem mass spectrometry. Talanta, 75, 846–850.

Rose, M.D., Bygave, J., Sharman, M. (1999), Effect of cooking on veterinary drug residues in food, Bioanalytical Chemistry, 387, 1287-1299.

Sachetelli, S., Beaulac, C., & Lagacé, J. (1998). Aminoglycoside detection using a universal ELISA binding procedure onto polystyrene microtiter plates in comparison with HPLC analysis and microbiological agar-diffusion assay. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1379(1), 35-41.

Saluti, G., Diamanti, I., Giusepponi, D., Pucciarini, L., Rossi, R., Moretti, S., Sardella, R., & Galarini, R. (2018). Simultaneous determination of aminoglycosides and colistins in food. Food Chem, 266, 9-16.

Shimanuki, H., & Knox, D. A. (2000). Diagnosis of honey bee diseases. Agriculture Handbook (Washington) (690 rev.).

Sunay, A. (2006), Balda antibiyotik kalıntısı sorunu. Uludağ Arıcılık Dergisi, s. 143-148.

Thiele-Bruhn, S., (2003), Pharmaceutical antibiotic compounds in soils-A rewiev. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 166, 145-167.

Tölgyesi, Á., Barta, E., Sohn, M., & Sharma, V. K. (2018). Determination of antimicrobial residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Analytical Methods, 11(8), 2043-2055.

Tsikas, D., Sandmann, J., Holzberg, D., Pantazis, P., Raida, M., & Frolich, J. C. (1999). Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. Anal Biochem, 273(1), 32-40.

Van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E. (1999), Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health, Drugs, vol.58, 589-607.

Vidal, J. L. M., Luız, M. D. M. A., Gonzalez, R. R., Frenıch, A. G. (2009), Multiclass Analysis of Antibiotic Residues in Honey by Ultraperformance Liquid Chromatogaphy-Tandem Mass Spectrometry, Journal of Agricultural Food Chemistry, 57, 1760–1767.

Wang, J., Leung, D. (2012), The challenges of developing a generic extraction procedure to analyze multi-class veterinary drug residues in milk and honey using ultra-high pressure liquid chromatogaphy quadrupole time-of-flight mass spectrometry, Drug Test Analysis, 4 (1), 103–111.

Williams, D.L. (2000), A veterinary approach to the European honey-bee (Apis mellifera). Veterinary Journal; 160, 61-73.

Xu, N., Qu, C., Ma, W., Xu, L., Xu, L., Liu, L., Kuang, H., & Xu, C. (2011). Development and application of one-step ELISA for the detection of neomycin in milk. Food and agricultural immunology, 22(3), 259-269.

Yang, B., Wang, L., Luo, C., Wang, X., & Sun, C. (2017). Simultaneous Determination of 11 Aminoglycoside Residues in Honey, Milk, and Pork by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry and Molecularly Imprinted Polymer Solid Phase Extraction. J AOAC Int, 100(6), 1869-1878.

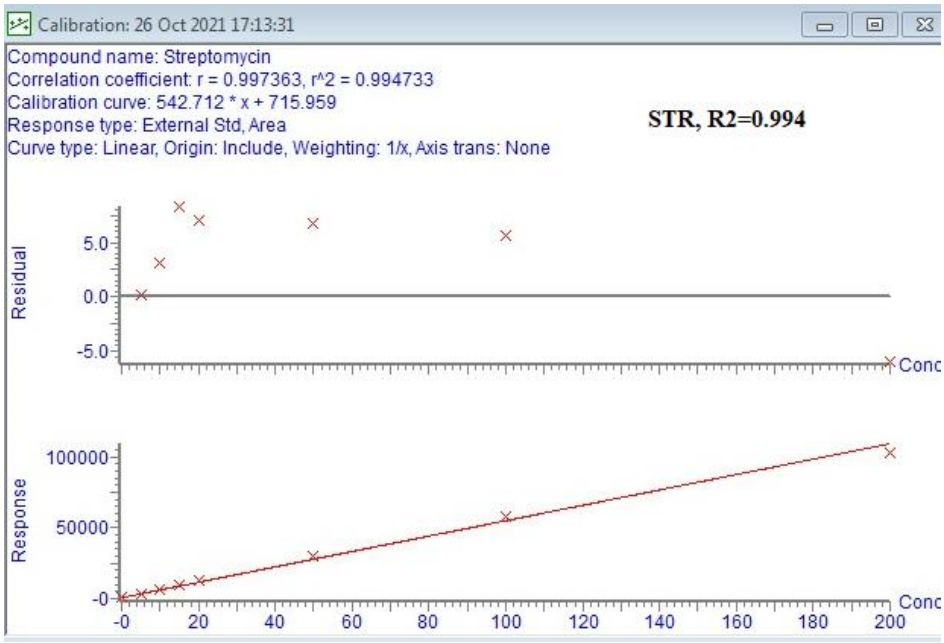
Young, M. S., van Tran, K., Goh, E., & Shia, J. C. (2014). A rapid SPE-based analytical method for UPLC/MS/MS determination of aminoglycoside antibiotic residues in bovine milk, muscle, and kidney. J AOAC Int, 97(6), 1737-1741.

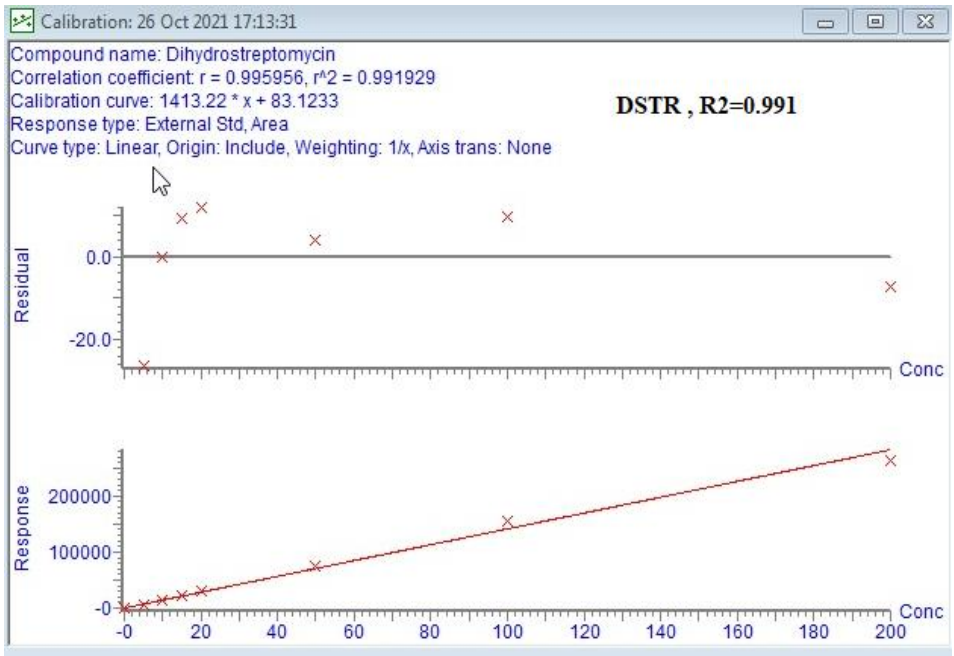
Ziegler, J., & Abel, S. (2014). Analysis of amino acids by HPLC/electrospray negative ion tandem mass spectrometry using 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl) derivatization. Amino Acids, 46(12), 2799-2808.

EKLER

EK A: Kalibrasyon grafikleri

Şekil A.1. STR ve DSTR Kalibrasyon grafikleri





EK B: Numune Analiz Sonuçları

Tablo B.1. Numune analiz sonuçları

Numuneler	[a]STR kalıntı kons. (µg/kg)	[b]DSTR kalıntı kons. (µg/kg)[c]	Botanik orijin
Kestane -1	nd	nd	Kestane Balı (*n* = 14)
Kestane -2	nd	nd	
Kestane -3	nd	nd	
Kestane -4	nd	nd	
Kestane -5	nd	83.7 ± 1.2*	
Kestane -6	nd	nd	
Kestane -7	8.6 ± 0.2*	nd	
Kestane -8	nd	nd	
Kestane -9	nd	nd	
Kestane-10	nd	nd	
Kestane -11	nd	154.8 ± 3.8*	
Kestane -12	nd	nd	
Kestane -13	nd	nd	
Kestane -14	nd	nd	
Akasya -1	nd	nd	Akasya Balı, (*n* = 15)
Akasya -2	nd	nd	
Akasya -3	nd	nd	
Akasya -4	10.8 ± 0.7*	1131.8 ± 11.3*	
Akasya -5	nd	29.6 ± 1.1*	
Akasya -6	nd	nd	
Akasya -7	nd	nd	
Akasya -8	nd	nd	
Akasya -9	nd	nd	
Akasya -10	nd	99.8 ± 2.5*	
Akasya -11	nd	382.3 ± 9.8*	
Akasya -12	nd	nd	
Akasya -13	nd	9.1 ± 0.4*	
Akasya -14	nd	nd	
Akasya -15	nd	nd	
Çam -1	nd	nd	Çam Balı , (*n* = 24)
Çam -2	nd	nd	
Çam -3	nd	nd	
Çam -4	nd	nd	
Çam -5	nd	nd	
Çam -6	nd	nd	
Çam -7	nd	nd	
Çam -8	nd	nd	
Çam -9	nd	nd	
Çam -10	nd	nd	
Çam -11	nd	nd	
Çam -12	nd	nd	
Çam -13	nd	nd	
Çam -14	nd	nd	
Çam -15	nd	nd	
Çam -16	nd	nd	
Çam -17	nd	13.2 ± 0.5*	

Çam -18	nd	nd	
Çam -19	nd	nd	
Çam -20	nd	nd	
Çam -21	nd	138.5 ± 2.8*	
Çam -22	nd	58.1 ± 1.8*	
Çam -23	nd	nd	
Çam -24	nd	nd	
Çiçek -1	nd	nd	
Çiçek -2	nd	132.0 ± 5.2*	
Çiçek -3	nd	nd	
Çiçek -4	nd	nd	
Çiçek -5	nd	nd	
Çiçek -6	nd	nd	
Çiçek -7	nd	nd	
Çiçek -8	nd	nd	
Çiçek -9	nd	275.1 ± 5.2*	
Çiçek -10	nd	230.4 ± 8.7*	
Çiçek -11	nd	nd	
Çiçek -12	nd	nd	
Çiçek -13	nd	54.8 ± 1.9*	
Çiçek -14	nd	nd	
Çiçek -15	nd	nd	
Çiçek -16	11.7 ± 0.8*	897.4 ± 12.3*	
Çiçek -17	nd	nd	
Çiçek -18	nd	nd	
Çiçek -19	nd	nd	
Çiçek -20	nd	nd	
Çiçek -21	nd	nd	
Çiçek -22	nd	61.5 ± 0.7*	
Çiçek -23	nd	28.0 ± 0.5*	Çiçek Balı , (n = 57)
Çiçek -24	nd	nd	
Çiçek -25	nd	nd	
Çiçek -26	nd	nd	
Çiçek -27	nd	nd	
Çiçek -28	nd	nd	
Çiçek -29	nd	nd	
Çiçek -30	nd	nd	
Çiçek -31	5.4 ± 0.2*	nd	
Çiçek -32	nd	376.5 ± 9.3*	
Çiçek -33	nd	25.6 ± 0.6*	
Çiçek -34	nd	nd	
Çiçek -35	nd	nd	
Çiçek -36	nd	467.9 ± 11.8*	
Çiçek -37	nd	nd	
Çiçek -38	nd	nd	
Çiçek -39	nd	nd	
Çiçek -40	nd	nd	
Çiçek -41	nd	27.9 ± 1.4*	
Çiçek -42	nd	nd	
Çiçek -43	nd	34.4 ± 1.7*	
Çiçek -44	nd	nd	
Çiçek -45	nd	nd	

Çiçek -46	nd	161.6 ± 7.8*
Çiçek -47	nd	nd
Çiçek -48	nd	nd
Çiçek -49	nd	nd
Çiçek -50	nd	5.7 ± 0.1*
Çiçek -51	nd	nd
Çiçek -52	nd	nd
Çiçek -53	6.1 ± 0.2*	791.4 ± 12.5*
Çiçek -54	nd	14.4 ± 0.4*
Çiçek -55	nd	8.8 ± 0.7*
Çiçek -56	nd	nd
Çiçek -57	nd	nd

[a]STR; Streptomisin, [b]DSTR; Dihidrostreptomisin, [c] CCα üzerindeki konsantrasyonlarda tespit edilen bileşikler ve CCα 'nın altındaki konsantrasyonlarda tespit edilen bileşikler tabloda nd olarak belirtilmiştir. Sonuçlar üç sonuç ortalaması ± SD şeklinde belirtilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar her bir bileşik için belirtilmiştir (*p>0.05), nd; tespit edilmedi.

ÖZGEÇMİŞ

2006 yılında Beykoz, Fevzi Çakmak Lisesi (YDA)'dan mezun oldu. Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nü 2012 yılında bitirdi. 2020 yılında Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Analitik Kimya bölümünde yüksek lisans öğrenimine başladı. Evli ve bir kızı vardır.

Tezden Türetilen Sunum-Yayınlar

1. **Ece Kök Yetimoğlu**, Sezer Acar, "Single pot in situ aqueous derivatization and subsequent determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in honey by means of mass spectrometry", **https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134826**

2. **Sezer Acar**, Ece Kök Yetimoğlu, "Baldaki Aminoglikozitlerin Tek Tüp İçerisinde İn-Situ Sulu Faz Türevlendirme Sonrasında Kütle Spektrometresi İle Tayin Edilmesi", **4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2021) Kongresi**, **Sözlü Sunumu.**

3. **Sezer Acar, "**Single Pot In-Situ Aqueous Derivatization and Subsequent Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Honey by Means of Mass Spectrometry"**, 47th Apimondia International Apicultural Congress, Sözlü Sunum.**