MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UPLC-ESI-MS/MS İLE KİNOLON ANTİBİYOTİKLERİNİN BALLARDA TESPİTİNE YÖNELİK ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

İSMAİL EMİR AKYILDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

İSTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UPLC-ESI-MS/MS İLE KİNOLON ANTİBİYOTİKLERİNİN BALLARDA TESPİTİNE YÖNELİK ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

İSMAİL EMİR AKYILDIZ
520415003

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

İSTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi İsmail Emir AKYILDIZ'ın **"UPLC-ESI-MS/MS ile Kinolon Antibiyotiklerinin Ballarda Tespitine Yönelik Analitik Yöntem Geliştirilmesi"** başlıklı tez çalışması, ……30/11/2017….tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Adı SOYADI	(Danışman)	
Marmara Üniversitesi	Ece KÖK YETİMOĞLU	(İMZA).....
Prof.Dr. Adı SOYADI	(Üye)	
İstanbul Üniversitesi	Hayati FİLİK	(İMZA).....
Yrd.Doç.Dr. Adı SOYADI	(Üye)	
Marmara Üniversitesi	Soner ÇUBUK	(İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04.12.2017 tarih ve 2017/26-02 sayılı kararı ile İsmail Emir AKYILDIZ'ın Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ

ÖNSÖZ

Bu Yüksek Lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya programında gerçekleştirilmiş ve FEN-C-YLP-090217-0061 no'lu proje kapsamında Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Çalışmamın her aşamasında yol gösterici olan, değerli bilgilerini benimle paylaşan danışman hocam, Prof. Dr. Ece Kök YETİMOĞLU'na, bilimsel ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Soner ÇUBUK'a,

Çalışmamın projelendirme sürecinde tecrübeleri ile bana destek olan Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Analitik Kimya Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Aykut KAPLAN'a,

Çalışmamın analiz aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ALTIPARMAK GIDA A.Ş. Ar-Ge laboratuvarı çalışanlarına,

Her zaman gösterdikleri sabır ve destekleri için sevgili eşime,

Sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız…

KASIM, 2017 **İsmail Emir AKYILDIZ**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ÖZET ..... **vii**
ABSTRACT ..... **ix**
SEMBOLLER ..... **xi**
KISALTMALAR ..... **xi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xiv**
TABLO LİSTESİ ..... **xvi**
BÖLÜM 1. GİRİŞ **1**
1.1. Amaç 3
1.2. Arı Hastalıkları 4
1.3. Baldaki Kirlilik ve Kalıntı Kaynakları 4
1.4. Ballarda Antibiyotik Kalıntısının Nedenleri 7
1.5. Balın Bileşimi ve Genel Özellikleri 9
1.6. Antibiyotik Kalıntılarına İlişkin Yasal Düzenlemeler 10
1.7. Kalıntı Yöntemlerinin Analitik Performansı ve Sonuçlarının Yorumlanması İle İlgili Esaslar 11
1.8. Antibiyotik 13
1.8.1. Antibakteriyeller 14
1.9. Antibiyotiklerin Etki Mekanizması 14
1.10. Antibiyotiklerin Sınıflandırmaları 15
1.11. Antibiyotiklerin Etkilerine Göre Sınıflandırılması 16
1.11.1. Bakteriyostatikler 16
1.11.2. Bakterisidler 16
1.12. Kinolonlar 16
1.12.1. Fizikokimyasal özellikler 19
1.13. Antibiyotik Kalıntılarının İnsan Sağlığı Üzerine Olumsuz Etkileri 24
1.14. Antibiyotik Kalıntılarının Tespitinde Kullanılan Yöntemler 25
1.14.1. Tarama testleri 27
1.14.2. Doğrulama metotları 27
1.15. Ballarda Kinolon Kalıntı Analizlerinde Kullanılan Yöntemler 28

1.16. Numune Ekstraksiyon Teknikleri 29
1.16.1. Quechers 29
1.16.2. Dispersif SPE (d-SPE) 30
1.16.3. Dilute & shoot (Seyrelt-Enjekte Et) 31
1.17. Kinolon Analizlerindeki Analitik Problemler 32
1.18. Kinolonların Enstrümental Tayin Yöntemleri 33
1.18.1. Kapiler elektroforez 33
1.18.2. Kromatografik ayrım 33
1.18.3. Kromatografik ayrımların sınıflandırılması 34
1.18.4. Sıvı kromatografisi 34
1.18.5. Ters faz kromatografisi 35
1.18.6. Sıvı kromatografisi cihazları 35
1.18.7. HPLC enstrümanları 36
1.18.7.1. Pompa sistemleri 36
1.18.7.2. Enjeksiyon sistemleri 37
1.18.7.3. Kolonlar 37
1.18.7.4. HPLC dedektörleri 38
1.18.8. Ultra performanslı sıvı kromatografi–UPLC 39
1.18.9. UPLC prensibi 40
1.18.10. UPLC enstrümanları / sistemleri 42
1.18.11. UPLC kolonları 42
1.18.12. UPLC dedektörleri 43
1.19. Kütle Spektrometresi 43
1.20. MS Enstrümantasyonu 44
1.21. MS Dedektör İçin İyonizasyon Teknikleri 45
1.21.1. Termosprey metotlar 45
1.21.1.1. Elektrosprey iyonizasyonu (ESI) 45
1.21.2. Kuadrupol cihazları 46
1.22. Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS) 47
1.23. Kütle Spektrometresi Dedektörleri 47
1.23.1. Electron çoklayıcı dedektör 47
1.24. Tandem MS/MS Sisteminin Avantajları 47

BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM 49
2.1. Materyaller 49
2.1.1. Bal numuneleri 49
2.1.2. Kullanılan kimyasallar 49
2.1.3. Kullanılan ekipmanlar 51
2.1.3.1. Laboratuvar araçları ve cam materyaller 51
2.1.3.2. LC-MS/MS cihazı ve ekipmanları 52
2.1.3.3. UPLC kolonları 53
2.1.4. Kullanılan reaktifler ve hazırlanışları 53
2.1.4.1. Mobil fazların hazırlanması 53
2.1.4.2. Kullanılan reaktiflerin hazırlanması 53
2.1.4.3. Kullanılan standartların stok ve çalışma standartlarının hazırlanması 54
2.2. Yöntemler 56
2.2.1. Florokinolonların ballarda tespiti için geliştirilen yöntemler 56
2.2.1.1. Örnek hazırlama-1 (Dilute & Shoot) (seyrelt-enjekte et) 56
2.2.1.2. Örnek hazırlama-2 (QuEChERS) 57
2.2.2. UPLC / Tandem MS metot final parametreleri 57
2.3. Metot Geliştirme ve Optimizasyon 59
2.3.1. UPLC komatografi optimizasyonu 59
2.3.2. Tandem MS metot optimizasyonu 60
2.3.3. Kütle spektrometresi valf program optimizasyonu 60
2.3.4. Numune hazırlık optimizasyonu 61
2.3.4.1. Seyrelt ve enjekte et metodu 61
2.3.4.2. Quechers metodu 61
2.4. Metot Validasyon Prosedürleri 62
2.4.1. Seçicilik 62
2.4.2. Aralık ve doğrusallık 62
2.4.3. Doğruluk 63
2.4.4. Kesinlik 64
2.4.4.1. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik 64
2.4.4.2. Sistem tekrarlanabilirliği (sistem uygunluğu) 64

2.4.5. Hassasiyet 65
2.4.5.1. Dedeksiyon limiti (LOD) 65
2.4.5.2. Kantitasyon limiti (LOQ) 65
2.4.6. Sağlamlık (Ruggedness) 65
2.4.7. Sağlamlık (Robustness) 66
2.4.8. İç standart yöntemi ve seçimi 66
BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA 67
3.1. Bulgular 67
3.1.1. Balların palinolojik testi 67
3.1.2. UPLC kromatografi optimizasyonu sonuçları 67
3.1.2.1. Mobil faz modifiye edicilerin etkileri 67
3.1.2.2. Gradyan profillerinin etkileri 72
3.1.2.3. Enjeksiyon hacminin etkileri 73
3.1.2.4. Mobil faz akışının etkileri 74
3.1.2.5. Kolon ve kolon uzunluğunun etkileri 75
3.1.2.6. Farklı kolon fırını sıcaklıklarının etkisi 76
3.1.2.7. Tandem MS metot optimizasyonu sonuçları 77
3.1.2.8. Kütle spektrometresi valf program optimizasyon sonuçları 81
3.1.2.9. Seyrelt ve enjekte et metodu optimizasyon sonuçları 82
3.1.2.10. Quechers metodu ile hazırlık optimizasyon sonuçları 86
3.1.3. Metot validasyon sonuçları 89
3.1.3.1. Seçicilik sonuçları 89
3.1.3.2. Hassasiyet sonuçları (LOD & LOQ) 91
3.1.3.3. Aralık ve doğrusallık sonuçları 92
3.1.3.4. Doğruluk sonuçları 93
3.1.3.5. Kesinlik sonuçları 96
3.1.3.6. Sağlamlık (Ruggedness) sonuçları 105
3.1.3.7. Sağlamlık (Robustness) sonuçları 106
3.1.4. Bal numunelerinin analiz sonuçları 107
3.2. Tartışma 107
3.2.1. Metot optimizasyonu 107

3.2.2. Mobil faz içeriğinin belirlenmesi 107
3.2.2.1. Mobil faz modifiye edicilerinin etkileri 107
3.2.3. Gradyan profilinin seçimi 108
3.2.4. Akış hızının seçimi 109
3.2.5. Analitik kolon seçimi 109
3.2.6. Farklı kolon fırını sıcaklıklarının etkisi 110
3.2.7. Enjeksiyon hacminin etkileri 110
3.2.8. Tandem MS metot optimizasyonu sonuçları 110
3.2.9. Kütle spektrometresi valf program optimizasyon sonuçları 111
3.2.10. Numune hazırlık optimizasyon sonuçları 111
3.2.10.1. Seyrelt ve enjekte et metodu 111
3.2.10.2. Quechers metodu 112
3.2.11. Metot validasyon sonuçları 113
3.2.11.1. Seçicilik 113
3.2.11.2. Hassasiyet (LOD & LOQ) 113
3.2.11.3. Aralık ve doğrusallık 114
3.2.11.4. Doğruluk 114
3.2.11.5. Kesinlik 114
3.2.11.6. Sağlamlık (Ruggedness) 115
3.2.11.7. Sağlamlık (Robustness) 115
3.2.12. Analiz edilen bal numune sonuçları 115
BÖLÜM 4. SONUÇ VE ÖNERİLER 117
4.1. Genel Sonuç 117
4.2. Öneriler 117
KAYNAKLAR 119
EKLER 132
ÖZGEÇMİŞ 147

ÖZET

UPLC-ESI-MS/MS İLE KİNOLON ANTİBİYOTİKLERİNİN BALLARDA TESPİTİNE YÖNELİK ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Anahtar Kelimeler: Florokinolon, Antibiyotik, UPLC-MS/MS, Bal

Kinolonlar, C_9H_7N kapalı formülüne sahip heterosiklik aromatik organik yapıda, antibakteriyel etkili bileşiklerdir. Kinolon molekülüne florun eklenmesi ile sentezlenen florokinolonlar, bakterilerin sitoplazmasına girerek DNA replikasyonunu ve DNA transkripsiyonunu bozar. Florokinolon gibi birçok antibiyotik grubunun hayvanlardaki yanlış uygulamaları sonucunda gıda maddelerinde kalıntılar oluşabilmektedir. Ballardaki ilaç kalıntılarının nedeni, arı hastalıklarının azaltılması amacıyla kovanda ilaç uygulanması veya zirai mücadelede kullanılan ilaçlardır. Antibiyotik kalıntıları genelde 'Amerikan ya da Avrupa yavru çürüğü' hastalıklarının tedavilerinde kullanılan antibiyotiklerden kaynaklanmaktadır. Kalıntı barındıran balların tüketilmesi ile halk sağlığı olumsuz yönde etkilenebilmektedir. Antibiyotik kalıntıların, kişilerde alerjik reaksiyonlara yol açmasının yanı sıra patojenik bakterilerde antibiyotik direncinin yükselmesini de teşvik ettiği bilinmektedir. Antibiyotik kalıntı seviyelerinin belirlenmesi için ELISA yöntemleri, Gaz Kromatografi ve HPLC yöntemleri geliştirilmiş ve kullanılmış olup, son senelerde LC-MS/MS teknolojileri daha hassas, özgül ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi dolayısı ile tercih edilmektedir. Literatür taramasında, arıcılıkta kullanılan ve ballarda kalıntısına rastlanan kinolon antibiyotiklerinin analizleri, HPLC-UV ve HPLC-FL yöntemleri ile uzun ve maliyetli saflaştırma ya da ekstraksiyon yöntemleri içerdiği ve verilerin yüksek LOQ değerlerinde, düşük geri kazanımlarda seyrettiği görülmüştür. UPLC-ESI-MS/MS sistemi kullanarak çok daha kısa süreli bir analiz yöntemi geliştirilmiş olup, numune hazırlık süreçleri minimize edilmiştir. Sıklıkla karşılaşılan siprofloksasin ve enrofloksasine ilave 19 farklı florokinolon türünün de görüntülenmesi yapılarak

multifonksiyonel bir tarama metodu 21 parametre üzerinden çok düşük limitlerde, 7 dakikalık görüntüleme süresi ile geliştirilmiştir. Balda florokinolon kalıntılarının tespiti için numune hazırlık yaklaşımı 2 farklı teknik üzerinden geliştirilmiş olup, seyrelt ve enjekte et metodu ile pratik, maliyeti düşük, kısa süreli şekilde analiz imkânı sağlanır iken, alternatif olarak, Quechers metodolojisi ile çok düşük limitlerde görüntüleme imkânı sağlayan, yüksek hassasiyetli bir numune hazırlık prosedürü geliştirilmiştir.

Yapılan validasyon çalışmaları seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve LOD & LOQ parametreleri üzerinden değerlendirilmiş olup, seyreltme yöntemi ile 1, 2, 5, 10, 20 µg/kg, Quechers metodunda ise 0,5, 1, 2, 5, 10 µg/kg konsantrasyonlarında doğrusallık çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanım değerleri, seyreltme metodu için %85,7 ile %112,86 arasında değişir iken, Quechers metodunda bu değerler %82,8 ile %117,8 aralığında seyretmektedir. Kesinlik çalışmalarında ise % RSD değerleri, tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik için, her iki metot içinde ortalama olarak %0,7 ile %13,2 aralığında gözlemlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri, seyreltme metodu için 1,00 µg/kg iken Quechers metodu için 0,5 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Her iki metod için de aynı kromatografik analiz parametreleri uygulanmış olup, analiz edilen toplam 50 adet bal numunesinde, 7 adet numune de enrofloksasin görüntülenmiş olup, lomefloksasin, sinoksasin, siprofloksasin, pipemidik asit ve danofloksasin diğer tespit edilen kinolon antibiyotikleridir.

KASIM, 2017 **İsmail Emir AKYILDIZ**

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF UPLC-ESI-MS/MS ANALYTICAL METHOD FOR QUINOLONE ANTIBIOTICS ANALYSIS IN HONEY

Keywords: Fluoroquinolone, Antibiotics, UPLC-MS/MS, Honey

Quinolones are antibacterial effective compounds in the heterocyclic aromatic organic structure having the closed formula C_9H_7N. The fluoroquinolones are synthesized by the addition of fluorine to the quinolone molecule and enter the cytoplasm of bacteria and disrupt DNA replication and DNA transcription. Many antibiotic groups, such as fluoroquinolone, are applied incorrectly to animals, which can lead to residues in foodstuffs. Medicines used in agicultural struggle and drugs applied at hives for the purpose of reducing bee diseases are the main reasons for the formation of residues in honey. Antibiotic residues are usually caused by antibiotics used in the treatment of 'american or european foulbrood' diseases in beekeeping. People's health can be affected negatively by the consumption of honeys which contain residues. Antibiotic residues may cause allergic reactions in humans, as well as increased antibiotic resistance in pathogenic bacteria. ELISA methods, gas chromatography and HPLC methods have been developed and used for the determination of antibiotic residue levels and LC-MS/MS technologies in recent years are preferred because they give more sensitive, specific and reproducible results. Research of analysis of quinolone antibiotics used in beekeeping and honey in the literature, including HPLC-UV and HPLC-FL methods, showed that long and costly purification methods were extensively used and results were observed at low LOQ values and low recoveries. A much shorter analysis method has been developed using the UPLC-ESI-MS/MS system and sample preparation processes have been minimized. A multifunctional screening method was developed on 21 parameters at very low limits with a 7 minutes run time by screening of 19 additional fluoroquinolones in addition to the frequently encountered ciprofloxacin and Enrofloxacin. The sample preparation approach for the detection of fluoroquinolone residues in honey has been developed on two different techniques and provides

practical, low cost, short time analysis by means of the dilution and injection method. Alternatively, Quechers methodology provides a high precision the sample preparation procedure has been developed.

Validation studies were evaluated on selectivity, linearity, accuracy, precision, robustness/ruggedness and LOD & LOQ parameters. Concentration of 1, 2, 5, 10, 20 μg/kg by the dilution method and 0.5, 1, 2, 5, 10 μg/kg in the Quechers method were used for linearity study. The recovery values ranged from 85.7% to 112.86% for the dilution method, while these values ranged from 82.8% to 117.8% in the Quechers method. For accuracy studies,% RSD values were observed on average between 0.7% and 13.2% in both methods for reproducibility and reproducibility. LOD and LOQ values were 1.00 μg/kg for the dilution method and 0.5 μg/kg for the Quechers method. The same chromatogaphic analysis parameters were applied for both methods. Enrofloxacin was screened in 7 samples on a total of 50 honey samples analyzed, and lomefloxacin, cinoxacin, ciprofloxacin, pipemidic acid and danofloxacin were other detected quinolone antibiotics.

NOVEMBER, 2017 **İsmail Emir AKYILDIZ**

SEMBOLLER

CCα **:** Karar Limiti
CCβ **:** Tespit Limiti
Dp **:** Partikül Çapı
g : Gram
kg : Kilogram
kV **:** Kilo Volt
LogP **:** Partitisyon Katsayısı
N **:** Teorik Plaka Katsayısı
pKa **:** Asitlik Sabiti
Rs **:** Rezolüsyon (Çözünürlük)
S/N **:** Sinyal / Gürültü
tr **:** Alıkonma Süresi (Kromatografi)

KISALTMALAR

ACN **:** Asetonitril
APCI **:** Atmosferik Basınçlı Kimyasal İyonizasyon
AB **:** Avrupa Birliği
BEH **:** Etilen Köprülü Hibrit Parçacık
CE **:** Kapiler Elektroforez
CV **:** Laboratuvarlar Arası Değişim Katsayısı
CAD **:** Çarpışma ile İndüklenen Dissosiyosyon
CLEIA **:** Chemiluminescence Enzyme Immunoassay
CRM **:** Sertifikalı Referans Malzeme
DNA **:** Deoksiribo Nükleik asit
d-SPE **:** Dispersif Katı Faz Ekstraksiyonu
DC **:** Direk Akım (Direct Current)
DAD **:** Diode Array Detector

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

ESI : Elektrosprey İyonizasyon

EI : Elektron Bombardıman İyonizasyonu

EPA : Çevre Koruma Ajansı

ECD : Elektron yakalama dedektörü

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EC : Avrupa Komisyonu (European Comission)

FL : Floresans

FQ : Florokinolon (Fluoroquinolones)

FEDESA : Avrupa Hayvan Sağlığı Federasyonu

FAO : Food and Agicultural Organization

FLD : Fluorometrik Dedektör

FDA : Food and Drug Administration

Fopt : Optimum Akış Hızı

GCB : Graphitized Carbon Black

GC : Gaz Kromatografi

HPLC : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

HSS : High Strength Silica

HCL : Hidroklorik Asit

HETP : Total Plaka Yüksekliği (Van Deemter Equation)

IS : İç Standart (İnternal Standard)

IR : Kızılötesi (İnfrared)

LC : Sıvı Kromatografi

LC-MS/MS : Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi

LOQ : Kantitasyon Limiti (Limit of Quantitation)

LOD : Dedeksiyon Limiti (Limit of Detection)

mL : Mililitre

MS : Kütle Spektrometresi

MRL : Maksimum Kalıntı Limiti

$MgSO_4$: Magnezyum Sülfat

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption İonization

MS/MS : Tandem Kütle Spektrometresi

MRPL	**:** Maksimum Kalıntı Performans Limiti
MRM	**:** Multiple Reaction Monitoring (Çoklu Reaksiyon Görüntüleme)
MeOH	**:** Metanol
NP-LC	**:** Normal Faz Sıvı Kromatografisi
NaCl	**:** Sodyum Klorür
NaOAc	**:** Sodyum Asetat
NMR	**:** Nükleer Manyetik Rezonans
ODS	**:** octadecyltrimethoxysilane (C18)
PSA	**:** Primer Sekonder Amin
PPB	**:** Per Part Billion (milyarda bir - µg/kg)
PAH	**:** Poli Aromatik Hidrokarbonlar
PA	**:** Pik Asimetrisi
PPM	**:** Per Part Million (Milyonda bir - mg/kg)
QUECHERS	**:** Quick-Easy-Cheap-Rugged and Safe
QC	**:** Kalite Kontrol (Quality Control)
RF	**:** Radyo Frekans
RSD	**:** Relatif Standart Sapma
RP-LC	**:** Ters Faz Sıvı Kromatografisi
RT	**:** Alıkonma Süresi
RNA	**:** Ribo Nükleik Asit
ROSA	**:** Rapid One Step Assay
SPE	**:** Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction)
THF	**:** Tetrahidrofuran
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
WHO	**:** Dünya Sağlık Örgütü
V	**:** Volt

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1. Antibiyotik gruplarının etki mekanizmaları 15
Şekil 1. 2. Florokinolonların genel molekül yapısı 17
Şekil 1. 3. Quechers genel hazırlık prosedürü (ekstraksiyon-salting out) 30
Şekil 1. 4. Quechers genel hazırlık prosedürü (clean-up) (d-SPE) 31
Şekil 1. 5. Kromatografi tekniğinin sınıflandırılması 34
Şekil 1. 6. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazı genel diyagramı 36
Şekil 1. 7. HPLC örnekleme valfinin çalışma prensibi 37
Şekil 1. 8. Van Deemter grafiklerinde, kolon dolgu maddesi parçacık boyutunun etkisi 40
Şekil 1. 9. ACQUITY UPLC kolonları 43
Şekil 1. 10. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri 44
Şekil 1. 11. ESI- LC/MS arayüz diyagramı 45
Şekil 1. 12. Dört kutuplu bir (kuadrupol) kütle analizörü 46
Şekil 1. 13. Kuadropol MS sistemin şematik görünümü 46
Şekil 1. 14. Üç kademeli kuadrupol (TSQ) kütle analizörü 47
Şekil 3. 1. Asetik asit ve formik asit eklentisinin (%0,005), 1 ppb konsantrasyondaki kinolonlara etkisi (alıkonma süreleri ve pik alanlarının karşılaştırılması) 69
Şekil 3. 2. Mobil faz B'nin organik solvent yüzdesinin optimizasyonu (MeOH ve ACN karşılaştırması) 69
Şekil 3. 3. Optimizasyon çalışmalarında uygulanan gradyan profilleri (A-Lineer) 72
Şekil 3. 4. Optimizasyon çalışmalarında uygulanan gradyan profilleri (B-Lineer) 72
Şekil 3. 5. Optimizasyon çalışmalarında uygulanan gradyan profilleri (C-Konveks) ... 73
Şekil 3. 6. Optimizasyon çalışmalarında uygulanan gradyan profilleri (D-Konkav) 73
Şekil 3. 7. Seyrelt ve enjekte et metodu ile gerçekleştirilen floksasin analizinde, 10 ve 15 µl enjeksiyonun karşılaştırılması 74
Şekil 3. 8. Orbifloksasin analitik saf standardının, MS 1 ve MS/MS modundaki tarama çalışmaları sonucunda tespit edilen kütle spektrumları 78
Şekil 3. 9. MRM kütüphanesindeki, kinolon bileşenlerine ait tarama aralığı 78

Şekil 3. 10. Elektrosprey iğnesine uygulanan 1 kV 'lık gerilim sonucu elde edilen kinolon analitlerine ait kromatogramlar 79
Şekil 3. 11. Elektrosprey iğnesine uygulanan 3 kV 'lık gerilim sonucu elde edilen kinolon analitlerine ait kromatogramlar 79
Şekil 3. 12. MS sistemi üzerinde bulunan dağıtıcı valfin çalışma prensibi..... 82
Şekil 3. 13. EDTA Mcilvaine tamponu ve %10 Meoh çözeltilerin kullanımı ile elde edilen karşılaştırma kromatogramları (5 µg/kg)..... 83
Şekil 3. 14. Seyrelt ve enjekte et metodu ile hazırlanmış, 2 µg/kg florokinolon mix standart ile kirletilmiş bal numunesine ait örnek kromatogramlar 84
Şekil 3. 15. Quechers et metodu ile hazırlanmış, 1 µg/kg derişimde florokinolon mix standart ile kirletilmiş bal numunesine ait örnek kromatogramlar 87
Şekil 3. 16. Matriks etkisi olan kör numune kromatogramları (seyrelt & enjekte et).... 90

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 1. Yasaklı ilaç kalıntılarının hayvansal gıdalarda bulunma sebepleri 2
Tablo 1. 2. Antibiyotiklerin başlıca kullanım alanları 6
Tablo 1. 3. Veteriner ilaçların sınıflandırılması..... 8
Tablo 1. 4. 2002/657/EC regülasyonları metot gereksinimleri..... 13
Tablo 1. 5. Antibiyotiklerin, antibakteriyel etki spektrumuna göre gruplandırılması ... 15
Tablo 1. 6. Bakteriyostatik ve bakterisid etkili antibakteriyeller..... 16
Tablo 1. 7. Geliştirilen metotta yer alan florokinolon bileşenlerine ait fiziksel özellikler ve molekül yapıları 20
Tablo 1. 8. Arıcılıkta kullanılan, sınıflandırılmış antibiyotikler..... 22
Tablo 2. 1. Stok standart hazırlama tablosu.....54
Tablo 2. 2. Kalibrasyon standartları hazırlama tablosu (seyrelt & enjekte et) 56
Tablo 2. 3. Kalibrasyon standartları hazırlama tablosu (QUECHERS)..... 56
Tablo 2. 4. UPLC metot şartları..... 57
Tablo 2. 5. UPLC pompa gradyan programı 58
Tablo 2. 6. Kütle spektrometresi MS ve tune parametreleri..... 58
Tablo 2. 7. Geliştirilen metotlar için kantitasyon parametreleri 58
Tablo 2. 8. Kütle spektrometresi valf programı..... 59
Tablo 3. 1. Mobil faz modifiye edicilerin kinolon antibiyotiklerinin iyonlaşma derecelerine olan etkileri.....70
Tablo 3. 2. Kinolon bileşenlerinin analizinde, akış hızının kromatografik parametrelere olan etkisi..... 75
Tablo 3. 3. Kolon uzunluklarının kromatografik parametrelere olan etkisi 76
Tablo 3. 4. Kütle spektrometresi MS ve tune parametreleri..... 80
Tablo 3. 5. ESI-MS metodu için kullanılan kinolon ana ve parçalanma iyonları ve bunlara ait optimize edilmiş cone voltajları ve çarpışma enerjileri..... 80
Tablo 3. 6. Yapılan optimizasyon sonucu elde edilen MS valf çalışma programı 82
Tablo 3. 7. Seyrelt ve enjekte et metodu ile hazırlanmış, 10 µg/kg derişimindeki kinolon analizinde, farklı solventlerin geri kazanıma olan etkileri 83
Tablo 3. 8. Seyrelt ve enjekte et metodu ile hazırlanmış, 10 µg/kg derişimindeki kinolon analizinde, farklı solventlerin geri kazanıma olan etkileri 84

Tablo 3. 9. Quechers metodu ile hazırlanmış, 10 µg/kg derişimindeki kinolon analizinde, farklı d-SPE içeriklerinin geri kazanıma olan etkileri 87
Tablo 3. 10. LOD ve LOQ değerleri 91
Tablo 3. 11. Kalibrasyon grafikleri rakamsal verileri 92
Tablo 3. 12. Geri kazanım sonuçları (seyrelt ve enjekte et) 94
Tablo 3. 13. Geri kazanım sonuçları (QUECHERS). 95
Tablo 3. 14. Quechers yöntemi için tekrarlanabilirlik verileri 96
Tablo 3. 15. Seyrelt ve enjekte et yöntemi için tekrarlanabilirlik verileri 98
Tablo 3. 16. Seyrelt ve enjekte et yöntemi için tekrarüretilebilirlik verileri 100
Tablo 3. 17. QUECHERS yöntemi için tekrarüretilebilirlik verileri 102
Tablo 3. 18. Sistem tekrarlanabilirliği sonuçları 104
Tablo 3. 19. Sağlamlık (Ruggudness) çalışması verileri 105
Tablo 3. 20. Sağlamlık (Robustness) çalışması verileri 106

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Hayvansal orjine sahip gıda maddeleri, insan vücudunda sentezlenmeyen aminoasitleri barındırdıklarından besin öğesi olarak diyetimizde yer alması gereken protein kaynaklarıdır. Dünya genelinde nüfusun hızla artması ve buna bağlı olarak tüketime bağlı gıda üretim ihtiyacının da yükselmesi, tarım ve hayvancılıktaki başlıca üretim kaynaklarını en ekonomik şekilde kullanma ve hayvancılıkta en yüksek verimin elde edilme ihtiyacını, günümüzde geçerli olan üreticilik için kaçınılmaz bir süreç haline getirmiştir. Bunu mümkün kılabilmek adına da çok daha verimli soyların yetiştirilmesi, hastalıklara karşın koruma ve tedavi uygulamalarının yaygınlaştırılması gibi yetiştiricilik yöntemleri ile biyoteknolojik uygulamalar vazgeçilmez seçenekler olarak ön plana çıkmaktadır.

Enjeksiyon yolu ile ya da doğrudan yeme, suya ya da kovanlara katılarak uygulanan kimyasal preperatların kullanımları sonrasında, hayvanların doku ve iç organlarında birikebilen, metabolitler, serbest veya bağıl formdaki ilaç veya kimyasal madde miktarları, bu hayvanlardan elde edilen gıdalarda kalıntı olarak tespit edilebilmektedir (Hughes ve Heritage, 2004). Koruyucu veya tedavi edici amaçla antibiyotik uygulanmış hayvanlardan elde edilen ürünlerde, antibiyotik kalıntıları bulunabileceğinden; bu ürünleri tüketen bireylerde alerjiden anafilaktik şoka kadar değişken şiddetli zehirlenmelere, dirençli suşların oluşmasına, bağırsak bakteriyel florasının yapısal bozukluğuna, teratojenik ya da mutajenik hatta kanserojen etkiler gözlemlenebilmektedir. Sıklıkla kalıntı barındıran gıdalar ile beslenen bireylerde, antibiyotik direncinin belirlenmesi ve bu sebepten vücutta patojenlerin artması, kalıntıların insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden bir diğeridir. Tüm bu sebeplerden kaynaklı olarak Avrupa Birliği Komisyonu hayvansal besinlerdeki kalıntıları kontrol altına alabilmek ve bu bağlamda bilinçli bir toplum oluşturabilmek adına bir seri önlem almıştır. Avrupa Birliği Komisyonunun kararlaştırdığı, 96/22/EC, 96/23/EC ve 2005/925/EC mevzuatlarına göre bazı antibiyotik ve hormon ilaçların kullanımı kısıtlanmış hatta yasaklanmış ve maksimum kalıntı limitleri belirlenmiştir.

Tablo 1. 1. Yasaklı ilaç kalıntılarının hayvansal gıdalarda bulunma sebepleri

İzinli Maddeler	Yasaklı Maddeler
1. Genişletilmiş kullanım veya aşırı dozda onaylanmış ilaçların kullanımı 2. Tedaviden ziyade, aşırı doz uygulamasına neden olan Tedavi edilen hayvanlarda tanımlanmanın problemlerine yol açan zayıf tedavi kayıtları 3. Hatalı veteriner ilaçlarının belirli türler için kullanılması 4. Kontamine olmuş yemin, yem fabrikalarında yaşanan sorunlar nedeniyle hedef hayvanlar için geri çekme yemi olarak kullanılması. (2009/8/EC Komisyon Direktifi).	1. Hayvanın ağırlığını arttırmak ve hayvanlar tarafından kilo almak için ihtiyaç duyulan yem miktarını azaltmak için büyümeyi teşvik eden hormonların kullanılması (Debackere ve ark., 1989) 2. Özel enfeksiyonların kontrolünde çok etkili olabilen bazı yasaklanmış bileşiklerin kullanımı; Nitrofuranlar, Amfenikoller (O'Keeffe ve ark., 2004) 3. Çok ucuz ve kolayca temin edilebilen yasaklanmış bileşiklerin kullanılması.

Bal, tedavi edici özellikleri, tadı ve besin değerlerinin zenginliği ile tüketimi fazlası ile tercih edilen hayvansal gıdalardandır. Çevresel kirlilik, yanlış arıcılık uygulamaları, balda insan sağlığına zararlı kalıntılara sebep olabilmektedir. Yasalara göre arıcılık uygulamalarında, yetiştiricilerin antibiyotik gruplarını, arı sağlığını korumak veya sağaltım amacı ile kullanması yasaktır ve kullanılan bu ilaçların ya da metabolitlerinin bal ve diğer arı ürünlerinde bulunması, ürünün arzı için engel teşkil etmektedir. Arıcılık sektöründe birçok farklı türden antibiyotik grubu uygulaması söz konusu olmak ile beraber kullanılan antibiyotikler arasında kinolon grubu yaygın olarak ballarda kalıntılarına rastlanan bir alt gruptur. Kinolon grubunda yer alan enrofloksasin ve siprofloksasin bileşenlerinin, ballarda kalıntılarına sıklıkla rastlanması ve geliştirilen teşhis yöntemlerinin de genellikle bu iki bileşeni görüntülemeye ve miktarlandırmaya yönelik olması, yetiştiricilerin ürünlerini pazarlayabilmesi için farklı kinolon antibiyotiklerinin kullanımına yönelmesine sebep olabilmektedir. Bu durum antibiyotik gruplarının seçilmiş parametreleri yerine tüm üyelerinin analiz edilmesi gerekliliğini göstermektedir. Çalışmamızda geliştirilen metot ile 21 farklı kinolon grubu antibiyotiğin ballardaki kalıntı analizleri, mevzuatların kriterlerini karşılayacak şekilde, kolay, hızlı ve hassas olarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu çalışmada ayrıca 50 adet numunede kinolon grubu antibiyotiklerin kalıntısı araştırılarak, ballardaki gıda güvenliğini ve halk sağlığı açısından oluşturabilecekleri riskler değerlendirilmiştir.

1.1. Amaç

Çalışmamızın hedefi kinolon grubu antibiyotiklerin bal matriksinde kantitatif tespitine yönelik, güvenilir, sağlam, hassas ve efektif bir analitik yöntem geliştirilmesidir. UPLC-MS/MS tekniği kullanılarak geliştirilen metodun validasyon çalışmaları Avrupa Birliği Mevzuatlarına uygun şekilde yapılmasının ardından farklı orjinlere sahip bal numuneleri analiz edilmiştir. Kişiye bağlı hata ihtimalinin azalması, numune hazırlık süreçlerinin maliyet ve süre açısından tasarruflu hale getirilmesi, yanlış pozitif raporların engellenmesi ve konfirmasyon metodu gereksiniminin ortadan kalkması, katkı ve kalıntı analizleri için amaçlanmaktadır. Bu kapsamda LC-MS/MS sistemleri ile pratikleştirilmiş kalite kontrol yöntemlerinin endüstriye kazandırılması, konu ile ilgili laboratuvarların iş yükünün azaltılması ve güvenilir sonuçlar raporlanabilmesi hedeflenmektedir. Geliştirilecek olan yöntem ile UPLC-ESI-MS/MS sistemi kullanılarak klasik LC-MS/MS sistemlerinden çok daha hızlı, kısa süreli bir analiz yöntemi, yüksek tekrarlanabilirlik ve çok düşük LOQ değerlerinde gerçekleştirilecek olup, numune hazırlık süreçleri minimize edilmiştir. Sıklıkla karşılaşılan siprofloksasin ve enrofloksasine ilave olarak 19 farklı florokinolon türünün de görüntülenmesi yapılarak multifonksiyonel bir tarama metodu düşük limitlerde geliştirilmiştir. Yöntem, ileride farklı antibiyotik türevlerinin de eklenebileceği, kapsamın, numune cinsi veya analit sayısı bakımından arttırılabileceği temel bir metot kimliğinde geliştirilip, gelecekte geliştirilecek yöntemlerin etkinliğine katma değer sağlayacak nitelikte tasarlanmıştır.

Alternatif kromatografik metotlar ile çeşitli bal matrikslerdeki antibiyotik maddelerin kalıntı analizi hassas, kolay ve kısa sürede yapılabildiğinden günümüzde ilgi odağı haline gelmiştir. Çalışmamızda gerçekleştireceğimiz alternatif iki farklı pratik kromatografik antibiyotik kalıntı yönteminin de benzer etkiyi yapacağı düşünülmektedir. Kullanılan MS/MS tekniği ile, elde edilecek kromatografik dataya üçüncü bir boyut ekleyerek metodun özgüllüğü arttırılacak ve yüksek basınçlı sıvı kromatografik (HPLC) teknik yerine ultra yüksek basınçlı sistem MS teknolojisi ile kombinlenerek yaklaşık 7 dakikalık bir sürede 21 farklı kinolon antibiyotiği eş zamanlı olarak hassas şekilde görüntülenmiştir. Metodun optimizasyon ve validasyon çalışmaları Avrupa Birliği Komisyonu 2002/657/EC standardları gözetilerek

yapılacaktır. Bu çalışmada kinolon antibiyotiklerinin ballardaki kalıntı miktarları ile üretilen balların Avrupa Birliği tarafından karar kılınmış MRL (maksimum izin verilen kalıntı) miktarlarına uygunluğu tespit edilecektir.

1.2. Arı Hastalıkları

Arı hastalıkları bulaşıcı olmayan ve salgın olarak addedilen iki ana grup altında birçok tür içermektedir. Bunlardan salgın olan hastalık türleri için genellikle arı yetiştiricileri tarafından antimikrobiyal ajanlar kullanılarak tedavi edilmekte veya önlem alınmaktadır. Bulaşıcı türden olan hastalıklar virüs, bakteri veya mantar menşeili olarak gözlemlenebilmektedir. Bu hastalıklar arasında en sık karşılaşılan, bulaşıcı bakteriyel hastalık türleri, American foulbrood (Amerikan yavru çürüğü), European foulbrood (Avrupa yavru çürüğü), septicemia ve paratyphoid fever (paratifo) şeklinde belirtilebilir. Amerikan yavru çürüğü hastalığı bu türler içinde özellikle en yaygın olan, tahribatı ve salgın spektrumu geniş olan bir tür olup kuluçka dönemi hastalığı olarak nitelendirilir ve sporlu paenibacillus bakteri larvaları tarafından oluşan bir rahatsızlıktır. (Ashiralieva ve Genersch, 2006). Zamanında müdahale veya tedavi edilmediğinde bütün bir koloninin kaybına sebep olacak etki potansiyeline sahiptir (Williams, 2000).

Avrupa yavru çürüğü hastalığı ise Melissococcus plutonius kaynaklı olmak ile birlikte semptomları ve tedavi prosedürleri farklılık gösterebilmektedir. Bu tarz bakteriyel hastalıkların önlenmesi ve sağaltımı için antibiyotik ve diğer antimikrobiyal preperatlar kullanılmaktadır. Arı hastalıklarında en sık karşılaşılan parazit menşeili rahatsızlıklar ise Nosema apis, Varroa mites ve insekt Senotainia tricuspis larva parazitlerinin sebep olduğu rahatsızlıklardır. Varroa'ya karşı çeşitli pestisitler (neonikotinoidler, akarisitler) sıklıkla kullanılmakta olup, büyük mum güvesine (Galleria mellonella) karşı ise naftalin uygulanmaktadır.

1.3. Baldaki Kirlilik ve Kalıntı Kaynakları

Besinlerdeki organik kalıntılar antroponejik ya da doğal menşeili olabilmek ile beraber dört ana grupta incelenebilmektedir; Bunlar özetle pestisitler, doğal toksinler, dirençli çevresel kaynaklı kimyasallar ve veteriner uygulama ilaçlarıdır.

Antibiyotikler, tüm dünyada hayvanlar ve insanlar için sağaltım amaçlı kullanılan ilaç gruplarının en başında gelmektedir. Tetrasiklinler, florokinolonlar, makrolid ve sulfonamidler geniş kullanım alanları olması sebebi ile en sık kullanılan gruplar olarak arıcılıkta gözlemlenmektedir. Bu ilaçlar kullanılan hayvanların vücudunda orijinal hali ile ya da ilaçların metabolitleri şeklinde barınmakta ve bu halleri ile hayvansal gıdalara transfer olabilmekte ve de kalıntıya sebep olabilmektedir. (Thiele-Bruhn, 2003). Arı ürünlerindeki bir diğer kirletici olan polisiklik aromatik hidrokarbonlardır. (Albero ve ark., 2003, Dobrinas ve ark., 2008). Balın PAH' la kontaminasyonu ya doğrudan PAH grubu olan naftalinin kullanılmasıyla ya da orman yangınlarından, arı kovanlarına yakın olan sanayi kuruluşlarından, fabrika atıklarından ve arıcı bilgisizliğinden kaynaklanmaktadır. Bal arısı (Apis mellifera L.), biyolojik aktiviteleri nedeni ile, çevre kirliliğini izlemede kullanılmaktadır (Porrini ve ark., 2003) Arı ürünleri ve özellikle bal ise pestisit, ağır metal ve diğer çevresel kirlilikleri belirlemede biyolojik bir belirteç olarak kullanılabilmektedir (Rissato ve ark., 2007). Arı kolonileri ihtiyaç duydukları su, polen nektar ve reçine maddelerini doğadan toplarlar ve çevresel kirlilik etkenlerinden doğrudan etkilenirler (Dobrinas ve ark., 2008).

Arıcılıkta kovanların ve peteklerin korunması için kullanılan naftalin ve varroa engelleme amaçlı kullanılan pestisitler balmumunda ve balda birikebilmektedir, balın tüketilmesi ile ise kişiye transfer olabilmektedir. Pestisitler ve naftalin bala yavaş bir ivmelenme ile karıştığından kullanılmış petekler kovan içinde pestisit ve naftalin kaynağı yaratmaktadır (Wallner, 1999). Bu hususta bal ve balmumunda yapılan analizlerde pestisit ve ilaç kalıntılarına rastlanması normal karşılanmaktadır (Moosbechofer ve ark., 1995). Kalıntı, dolaylı olarak tarım alanlarındaki bitkilere tatbik edilen pestisitlerin çeşitli faktörler dolayısı ile (rüzgâr, yağmur vs.) çevreye dağılması sonucu bitkilere nüfuz etmesi ve buradan da bal arıları tarafından kovana taşınması ile olmaktadır. (Bogdanov ve ark., 2003, Celli ve Maccagnani 2003).

Tablo 1. 2. Antibiyotiklerin başlıca kullanım alanları

Antibiyotik Grubu	Antibiyotik Adı	Başlıca Kullanım Alanı	Antibiyotik Grubu	Antibiyotik Adı	Başlıca Kullanım Alanı
Aminoglikozitler	Apramycin	Sadece Domuzlarda	**Florokinolonlar**	Siprofloksasin	Tüm Hayvanlarda
	Gentamycin	Tüm Hayvan ve İnsanlarda		Enrofloksasin	Tüm Hayvanlarda
	Kanamycin	Çiftlik Hayvanlarında		Marbofloksasin	Tüm Hayvanlarda
	Neomycin	Tüm Hayvanlarda		Flumekuin	İnsanlarda
	Sisomycin	İnsanlarda		Ofloxacin	Tüm Hayvanlarda
	Spectinomycin	Çiftlik Hayvanlarında			
	Streptomycin	Tüm Hayvanlarda	**Linkozamidler**	Clindamycin	Tüm Hayvanlarda
				Lincomycin	Tüm Hayvanlarda
β-laktamlar	Amoxicillin	Tüm Hayvanlarda	**Makrolitler**	Azithromycin	İnsanlarda
	Ampicillin	Tüm Hayvanlarda		Clarithromycin	İnsanlarda
	Azlocillin	İnsanlarda		Erythromycin	Tüm Hayvan ve İnsanlarda
	Benzylpenicillins	Tüm Hayvanlarda		Roxithromycin	İnsanlarda
	Cloxacillin	Çiftlik Hayvanlarında		Spiramycin	Tüm Hayvanlarda
	Dicloxacillin	Çiftlik Hayvanlarında		Tylosin	Tüm Hayvanlarda
	Flucloxacillin	İnsanlarda		Vancomycin	İnsanlarda
	Methicillin	İnsanlarda			
	Mezlocillin	İnsanlarda	**Sulfonamidler**	Sulfanilamide	Tüm Hayvanlarda
	Nafcillin	İnsanlarda		Sulfadimethoxine	Çiftlik Hayvanlarında
	Oxacillin	Çiftlik Hayvanlarında		Sulfadimidine	Tüm Hayvanlarda
	Piperacillin	İnsanlarda		Sulfamethoxazole	Tüm Hayvanlarda
	Phenoxymethylcillin	İnsanlarda		Sulfapyridine	Tüm Hayvanlarda
	Penicillin G	İnsanlarda		Sulfathiazole	Tüm Hayvanlarda
Sefalosporinler	Cefalexin	Köpeklerde	**Trimethoprim**		Tüm Hayvanlarda
	Cefalotin	İnsanlarda	**Tetrasiklinler**	Chlortetracycline	Tüm Hayvanlarda
	Cefazolin	İnsanlarda		Doxycycline	İnsanlarda, Kedi ve Köpeklerde
	Ceftiofur	Çiftlik Hayvanlarında		Oxytetracycline	Tüm Hayvan ve İnsanlarda
	Cefotaxim	İnsanlarda		Tetracycline	Tüm Hayvan ve İnsanlarda
	Cefotiam	İnsanlarda			

(Kemper, 2008)

1.4. Ballarda Antibiyotik Kalıntısının Nedenleri

Arının doğadaki aktivitesi hava, su, toprak, bitki örtüsü gibi farklı birçok çevresel etmenin varlığına ve kalitesine bağlı şekilde değişmektedir (Pohl, 2009). Fakat çevresel etkenlerin dışında arının aktivitesi ve sağlığını etkileyen ve bütün hayvansal orjinli gıdalarda görüldüğü gibi bal, propolis gibi arı ürünlerinde de kalıntı olarak negatif etkisini gösteren en büyük etken yanlış ya da bilinçsiz arıcılık uygulamalarıdır (Bogdanov, 2006). Dünyada arıcılar, günümüzde Amerikan ve Avrupa yavru çürüğü rahatsızlıklarını sentetik antimikrobiyal kemoterapi preparatları kullanarak, varroasis için ise sentetik akarisit türevi pestisit ilaçları kullanarak tedavi yöntemleri aramaktadır (Kleespies, 2000).

Ballardaki kemoteröpatik antimikrobiyal kalıntıların varlığı, salgın haline dönüşebilen bacteria Paenibacillus larvae subsp. larvae ve Melissococcus platoon orjinli oluşan amerikan ve avrupa yavruçürüğü hastalıklarının önlenmesi için kullanılan preparatların miktarları ile doğru orantı göstermektedir. Arıcılıkta bu amaçla en sık kullanılan antibiyotik grupları, kinolonlar, aminoglikozitler, sulfonamidler, makrolidler ve tetrasiklinlerdir. Nadiren de olsa diğer antibiyotik grupların varlığına kalıntı olarak arı ürünlerinde rastlanabilmektedir (amfenikoller, nitroimidazoller, nitrofuranlar, penisilinler vb.). Kullanılan antibiyotikler hastalığın tümden çözümü için bir seferlik uygulamada yetersiz kalabilmektedir. Bu sebepten preparatların aplikasyonu belirli bir zaman rutininde tekrarlanmaktadır ve arı ürünlerinde kalıntı varlıkları bu sebepten teşhis edilebilmektedir (Ritter, 2000). Arıcılıkta ilaç tedavisi sadece görünür ve yüzeysel bir uygulama olarak düşünülebilir, çünkü bakterinin tekrar üreyebilmesi ve tamamen varlığını kaybetmesi söz konusu değildir. Bakteriler çok dirençli sporlar yetiştirir ve antimikrobiyal ajanlar ile yok edilmezler ve tekrar enfeksiyona neden olurlar. Bu nedenle, arı ürünlerinde kalıntı kalma tehlikesi yüksek ihtimallidir. Ballarda antibiyotik kalıntı analizleri doksanlı yılların başlarına kadar yapılmıyordu, ancak 1997 senesinde arı hastalıklarının tedavisinde kullanılmış olan streptomisinin balda kalıntısının görülmesini müteakip, analizlerin yapılması gündeme geldi ve o tarihten itibaren komplike analizler yapılmaya başlandı. Bu sebepten, arıcılıkta ilaç kullanımı gerek tüketicilerin gerekse gıda kalite kontrolü yapan laboratuvarların üzerinde daha fazla durmaya başladıkları bir konu haline gelmiştir (Sunay, 2006). Yanlış arıcılık

uygulamaları, yani yanlış ilaç kullanımı, dozaj ayarlamasının yanlış yapılması, geri çekme sürelerine uyulmaması gibi uygulamaları başlıca arı ürünü olan balda antibiyotik kalıntılarına sebebiyet vermektedir. Bu antibiyotik molekülleri balda direk olarak tespit edilebileceği gibi konjüge molekülleri veya metabolitleri şeklinde de tespit edilebilmektedir. Mevzuatlara göre arıcılıkta kullanılan ilaçlar tamamı ile yasaklanmış ya da belirli kullanım sınırları olabilmektedir. Nitoimidazoller, nitrofuranlar, amfenikoller bazı yasaklanmış ilaçlara örnek olarak verilebilmektedir. Kinolonlar, sülfonamidler, makrolidler, tetrasiklinler gibi bazı antibiyotik grupları ise sınırlı kullanıma tabi olan antibiyotik gruplarındandır.

Tablo 1. 3. Veteriner ilaçların sınıflandırılması

Grup A Yasaklı Maddeler	**Grup B** Veteriner İlaçlar ve Kontaminantlar		
A1 Stilbenler	**B1** Antimikrobiyeller	**B2a** Antelmintikler	**B3a** Organoklorinler
A2 Tyrostatlar		**B2b** Koksidioastatlar	**B3b** Organofosfatlar
A3 Steroidler		**B2c** Karbamatlar/ Piretireoidler	**B3c** Ağır Metaller
A4 Zeranoller		**B2d** Sedatifler	**B3d** Mikotoksinler
A5 Beta-Agonistler		**B2e** Non Steroid Anti-Enflamatuvar İlaçlar	**B3e** Boyalar
A6 (Nitroimidazoller Fenikoller)			
Yasaklı Maddeler 37/2010/EC Regülasyonlarının Tablo 2 kısmında detaylı belirtilmiştir		**B2f** Diğerleri e.g. Kortikoidler vb..	

Gıdalardaki antibakteriyel kalıntıların varlığının en büyük yan etkisi dirençli bakteri soylarının gelişmesidir. Bu tür bir dayanıklılık, patojenik olan ve olmayan diğer bakterilere transfer edilebilir ve antibakteriyel dirençli mikroorganizmaların oluşmasına neden olabilmektedir (Tenover, 2006). Ayrıca, alerjik reaksiyonlar sebebi ile bazı ilaçlara özellikle dikkat edilmelidir (Van den Bogaard ve Stobberingh, 1999). Bilinen türler arasında Escherichia coli multi direnç gösteren, dirençli bir patojen cinsi olmak ile birlikte campylobacter jejuni türü florokinolon gruplarına karşı özellikle direnç gösterebilmektedir. Antibiyotik direnci dışında hayvansal gıdalardaki kalıntılardan kaynaklı alerjik reaksiyonlarda insanlarda teşhis edilebilmektedir.

1.5. Balın Bileşimi ve Genel Özellikleri

Türk Gıda Kodeksi tanımına göre bal, bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının, salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal bir ürün olarak tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi, Bal Tebliği, 2012/58). Balın bileşimi bulunduğu floraya, çevre koşullarına, koloninin durumuna ve iklim şartlarına göre değişiklik göstermektedir (Anklam, 1998 ve White, 1979). Balın içeriği farklılık göstermek ile birlikte tipik bir bal ortalama %76 şeker, %20 su, %0,18 kül içermekte ve yapısında, proteinler, polifenoller, α-tokoferol, flavonoidler, askorbik asit ve diğer fenolikler, glukoz oksidaz, amilaz, peroksidaz ve katalaz gibi enzimler ihtiva etmektedir. Glikozun fruktoza oranı balın orjinine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (çam, çiçek, narenciye vb.) (White, 1978, 1980). Balda eser düzeyde bulunan diğer bileşenler ise polenler, pigmentler, proteinler, aminoasitler, alifatik asit tuzları, lipitler, vitaminler, enzimler, minerallerdir.

Bal %1 oranında aminoasit ihtiva eder ve bunun %50-80'ini prolin oluşturur (Anklam, 1998). Çiçek ve salgı ballarındaki prolin miktarı sırasıyla 15,87- 96,3 mg/100 g ve 17,14 – 67,46 mg/100 g aralığında gözlemlenmiştir (Sorkun ve ark., 2002). Balda bulunan enzimler ise invertaz, glikoz oksidaz ve diastaz (α-amilaz ile beta-amilaz karışımı) olmak ile birlikte, invertaz enziminin, nektarın bala dönüşümü sırasında meydana gelen kimyasal farklılaşmalardan sorumlu olduğu belirtilmektedir. Bal asidik yapıda ve ortalama pH değeri 3,20–4,50 arasındadır. Bu asidite, nektarların gelişmesi esnasında enzim aktivitesi ile meydana gelen gliktonlakton/glikonik asit içeriğinden oluşmaktadır (White, 1975). Balda yüksek düzeylerde serbest asitlik oluşumu, fermentasyonun varlığının kanıtıdır. Fakat, normal şartlar altında asitlik, organik asitler ile laktonlar arasındaki dengeden ya da esterler, fosfat ve sülfat gibi bazı anorganik tuzların varlığından kaynaklanmaktadır (Downey ve ark., 2005). Balın fiziksel değerlendirme parametreleri ise, viskozitesi, higoskopik yapısı, iletkenlik derecesi, kristalizasyon mertebesi, renk aralığı gibi parametreler olup, bu özellikler karbonhidrat miktar ve profilleri ile yakından ilişkilidir. Bal sindirimi kolay, besleyici ve birçok hastalık için koruyucu ve iyileştirici özelliği sebebi ile fonksiyoneldir (Özmen ve Aklın,

2006). Balın antioksidan ve prebiyotik etkisinin dışında terapatik yapısı, sindirim sistemi bozuklukları, kardiyovasküler rahatsızlıklar, safra ve idrar yolu enfeksiyonları, sinir sistemi, solunum sistemi üzerine geniş spektrumlu olumlu bir etkiye sahiptir.

1.6. Antibiyotik Kalıntılarına İlişkin Yasal Düzenlemeler

Tüketicinin sağlığının gözetilmesi ve aynı zamanda oluşabilecek ekonomik zararın önüne geçilmesi için, tüketime sunulan tüm gıda maddelerindeki ilaç kalıntılarının sıkı bir denetim altında tutulması gerekmektedir. Bu kapsamda, başta Dünya sağlık örgütü olmak üzere, FAO, FDA ve konu ile ilgili olan Avrupa Birliği komisyonları tarafından birtakım prosedürler, birbiri ile uyum içerisinde düzenlenmekte ve uygulanmaktadır. Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı gibi konu ile alakalı kamu kuruluşları, mevzuatların güncelliğini ve denetimini sağlamaktadır. Kalıntı olarak izin verilen maksimum kalıntı miktarları, gıdalarda Türk Gıda Kodeksi kapsamında, AB mevzuatları ile uyum halinde 247739 sayılı Resmî Gazete'de 28.04.2002 tarihinde yer alan tebliğ ile düzenlenmektedir. Ülkesel kalıntı izleme programları ise, "Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik" ile 25705 sayılı Resmî Gazete'de, 19.01.2005 tarihinde yayınlanmıştır. Hayvansal gıda maddelerinde veya canlı hayvanlarda bulunan veya bulunabilecek veteriner uygulama sonucu oluşan kalıntıların izlenmesi adına alınacak bir dizi önlemlere ilişkin yönetmelik ise, 2011 yılında 28145 sayılı Resmî Gazete'de, Türk Gıda Kodeksi, kapsamında yayınlanıp, uygulamaya geçirilmiştir. Tarım Gıda ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hayvan ya da gıda türüne göre araştırılacak ve kantite edilecek örnek miktarları, 96/23/EC sayılı AB direktifi ile uyum içerisinde hazırlanmıştır ve bu kapsamda İzmir ve Ankara İl Kontrol Laboratuarları, Araştırma enstitüleri ile Bornova Veteriner Kontrol Laboratuvarı, Pendik Veterinerlik Kontrol ve Etlik kontrol laboratuvarları, kalıntı izlemede yetkin olarak belirlenmiştir.

Türk Gıda Kodeksi ile Codex Alimenterius ile Avrupa Birliği Komisyonu kriterlerine göre balda herhangi bir katkı maddesinin kabul edilmeyeceği vurgulanmaktadır (Codex STAN, 2001; European Commission, 2002). EC 470/2009 regülasyonları hayvansal gıdalardaki ilaç kalıntı miktarları ile alakalı kalıntı limitleri belirlemektedir. Avrupa Birliği toplulukları mevzuatına göre farmokolojik aktivite gösteren tüm veteriner ilaçlar

ve bunların metabolitleri, belirli limitler düzeyinde, insan sağlığına zarar vermeyecek biçimde sınırlandırılmış olup denetlenmektedirler. Ballarda kalıntı halinde barınmasına izin verilebilen preperat ve kimyasal bileşenlerin kabul sınırları Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliğinde belirtilmiştir. Bu bağlamda ballarda pestisit türevi madde kalıntısı toplamda 0,01 ppm'i geçmemelidir (Beyoğlu, 2006). Ülkemizde, pestisit kalıntı maksimum limitleri ayrı ayrı olacak şekilde gıda kodeksinde yoktur. Avrupa Birliği mevzuatı 3 tür akarisit (amitraz, coumaphos ve cyamizole) için sırasıyla 0,2 ppm, 0,1 ppm ve 1 ppm değerlerini vermiş olup, ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) amitraz (1 ppm), coumaphos (0,1 ppm) ve fluvalinat (0,05 ppm) için MRL değerlerini belirlemiştir (Johnson, 2010). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebligi, Avrupa Birliği Komisyonunun ilgili direktifini (2377/90 EEC) ülkemize uyarlamıştır (Sunay, 2006, Yavuz, 2007, Yeter, 2007). Avrupa Birliği tarafından onaylanmış birtakım anti-varroa preparat haricindeki hiçbir ilacın arı yetiştiriciliğinde kullanımına izin verilmemektedir ve sıkı şekilde denetlenmektedir. Dolayısıyla Avrupa Birliği lisanslı olan bu ilaçların haricindeki herhangi bir preperat için belirlenmiş bir kalıntı limiti bulunmamaktadır. Eğer bir ilacın belirlenmiş limiti mevcut değil ise bu durumda bu ilacın kalıntısının balda bulunmaması gerekir. Buda ballarda ilaç kalıntıları için sıfır tolerans uygulandığı anlamına gelmektedir. 2003/181/EC mevzuatına göre (2002/657/EC revizyon) MRL değeri belirtilmemiş kalıntılar için laboratuvar metotlarının, görülebilen en düşük limitlere kadar inilmesi gerektiği bildirilmiştir. Bu bağlamda, ballarda kinolon grubu antibiyotik kalıntıları için herhangi bir MRL limiti ülkemizdeki veya dünyadaki mevzuatlarda bulunmamakta olup, ballarda kinolon kalıntılarının görüntülemesini yapacak metotların olabildiğince düşük limitlerde, hassas ölçümler yapması gerekmektedir.

1.7. Kalıntı Yöntemlerinin Analitik Performansı ve Sonuçlarının Yorumlanması İle İlgili Esaslar

Mevzuatlara göre belirtilen düşük limitlerde çalışma yapmak için yüksek hassasiyette ve belirli kriterlere uygun analitik yöntemler geliştirmemiz ve uygulamamız gerekmektedir. Tarama ve doğrulayıcı amaçlar için kullanılan analitik yöntemlerin performansı ve geçerliliği için şartlar 2002/657 / EC Avrupa Kararında belirlenmiştir. (Commission Decision 2002/657/EC, 2002 ve Commission Regulation (EU) 37/2010, 2010). Validasyon, analitik metodun ilgili performans özellikleri için geçerli olan

kriterlere uygunluğunu gösterecektir. 96/23/EC Avrupa Birliği komisyon kararına göre antibiyotik kalıntılarının hayvansal gıdalarda tespitine yönelik metotların belirlenmiş performans kriterleri olmalıdır ve bu çerçevede laboratuvarlar standardize edilmelidir. Analitik yöntemlerin ve sonuçların yorumlanmasında kullanılacak bu rehber doküman 2002/657 / EC Komisyon Kararının bir parçası olup bu dökümana atıf yapılmaktadır. Teknik yönergeler ve gerekli performans kriterleri, 2002/657 / EC Komisyon Kararında detaylandırılmıştır olup, nicel yöntemlerin validasyonu için yapılacak spesifik çalışmalar şunlardır;

Özgüllük: Bir yöntem, deney koşulları altında analit ve diğer maddeler arasında ayrım yapabilmelidir. Tarif edilen ölçüm tekniği kullanıldığında, analitler ile öngörülebilir herhangi bir matriks girişiminin üstesinden gelmek için stratejiler kullanılmalıdır. Bu stratejiler homolog maddeler, analog maddeler ve iç standartların kullanılmasını içerir.

Doğrulama Noktası: Kütle Spektrometresi yöntemlerinde maddenin tayini için birden fazla iyon tanımlanmalıdır. Minimum iki farklı iyon ile, tanımlaması yapılan antibiyotik bileşeni konfirme de edilmelidir.

Teşhis Noktası: Çalışmada bir ana iyon için iki farklı parçalanma ürünü seçilmelidir. Kullanılan kütle spektrometresi, 2002/657/EC mevzuatına göre düşük çözünürlüklü kütle spektrometresi sınıfında yer aldığından bu sayının ikiden fazla olması uygun olmaktadır.

İyon Oranı: En güçlü sinyale sahip iyonun yoğunluğunun bir yüzdesi olarak ifade edilen tespit edilen iyonların göreceli yoğunluklarıdır.

Relatif Alıkonma Süresi: Analitin, kromatografik tutunma süresinin dahili standardınki ile, yani analitin görece tutunma süresine oranını ifade etmektedir. GC için ±%0,5 ve LC için ±%2,5 tolerans verilmektedir.

Kalibrasyon Grafikleri: Hesaplatma için kalibrasyon grafikleri kullanılacağı zaman minimum 5 noktalı bir grafik olmalı ve sıfır dahil olmak üzere minimum 4 farklı derişimde numune hazırlanmalıdır. Regasyon katsayısı ve doğrusallık denklemleri rapor edilmelidir.

Geri Kazanım: Numunedeki analitin spesifik geri kazanım faktörü uygulanmadığı sürece, numunedeki bir analitin niceliksel tespiti için standart ilave prosedürü veya bir iç standart kullanılmalıdır. % Geri kazanım = 100 × ölçülen içerik / tayin düzeyi.

Gerçeklik: Sertifikalı Referans malzeme ile yapılması gereken bu çalışma eğer bu tarz bir numune tedarik edilemiyor ise kör numuneye bilinen miktarda eklenen analitin üzerinden yapılacak geri kazanım çalışması ile gerçeklik çalışması sağlanabilir.

Kesinlik: Bir referansın veya spike edilmiş materyalin tekrarlanabilir koşullar altında tekrarlanan analizi için laboratuvarlar arası değişim katsayısı (CV), Horwitz Denklemi tarafından hesaplanan seviyeyi aşmamalıdır. % RSD olarak hesaplanan varyans ise ±%20' yi geçmemelidir.

Analitik Limitler (Hassasiyet): Tayin sınırı, CCα ve dedeksiyon limiti, CCβ yerine bu mevzuatta, performans özelliklerinin limitlerinin belirlenmesi için tespit sınırı (LOD) ve miktar sınırlamasının sınırı (LOQ) tanımları ve hesaplatmaları kullanılmıştır.

Çalışmamızda, 2002/657 / EC sayılı Avrupa Komisyonu kararına uygun olarak, bal matriksini kullanarak yöntemlerin geçerlilik çalışmalarını gerçekleştirdik.

Tablo 1. 4. 2002/657/EC regülasyonları metot gereksinimleri

		Teşhis limiti CCß	Karar Limiti CCα	Gerçeklik	Kesinlik	Seçicilik	Sağlamlık
Kalitatif Metotlar	*S	+	-	-	-	+	+
	**C	+	+	-	-	+	+
Kantitatif Metotlar	*S	+	-	-	+	+	+
	**C	+	+	+	+	+	+

*S = Tarama Metotları; **C = Konfirmasyon Metotları; + = Validasyon parametresi zorunlu uygulanmalı.

1.8. Antibiyotik

Antibiyotikler, mantar veya bakteri gibi mikroorganizmalarca oluşan ya da sentez ile oluşturulan, eser düzeydeki konsantrasyonlarda dahi bakterilerin gelişimini yavaşlatan ya da bakteriyi tümden yok eden preperatlardır. Tarihte ilk olarak bulunan ve uygulanan

antibiyotik türü ise penisilin antibiyotikleridir (Akkan ve ark., 2003). Veteriner ilaçları gibi farmakolojik aktivite gösteren maddeler, hayvancılıkla uğraşanlar ve veterinerler için oldukça kritik ihtiyaçlardandır. Bu ilaçlardan en bilinen ve sık kullanılan grup antibiyotiklerdir. Bakterilere olan etki mekanizmalarına göre antibiyotikler, bakteriyostatikler ve bakterisidler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Antibiyotiklerin, bakterilerde hücre duvarı sentezinin engellenmesi, sitoplazma zarının geçirgenliğinin değiştirilmesi, nükleik asit sentezinin önlenmesi veya ara metabolizma aktivitelerinin bozulması gibi etkileri mevcuttur (Kaya ve ark., 2000).

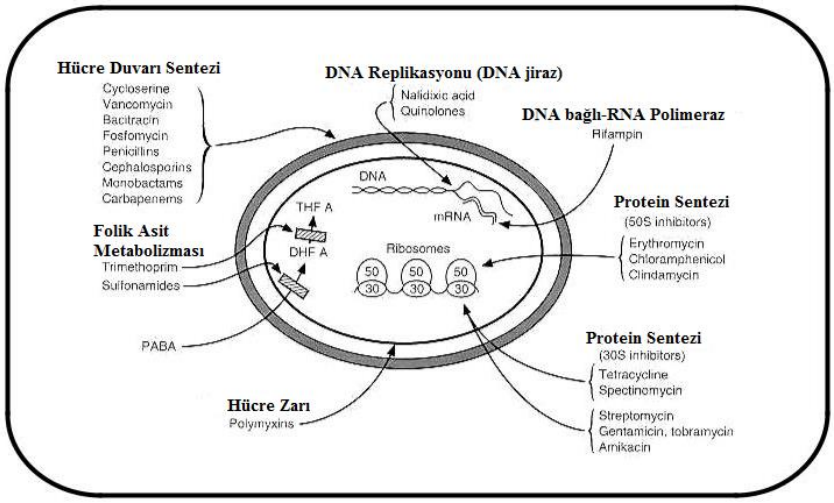
1.8.1. Antibakteriyeller

Antibakteriyel ilaçlar, etkisel mekanizmalarına, kimyasal yapılarına, aktivite spektrumlarına veya orjinlerine göre alt gruplara kategorize edilebilmektedirler. Sınıflandırma genellikle, kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerle ilgili bilgi verdiğinden ötürü, kimyasal yapılarına göre planlanmaktadır. Sınıflar başlıca şu şekildedir: aminoglikozitler, amfenikoller, β-laktamlar (sefalosporinler ve penisilinler), linkosamidler, makrolitler, nitrofuranlar, nitroimidazoller, kinolonlar, sülfonamitler, tetrasiklinler ve diğer muhtelif preperatlar.

1.9. Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Antibakteriyel ilaçların düşük konsantrasyonlardaki kullanımı bile mikroorganizmaların büyümesini önleyebilmektedir (Botsoglou ve Fletouris 2001). Veterinerlikte, hastalıkların kontrolü ve tedavisi amaçlı uygulanan antimikrobiyal ilaçlar, insanlar için tercih edilen preperatlar ile benzer olabilmektedir (Prescott, 2008). Hayvan sağlığını korumak adına 1940 yılından beri antibiyotikler sürekli tercih edilmektedir (Jones ve Ricke, 2003). 1950'lerin başında antibiyotiklerin ilk, hayvan yemlerinde uygulanmış olup, yeni bir dönem hayvan yetiştiriciliği açışından başlamıştır. Fakat profilaktik ya da büyümeyi arttırıcı şekilde uygulanan antibakteriyel ilaçların birçoğu, hayvanlarda ve insanlarda patojen bakteri cinsleri arasında meydana gelen dirençli suşların sayısının artması sebebi ile kullanımı bitirilmek zorunda kalmıştır. Kanatlı hayvanlarda ve arıcılıkta çoğunlukla, iyileştirici ve de verimin arttırılması amaçlanarak kloramfenikol, eritromisin, kinolonlar, oleandomisin, sülfonamitler, tetrasiklinler, linkozamidler, aminoglikozitler gibi antibakteriyel ilaçlardan istifade edilmektedir (Anonim, 2009).

Tüm bakterilerde hızlı ve yavaş büyüme ve de dinlenme safhalarından meydana gelen üç çoğalma safhası bulunmaktadır. Antibakteriyeller, bakterilerin yavaş veya hızlı gelişme safhalarında etkinlik göstermektedirler. Bu aktivite bakterilerin ya tümden yok edilmesi (bakterisid) ya da bakterilerin büyümesinin durdurulması (bakteriostatik) biçiminde etkili olmaktadır (Başoğlu, A., 2000). Hücre duvarının sentezinin engellenmesi, nükleik asit sentezinin durdurulması, sitoplazma zarının geçirgenliğinin yapısal bozulması, protein sentezi sürecinin bozulması, kullanılan antibiyotiklerin en bilinen etkinlik türleridir. (Dökmeci ve ark., 1992).



Şekil 1. 1. Antibiyotik gruplarının etki mekanizmaları

1.10. Antibiyotiklerin Sınıflandırmaları

Antibiyotikleri ve kemoterapötikleri farklı kriterlere göre gruplandırılabilmek olasıdır. Fakat günümüzde sıklıkla kullanılan gruplandırma, antibakteriyellerin aktivite ve etki güçlerine ve de çalışma mekanizmalarına göre olandır.

Tablo 1. 5. Antibiyotiklerin, antibakteriyel etki spektrumuna göre gruplandırılması

Gam Pozitif	Gam Negatif	Genis Etki Spektrum Aktiviteli	Mycoplasma Etkili
Linkomisin Eritromisin Basitrasin Penisilin Tylosin Florokinolonlar	Polimiksin B Kolistin Flumekuin Baytril	Ampisilin Streptomisin Kloramfenikol Tetrasiklinler Spektinomisin Sulfonamidler Nitrofuranlar	Eritromisin Tiamulin Baytril Tylosin Linkomisin Tetrasiklinler

(Şanlı, 1981)

1.11. Antibiyotiklerin Etkilerine Göre Sınıflandırılması

1.11.1. Bakteriyostatikler

Bakteri üremesini durduran ve konakçının normal savunma mekanizmalarının enfeksiyonla savaşmasına izin veren antibiyotikler bakteriostatiktir. Bakteriostatik ağırlıklı antibiyotikler arasında tetrasiklinler, makrolitler, kloramfenikol ve trimetoprim yer alır. Bu gruptaki preperatlar, bakteri hücrelerinin gelişimini ya da üremesini engellerler. Üremesi veya gelişimi duran tüm türler, devamında vücudun bağışıklık sistemi tarafından rahatlıkla ortadan kaldırılırlar. Bakteriyostatik aktivite etki derecesi Minimum İnhibitör Konsantrasyon olarak adlandırılmaktadır (MİK).

1.11.2. Bakterisidler

Bakteriyel hücre ölümüne sebep olan antibiyotik türlerine bakterisidal denmektedir. Bu gruptaki ilaçlar, bakteriyi direk olarak, dolaysız şekilde ortadan kaldırırlar. Bakterisid aktivite etkisinin göstergesi, Minimum Bakterisid Konsantrasyonu şeklinde adlandırılmaktadır (MBK).

Tablo 1. 6. Bakteriyostatik ve bakterisid etkili antibakteriyeller

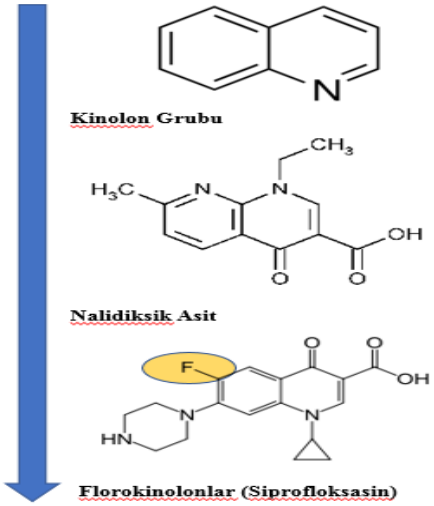
BAKTERİYOSTATİKLER	BAKTERİSİDLER
Tetrasiklinler	Karbanapem
Makrolitler	Florokinolonlar
Sülfonamidler	Vankomisin
Amfenikoller	Monobaktam
Linkozamidler	Polipeptidler
Metronidazol	Rifamisin
Mikonazol	Penisilin, Sefalosporin
	Beta-laktamaz inhibitörler
	Teikoplanin

(Akalın, 1994)

1.12. Kinolonlar

Kinolonlar, su ürünleri yetiştiriciliğinde, arıcılıkta ve kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu sentetik antibiyotiklerdir (3-kinolenkarboksilik asitten türetilmiştir). Bakteriyel DNA'nın çözülmesine ve kopyalanmasına engel olurlar. Birinci nesil kinolonlar esasen oksolinik asit ve

nalidiksik asitten ibaret olup yalnızca gram-negatif bakterilere karşı etkilidir; ikinci nesil kinolonlar ise enrofloksasin, danofloksasin ve siprofloksasin gibi fluorokinolonlardır. Florokinolonlar sırasıyla gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı aktiviteyi arttıran C-3 pozisyonunda bir florin atomu ve C-7 pozisyonunda bir piperazinil grubu içerir ve klinik kullanımdaki kinolonların çoğu bu alt sınıfa aittir (Brighty ve Gootz, 2000).



Şekil 1. 2. Florokinolonların genel molekül yapısı

Veteriner hekimliğinde inek, domuz, hindi veya tavukta pulmoner enfeksiyonlar, idrar yolu enfeksiyonları ve sindirim enfeksiyonlarının tedavisinde, arıcılıkta ise avrupa yavru çürüğü hastalığının tedavisinde kullanılırlar (McGlinchey ve ark., 2008, Hoof ve ark., 2005). Kinolonların gıda üreten hayvanlardaki yaygın kullanımı, bu antibiyotiklere karşı bakteri direncinin geliştiğine dair son kanıtlara bağlı olarak yüksek endişe kaynağıdır. Genel yapı, aromatik veya heteroaromatik bir halka ile kombine edilmiş bir 1-substitue-1,4-dihidro-4-oksopiridin-3-karboksilik fonksiyonel gruplarını kapsayan kinolonlardan oluşur. 3 konumundaki karboksilik asit ve 4 konumundaki keton grubu DNA jiraz inhibisyonu için gereklidir. 1 ve 7 konumlarındaki substientler ilaçların etkinlik ve biyolojik spektrumunu etkiler (Riviere ve ark., 2009). Karboksilik asit (pka 5) gruplarının (pka 8-9) varlığı nedeniyle, kinolonların amfoterik ve zvitteriyonik özellikleri vardır; pH 6 ile 8 arasında zayıf su çözünürlüğü sergilerler, ancak lipid çözünürlükleri vardır ve dokulara nüfuz edebilirler (Gentili ve ark., 2005). Orta derecede polar yapılarından dolayı, kinolonlar konjugasyon yaratmak için proteinlere

bağlanabilir ve bu durum biyolojik matrikslerden ekstraksiyonu zorlaştırır. Kolaylıkla metal iyonlarıyla şelat yapıları oluşturabilirler ve ekstraksiyon verimleri düşük olabilmektdir. Kinolonlar, bakteriyel topoizomeraz II (DNA jiraz) ve topoizomeraz IV'ü inhibe ederek bakteri DNA sentezini bloke eder. DNA jirazının engellenmesi, normal transkripsiyon ve kopyalama için gerekli pozitif süper sargılı DNA'nın çözülmesini engeller (Madurga ve Sánchez-Céspedes, 2008).

Kimyasal yapılarında flor bulundurduklarından florokinolonlar olarak adlandırılmaktadırlar ve sentetik olarak üretilebilmektedirler. Marbofloksasin, enrofloksasin, sarafloksasinler, oksolinik asit, difloksasin ve flumekuin florokinolonların en bilinen ve kullanımı yaygın olan türleridir (Anonim, 2009). Pseudomonas aeruginosa, Stafilokok ve Enterobacteriaceae cinsleri üstünde oldukça yüksek aktiviteye sahiptirler. Kinolonların insan ve hayvan vücudundaki yarılanma süreleri 14 saate kadar çıkabilmektedir. Deri, kulak ve göz hastalıklarının iyileştirilmesinde uygulanan bu preperatlar, çocuklarda sıklıkla karşılaşılabilen tendon hasarı ve artiküler kıkırdak rahatsızlıklarında aktif rol alabilmektedirler. Nörolojik ve Miyalji rahatsızlıklar ise yine florokinolon antibiyotik kalıntılarının gıdalar ve çevresel etmenler dolayısı ile kişilere verdiği diğer rahatsızlıklardır (Kiangkitiwan ve ark., 2008). Orbifloksasin, danoflaksasin ve enrofloksasin kullanılan hayvanlardan elde edilen gıdaların tüketimi sonucu kişilerde, bakteriyel dirençlerin tespit edilmiş olması, bu gruplarının kullanımı durdurmuştur (Anonim, 2006).

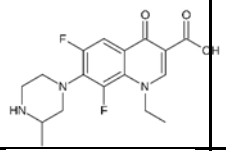
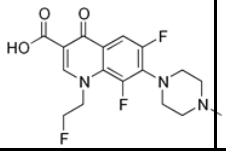
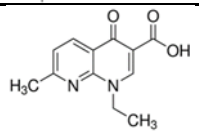
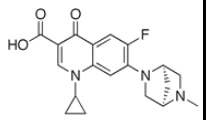
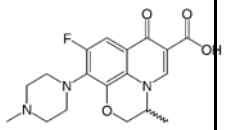
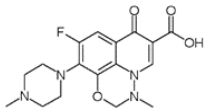
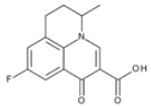
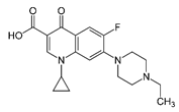
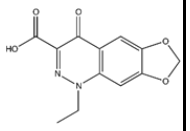
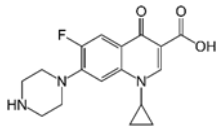
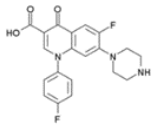
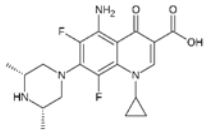
Florokinolonlar nerdeyse tüm bakteriyel enfeksiyonlara, özellikle üriner sistem ve akut solunum yolu enfeksiyon ve de hastalıklarına karşı tatbik edilmektedir. Siprofloksasin 1980'den beri geniş spektrumlu bir antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Enrofloksasin, veteriner tıbbında anti-inflamatuvar bir ilaç olarak kullanılmaktadır. İlk olarak florokinolon kalıntıları, Çin, Vietnam ve diğer Asya ülkelerindeki deniz ürünlerinde bulunmuştur. Arıcılıkta arı hastalıklarının profilaksisi olarak florokinolonların uygulanması son derece faydalı olmak ile beraber bal örneklerinde kalıntılar son yıllarda oldukça fazla tespit edilmektedir. 2006 yılının ilk çeyreğinde çeşitli ülkelerden toplanan birçok bal numunesinde fluorokinolon kalıntıları tespit edilmiştir. Yiyeceklerde florokinolon kalıntılarına karşı tolerans yoktur, bu nedenle bal örneklerinde diğer yasaklı antibiyotikler gibi kinolon türevi kalıntı bulunmaması Avrupa Birliği Komisyonu tarafınca tavsiye edilmiş ve buna uygun mevzuatlar

yayınlanmıştır. Kalıntı barındıran balların insanlar tarafından tüketilmesi, kişilerde antibiyotiklere karşı direnç oluşumuna sebebiyet vermektedir.

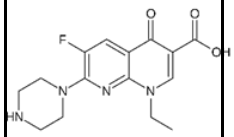
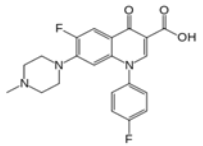
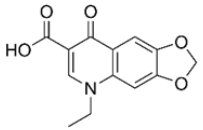
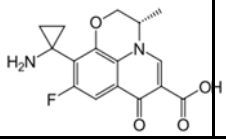
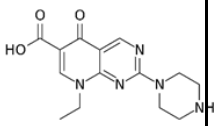
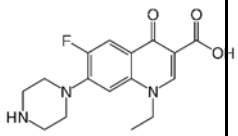
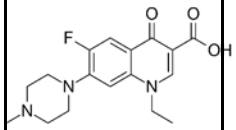
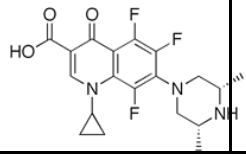
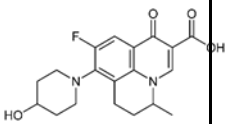
1.12.1. Fizikokimyasal özellikler

Çoğu kinolon türevinin iki farklı iyonlaşabilir fonksiyonel grup barındırmasından dolayı iki farklı pKa değeri vardır. Birçoğu kimyasal olarak kararlı bileşikler olup, hidroliz ve yüksek sıcaklıklara karşı oldukça dayanıklı bir duruş sergilerler (Pico ve Andreu, 2007). UV ışınlarına maruz kaldıklarında ise bozunup, ayrışabilirler. Kinolonlar, Mg^{2+} ve Al^{3+} gibi çeşitli iki ve üç değerli metal iyonlarıyla kararlı metal kompleksleri oluşturabilirler (Turiel ve ark., 2006). Yüksek hidrofobik-lipofilik (yağda çözünen) özellikleri dolayısı ile katı çevre matrikslerine kuvvetli şekilde, bağıl formda bulunabilirler.

Tablo 1. 7. Geliştirilen metotta yer alan florokinolon bileşenlerine ait fiziksel özellikler ve molekül yapıları

Molekül ismi	Molekül Yapısı	Molekül Ağırlığı (g/mol)	pKa	LogP	Suda Çözünürlük	Molekül ismi	Molekül Yapısı	Molekül Ağırlığı (g/mol)	pKa	LogP	Suda Çözünürlük
Lomefloksasin		351,348	5,64	-0,39	0,106 mg/mL	**Fleroksasin**		351,354	5,44	1,12	0,284 mg/mL
Nalidiksik asit		232,235	5,95	0,95	2,3 mg/mL	**Danofloksasin**		357,148	6,43	1,81	-
Oflaksosin		361,368	5,45	0,65	1,44 mg/mL	**Marbofloksasin**		362,361	6,02	-0,32	1 mg/mL
Flumekuin		261,252	6,00	1,62	1,24 mg/mL	**Enrofloksasin**		359,39	6,43	-0,72	10 mg/mL
Sinoksasin		331,347	4,93	1,25	0,961 mg/ mL	**Siprofloksasin**		331,346	5,76	0,57	1,35 mg/mL
Sarafloksasin		385,371	5,74	0,29	0,105 mg/mL	**Sparfoksasin**		392,41	5,75	-0,07	0,113 mg/mL

Tablo 1.7. (Devam) Geliştirilen metotta yer alan florokinolon ilaçlarına ait fiziksel özellikler ve moleküler yapıları

Enoksasin		320,319	5,5	-0,97	1,09 mg/mL	**Difloksasin**		399,398	4,33	0,89	-
Oksolinik asit		261,23	6,87	0,94	-	**Pazufloksasin**		318,304	5,59	-1	2,41 mg/mL
Pipemidik asit		303,32	5,4	-2,15	-	**Norfloksasin**		319,331	5,77	-0,47	1,01 mg/mL
Pefloksasin		333,358	5,66	0,88	1,23 mg/mL	**Orbifloksasin**		395,38	5,6	1,21	10 mg/mL
Nadifloksasin		360,385	6,13	0,87	0,632 mg/mL						

Tablo 1. 8. Arıcılıkta kullanılan, sınıflandırılmış antibiyotikler

NİTROFURANLAR	SÜLFONAMİDLER	MAKROLİDLER	TETRASİKLİNLER	AMİNOGLİKOZİTLER
Nitrofurazon	Sülfatiyazol	Eritromisin	Tetrasiklinler	Streptomisin
Furaltadon	Sülfadiazin	josamisin	Demokloksiklin	Dihidrostreptomisin
Nitrofurantoin	Sülfadimidin	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
	Sülfasomizol			Sisomisin

Tablo 1.8. (Devam) Arıcılıkta kullanılan, sınıflandırılmış antibiyotikler

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	

1.13. Antibiyotik Kalıntılarının İnsan Sağlığı Üzerine Olumsuz Etkileri

Antibiyotik kalıntısı bulunan gıdaları tüketen kişilerde, toksik belirtiler, alerjik reaksiyonlar, üreme bozuklukları, dirençli bakterilerin gelişimi ve bağırsak florasında değişiklikler saptanabilmektedir. Gıdalarda antibiyotik kalıntıları tolerans seviyesinin üstünde olduğu takdirde, halk sağlığı için tehlike arz edip, bu tür besinler tüketilmemelidir (Rose ve ark., 1999). Kalıntılar, kalıntı barındıran yiyeceklerin tüketilmesi ile kişilerde anaflaktik şok, alerji gibi farklı şiddette ve türde rahatsızlıklar, teratojenik, mutajenik, etkiler, zehirlenmeler ve kanserojenik etkiler gözlemlenebilmektedir.

Antibiyotik kalıntılarının, gıdalar aracılığı ile insanlara transfer olması sonucu, vücutta yer alan zararsız ve dirençsiz bakteri türlerinin ölmesi ve zararlı etkiye sahip, dirençli yapıdaki bakterilerin artmasına ve gelişimine imkân sağlaması söz konusudur. Ayrıca, yayınlanan bir çalışmada uygulanan antibiyotik tedavisinin giderek pasif ve etkisiz kaldığı, Dünya Sağlık Örgütü tarafından bulgulanmıştır. (Duru ve Şahin, 2004). Sindirim sistemimizde yer alan yararlı bakterilerin sindirime yardımcı olmalarının yanında, zararlı bakterilerin vücuda girmesi ve gelişimini önleyici bazı önemli fizyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Kalıntı olarak, transfer olan antibiyotiklerin bağırsak sisteminde yer alan bu yararlı bakterilere zarar vererek, doğal floral yapının bozulmasına sebep olması söz konusudur. Antibiyotikler için direnç geni, integonlar, plazmidler ve transpozonlar vasıtası ile konak hücre bölünmesi esnasında vertikal şekilde transfer olduğu gibi, karışık bakteriyel popülasyonlardaki çeşitli ya da aynı tür ve ırklardaki apatojen ya da patojen bakteriler arasında transformasyon, konjugasyon ya da transdüksiyon vasıtası ile horizontal şekilde de transfer olması mümkündür. Halk sağlığını korumak adına dirençli bakterilerin hayvanlardan insanlara gıda zinciri aracılığı ile transferinin kontrol altında tutulması gerekmektedir. (Van Den ve ark., 2000). Fazla yüksek derişimde veya yanlış takvimde veteriner ilaç uygulamaları, ilaçların verilme prosedürleri, yanlış formülasyonlar, ruhsatsız biçimde ilaç kullanımı yada kullanımın ilacın kalıntıya sebep olmayacak şekilde, metabolize olması ve vücuttan tahliye olması için gerekli sürenin beklenmemesi, veteriner hekimlerin yönlendirilmesine uyulmaması, antibiyogam uygulaması yapılmadan ilaç reçete edilmesi, ilacın tatbik edildiği hayvandaki mevcut rahatsızlıkların doğru gözetilmemesi,

hayvansal orjinli gıda maddelerinde veteriner ilaç kalıntılarına rastlanmasının başlıca sebepleri olarak sayılabilmektedir. (Impens ve ark., 2003).

Hayvancılıkta kullanılan ilaç ve diğer kimyasal maddelerin birçoğu aplike edildikleri alanlarda ve canlıların vücudunda kısmen metabolize olarak etkisiz hale gelebilmektedir. Bazıları ise yavaş parçalanmaları sebebi ile, giderek yükselen seviyelerde doku ve organlarda birikme yapabilmektedir. Yoğun uygulama alanına sahip antimikrobiyallerin metabolizmadan dışlanma zamanları önemsenmediğinde, hayvansal besinlerde kalıntılara rastlanabilmektedir. (Demir, 2004). Düşük dozda antibiyotik etkili moleküllerin yaygın kullanımı ve uzun süreli düşük konsantrasyonlarda maruz kalınması, artık bu bileşiklere duyarlı olmayan dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına sebebiyet vermektedir (Rooklidge, 2004). Veteriner antibiyotiklerin, insanlar için kullanılan antibiyotiklerden genel olarak farklı olduğu halde, veteriner antibiyotiklerinin kimyasal yapıları benzer olduğundan insanlarda bu ilaçların kalıntılarının direnç oluşturması dikkati çekmektedir (Lindsey ve ark., 2001). Antibiyotik bileşikler için bakteriyel direnç farklı biçimde ortaya çıkabilir. Bakterilerin çoğu direnç genlerini öncüllerinden miras olarak alsalar da genetik mutasyonlar bakterilerde kolaylıkla görülebilmekte ve yeni bir direnç özelliği oluşturmaktadır veya türler arasında direnç genlerinin değiş tokuşu aracılığı ile bir antibiyotiğe karşı savunmaya katkıda bulunan mevcut bir direnci güçlendirmektedir. Bunun yanı sıra, direnç genleri, çeşitli kaynaklardan örneğin, bitkiler, hayvanlar, balıklar ve su tüketimiyle doğrudan insanlara transfer olabilmektedir (Batt ve ark., 2006).

Florokinolon antibiyotiklerin arıcılıkta yaygın kullanımı sonucu, bu antibakteriyellere karşın termofilik Campylobacter spp.'nin yükselen miktarda direnç oluşturduğu tespit edilmiştir. Bununla ilişkili olarak, multi antibiyotik direnç etkisi gösteren enteropatojenik bakteriyellerin kişilere transferinde mühim bir etken olduğu bildirilmiştir. (Sackey ve ark., 2001).

1.14. Antibiyotik Kalıntılarının Tespitinde Kullanılan Yöntemler

Son senelerde, AB tarafından veteriner ilaç kalıntılarının görüntülenmesi ve konfirmasyonu ile alakalı birtakım kriterler gündeme gelmiştir. Avrupa Komisyonu'na göre, teşhise yönelik yöntemler, yasaklı yani sıfır tolerans olarak belirlenmiş maddelerin tayininde kullanılabilir. Miktarlandırmaya yönelik yöntemler ise maksimum kalıntı

konsantrasyonu belirtilmiş preparatlar için gereklidir (Brabander ve ark., 1996). Nitel yöntemlerden sıklıkla kullanılan ELISA analizi, antijen-antikor reaksiyonunun oluşması ve oluşan reaksiyonun sonucunda enzim-substrat ilişkisi ile görünür form alması akabinde spektrofotometre ile dedeksiyonu prensibi ile çalışmaktadır. Elde edilen sinyal, numunedeki aranan analit oranı ile ters orantılı şekilde yükselmektedir (Anonim, 2006). Uygulamasının basit, analiz süresinin kısa olması, hassasiyet ve spesifikliğinin iyi ve her kitte yüksek miktarda örneklem ile çalışma imkânı vermesi ELISA yönteminin avantajlarındandır (Toldra ve Reig, 2006). ELISA yöntemi ile alınan sonuçların, kütle spektrofotometrisi ile konfirmasyonu elzemdir (Rodziewicz, 2008). Misel elektrokinetik kromatografi, Kapiler elektroforez, yüksek basınçlı gaz kromatografisi, yüzey plazmon rezonans, antibiyotiklerin araştırılmasında uygulanan başlıca tekniklerdir. Yapılan son araştırmalar LC-MS/MS'in tüm kalıntılarının teşhisinde başvurulabilecek en özgül ve de hassas yöntem olduğunu ortaya koymaktadır (Anonim, 2010).

96/23/EC direktiflerine göre bal matriksindeki analiz metotları tarama ve konfirmasyon olmak üzere iki ana başlık altında değerlendirilmektedir. Tarama metotlarında, genellikle bir kit yardımı ile gerçekleştirilen ELISA test ve Charm II, ROSA testleri olarak öne çıkmaktadır. Bu testler arasında yer alan Charm II yöntemi ile yapılan tarama analizlerinde yanlış pozitif sonuç elde etme olasılığı oldukça yüksek olarak değerlendirilmektedir (Reybroeck, 2003). ELISA yöntemleri ise bal matriksinde başarı ile uygulanabilen ve antibiyotik kalıntı varlığını enzyme immunoassay reaksiyonlarını vererek spesifik antijen ve antikor tespiti sağlamaktadır. Charm II yöntemi farklı matriksler için tercih edilebilecek bir yöntem olup son dönemlerinde bal matriksine de başarı ile adapte edilmiştir. Yapılan konfirmasyon çalışmalarında, valide edilmiş HPLC ve LC-MS yöntemleri ile Charm II ile tespit edilmiş pozitif sonuçların %30'luk bir kısmı konfirme edilebilmiştir (Edder ve ark., 1999). Charm II testinin tarama testi olarak bir diğer dezavantajı ise antibiyotik varlığını grup olarak belirleyebilmesi ve analit düzeyinde sonuç verememesidir (Bogdanov, 2003; Quintana-Rizzo ve ark., 2005). Balda antibiyotik tespiti için kalitatif tarama metotlarından bir diğeri ise ROSA (Rapid One Step Assay) testidir. ROSA testi strip test olup, ekipman olarak sadece basit bir inkübatör ve belirteç olarak kullanılan strip ihtiyacı vardır. Sonuçlar bu test ile direk olarak okunmaktadır. ROSA testi balda penisilin G ve beta laktam (sefalosporinsler)

içeriklerinin tespitinde sıkça kullanılmaktadır (Legg ve ark., 2003). Tarama metotları antibiyotik ve antimikrobiyal kalıntı analizlerinde kalitatif ya da yarı kantitatif sonuçlar verebilmektedir. Tarama metotları kesin sonuç için tamamlayıcı olarak kromatografik ve hassas bir teknik ile doğrulanmalı ve sonuçlar netleştirilmelidir. HPLC tekniği kromatografik teknikler arasında konfirmasyon amaçlı başvurulan en sık tekniktir (Kanfer ve ark., 1998).

HPLC tekniği ile geliştirilmiş analitik yöntemlerde, antibiyotik kalıntılarında geçmiş dönemlerde dedektör olarak sıklıkla UV dedektörler tercih edilmiş olup, günümüzde bu teknik kütle spektrometrelerinin varlığı ile LC-MS/MS şeklinde güncellenmektedir (Vinas ve ark., 2004). Kütle spektrometreleri 3 boyutlu data sağlayarak, kromatografik olarak kompleks matrikslerden ayrılmış olan antibiyotik ilaçların kütlesel olarak da tayinini yaparak, daha özgül ve kesin sonuçlar vermektedir. 2002/657/EC direktiflerine göre HPLC veya tarama yöntemleri ile tespit edilmiş antibiyotik varlıkları MS dedeksiyonu ile konfirme edilmelidir (Gentili ve ark., 2005). LC-MS tekniğinin dedeksiyon güvenirliği nerede ise %100 olarak addedilmektedir (Nakazawa ve ark., 1999). Günümüzde antibiyotik varlığının tespiti için LC-MS yöntemi ile çok düşük seviyelerde ve tüm antibiyotik bileşenlerini tespit etmeye yönelik metotlar geliştirilmeye çalışılmaktadır.

1.14.1. Tarama testleri

Kalıntı taramaları için çok popüler ve oldukça sık kullanılan yöntemler, mikrobiyal veya immünolojik test veya biyolojik testlere dayanan yöntemlerdir (Cháfer-Pericás ve ark., 2010) Tarama yöntemleri, genellikle, yarı uyumlu örneklerin oranının düşük olması ile yarı-kantitatif veya kantitatif sonuçlar sağlayabilir. Ayrıca, yüksek verim, kolay kullanım, kısa analiz süresi, iyi seçicilik ve düşük maliyet sağlar. Sıklıkla tarama testlerine doğrulayıcı yöntemler eşlik etmektedir.

1.14.2. Doğrulama metotları

Gıda numunelerindeki veterinerlik ilaç kalıntılarının analizi için ayırma ve doğrulama teknikleri, örneğin gaz kromatografisi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografi (LC) ve kapiler elektroforez yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tarihsel olarak, veteriner ilaç kalıntılarının kontrolü, fluorimetrik dedektör (FLD), ultra violet dedektör

(UV) ve elektron yakalama dedektörü (ECD) gibi spesifik olmayan teknolojilere bağlı kromatografiye dayanıyordu. Bununla birlikte, bu teknikler bazı doğal dezavantajlara sahiptir: her antibiyotik sınıfı ayrı olarak test edilmelidir, hedef analitlerin doğrulanması esas olarak standartlar ile alıkonma süresi karşılaştırmasına dayanır ve bazı analitlerin uygun bir saptama limiti (LOD) elde etmek için türevlendirilmesi gerekir. Konvansiyonel detektörlerin kullanımına dayanan daha eski kromatografik yöntemlerle karşılaştırıldığında, LC-MS tekniğinin çok seçici olması, dedeksiyon sistemlerine ek olarak ayırma tekniklerinin kullanılması, belirli bir bileşiğin kimliğiyle ilgili değerli bilgiler sağlaması, daha eski, zahmetli ve zaman alıcı prosedürleri büyük ölçüde tedavülden kaldırmıştır. Birçok ülkedeki Halk Sağlığı Ajansları, spesifik bir dedektör olarak gıda maddesindeki kirleticilerin net bir şekilde kantite edilmesini sağlayan kütle spektrometresi ile dedeksiyona güvenmektedir. 2002/657 / EC sayılı Komisyon Kararına göre, "Moleküler spektrometrik tespiti kullanılmadan sadece kromatografik analiz yöntemlerine dayanan yöntemler doğrulayıcı yöntemler olarak kullanım için uygun değildir. Doğrulayıcı yöntemler, analitin kimyasal yapısı hakkında bilgi verebilmelidir. Sonuç olarak, kütle spektrometrik algılama kullanılmadan sadece kromatografik analizlere dayanan yöntemler artık uygun olmamaktadır.

1.15. Ballarda Kinolon Kalıntı Analizlerinde Kullanılan Yöntemler

Literatürde bal örneklerinde kinolon antibiyotiklerinin miktarını ölçmeye yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Geliştirilen analitik yöntemlerden bazıları, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Yüksek Performans Sıvı-Kromatografisi (HPLC), Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi, Likit-Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) olarak sıralanabilir. Florokinolonların analizi için hem tekli hem de üçlü kuadrupol kütle spektrometresine (LC/MS-MS) dayanan daha duyarlı yöntemler de bulunmaktadır. Kütle spektrometrisi yöntemleriyle, çok sayıda parçacık veya dönüşümün miktarı da belirlenebildiğinden daha spesifiktirler. ELISA'lar basit, düşük maliyetli ve pahalı ekipman gerektirmeyen testler olmakla birlikte, standardizasyon sorunları ve genellikle örnek matriksinde bulunan diğer bileşiklerle oluşan çapraz tepkimeler, bu yöntemin düşük miktarların ölçümü açısından kullanımını güçleştirmektedir. Yayınlanan çalışmalarda, çeşitli analitik cihazların yanı sıra farklı örnek hazırlama yöntemleri de değişken matriks türlerine göre kullanılmıştır. Bu

hazırlık süreçlerinde SPE (Katı Faz Ekstraksiyonu) sıklıkla tercih edilir iken, LLE (Likit-Likit Ekstraksiyonu), Quechers (Quick-Easy-Cheap-Rugged-Safe) yöntemleri de uygulanmak ile birlikte dedeksiyon tekniğine göre ilave türevlendirme prosedürleri de literatürdeki kinolon çalışmaların da gözlemlenmiştir. Kinolonların tespitine yönelik olarak geliştirilmiş & kullanılmış metotlara göz atıldığında çok değişken matriks türleri (Deniz ürünleri, yemler, kan, idrar, sular, doku örnekleri (balık, tavuk, çiftlik hayvanları) yumurta, süt, plazma & serum, tablet formundaki ilaçlar, toprak) gözlemlenmiş olmak ile birlikte bal matriksine spesifik geliştirilmiş kinolon dedeksiyon yöntemleri de **EK-C** bölümünde **Tablo C.1**'de özetlenmiştir.

1.16. Numune Ekstraksiyon Teknikleri

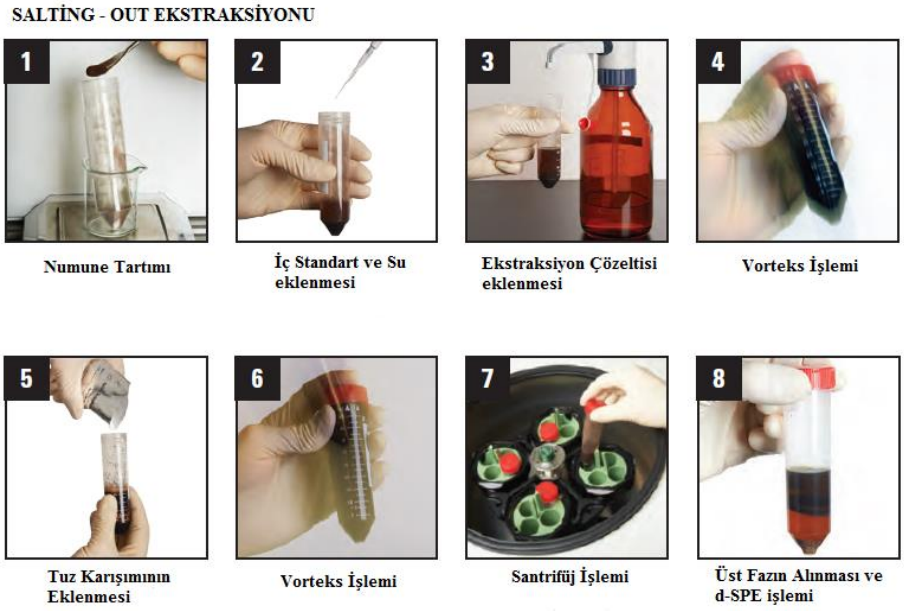
Numune hazırlama, çeşitli matrikslerden ilgili bileşiklerin izolasyonu ve / veya önderiştirilmesini, algılama sistemini etkileyebilecek ve analitlerin ayrılma ve tespit için daha uygun hale getirilebilecek herhangi bir matriks müdahalesinin giderilmesini içeren prosestir. Tayin için yüksek verimli analitik enstrümantasyonların gelişimindeki ilerlemelerle birlikte, numune hazırlama, analitik prosedürün hayati bir parçasıdır ve etkili numune hazırlama, doğru niceliksel sonuçlar elde etmek ve enstrüman performansını korumak için gereklidir. Tipik bir numune hazırlama tekniği, matriksten analitlerin bir ekstraksiyon basamağından ve ekstraksiyonu müteakip bir saflaştırma aşamasından oluşmaktadır.

1.16.1. Quechers

İlk olarak Anastassiades ve ark. yüzlerce pestisit kalıntısının analizini, başarılı bir şekilde uygulanan Quechers olarak adlandırılan, numune hazırlama prosedürü (hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam ve güvenli) ile gerçekleştirdi. (Lehotay, S. J. ve Anastassiades, M., 2007) Quechers yaklaşımında, tuzların ($MgS0_4$, NaCl ve / veya tamponlayıcı ajanlar) varlığında, yüksek su içerikli numune (kuru gıda maddelerine su eklenerek), organik bir çözücü (çoğunlukla ACN, aynı zamanda etil asetat veya aseton) ile ekstrakte edilmektedir. Eklenen tuz bulunduğu matriksin iyonik gücünü arttırıp ilgili analitin organik solvente difüzyonunu kolaylaştırmakta ve sulu kısım ile organik arasındaki faz farkının oluşmasına yardımcı olmaktadır. Bu basamak aynı zamanda 'Salting Out' olarak da adlandırılmaktadır. Pestisitler haricinde antibiyotik kalıntıları

içinde sıklıkla kullanılabilecek bu aplikasyonun devamında asetonitrilli ekstraksiyon, dispersif-katı faz ekstraksiyonu adlı temizleme adımını içermektedir. Sorbent karışımı içeren PSA, $MgSO_4$, C18, GCB gibi farklı sorbentlerin karışımları ile ekstraktların karıştırılması ile saflaştırma yapılmaktadır.

Quechers yaklaşımına dayanan yöntemlerin çoğunda, EDTA varlığında veya yokluğunda asidik ACN ile solvent ekstraksiyonu, ardından suyu uzaklaştırması için susuz magnezyum sülfat kullanılarak faz ayrımı yer alır. Birkaç yöntem, C18, primer sekonder amin (PSA) veya her ikisinin kombinasyonunu bir sonraki d-SPE prosedürü olarak kullanmaktadır.

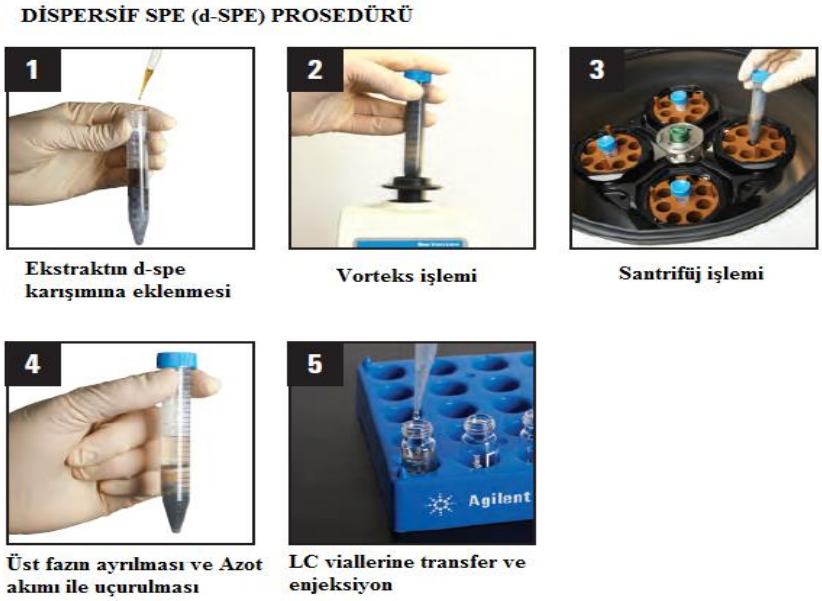


Şekil 1. 3. Quechers genel hazırlık prosedürü (ekstraksiyon-salting out)

1.16.2. Dispersif SPE (d-SPE)

Dispersive-SPE (d-SPE), sorbentin uygun bir solvent ile önceden ekstrakte edilmiş bir numuneyle karıştırılmasını içeren temizleme tekniğidir. Genellikle ekstraksiyon adımını izleyen Quechers yönteminin bir parçasıdır. Uygun sorbent, matrikse birlikte ekstraktif maddeleri yüzeyine adsorbe ederek, çözücü içinde ilgili analitler bırakır. C18 sorbentleri yüksek oranda lipofilik bileşikleri tutar ve amino veya karbon bazlı fazlar gibi diğer sorbentler sırasıyla yağ asitleri ve pigmentleri uzaklaştırmak için kullanılır. Artık su ve bazı diğer bileşikleri absorplayarak ilave temizleme sağlamak için ilave olarak $MgS0_4$ eklenebilmektedir. Birçok LC ve GC'ye uygun analit için yüksek geri

kazanım ve tekrarlanabilirlik sağlayan son derece hızlı, basit ve ucuz bir işlemdir. Birkaç analitik yöntem, veteriner kalıntı analizinde d-SPE'yi temizleme basamağı olarak kullanmıştır; başta C18 olmak üzere (Juan-García ve ark., 2007, Mastovska ve Lightfield, 2008) PSA, amin (NH2) ve silika karışımından hazırlanmış uygulamalar bildirilmiştir (Villar–Pulido ve ark., 2011). d-SPE, SPE ile aynı derecede temizleme sağlamaz. Bununla birlikte, pratik (hızlı) ve maliyet avantajlarıyla birleşince iyi bir geri kazanım ve tekrarlanabilirlik sağlamaktadır.



Şekil 1. 4. Quechers genel hazırlık prosedürü (clean-up) (d-SPE)

1.16.3. Dilute & shoot (Seyrelt-Enjekte Et)

Numuneyi seyreltme ve filtreleyerek enjeksiyona hazır hale getirme prosedürüne verilen isim olmak ile birlikte birçok avantaj ve dezavantajı da beraberinde getiren bir yöntem olarak tanımlanabilmektedir. Sıvı formdaki ya da uygun reaktif ile çözme veya homojen hale getirebilmeye imkân tanıyan katı ve vizkoz numuneler için uygulanabilmektedir. Numuneye herhangi bir temizleme tekniği uygulanmadığından olası girişim ve kirliliklerinde eş zamanlı enjeksiyonu anlamına gelmektedir. Burada en büyük avantaj, numune hazırlık sürecinin çok basit, kısa süreli ve az maliyetli olmasıdır. Bahsedilebilecek en büyük dezavantajı ise analiz esnasında kullanılacak analitik yönteme bağlı olarak enstrümental cihaz ve diğer cihaz yardımcı ekipmanlarında zaman içerisinde kirliliğe, tıkanmaya sebep verebilmesi ve elde edilen datalarda girişim ya da yorumlanması zor durumlara sebebiyet verebilmesidir. Bu teknik kullanılmadan önce

numunenin fiziksel özellikleri, kullanılacak ekipmanlar, kullanılacak yöntem gibi birçok parametre gözden geçirilmeli daha sonrasında numuneye uygulanmalıdır.

1.17. Kinolon Analizlerindeki Analitik Problemler

Yiyeceklerdeki veteriner ilaçlarının, kalıntı analizinde yarattığı birçok analitik problemi vardır. Çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahip çok sayıdaki bileşik analitik zorluk yaratmaktadır. Aynı grup içersinde farklı polaritelere ve pH hassasiyetine sahip moleküller analitik yöntem geliştirme açısından zorluk teşkil etmektedir. Buna ek olarak, antibiyotik kalıntıları kendisi veya metabolitleri şeklinde fiziksel veya kimyasal özellikleri değişmiş şekilde gıdalarda yer alabilmektedir. Glukuronidasyon, sülfatasyon veya glisin ile konjugasyon etkileşimleri, protein ya da metaller ile bağlanma afiniteleri ilaçların yapısını değiştirebilmektedir (Barbosa ve ark., 2007). Florokinolonlar metal iyonlarına bağlanma afiniteleri dolayısı ile çoğu kez düşük geri kazanımlara sebep olabilmektedir. Bir diğer analitik problem, veteriner ilaç kalıntısının analiz edilmesi gereken çok düşük konsantrasyon seviyesidir, çünkü verilen MRL'lerin ve MRPL'lerin büyük çoğunluğu ppb düzeyindedir (µg/kg). Bu nedenle, iz element seviyelerinde gıda matrikslerinde veterinerlik ilaç kalıntılarının belirlenmesine yönelik analitik yöntemler gereklidir ve analitlerin seçici ve kantitatif olarak ekstraksiyonu, numunenin temizlenmesi ve zenginleştirilmesi için kullanılan prosedürlerin yanı sıra duyarlı ve spesifik tespit de gereksinimleri karşılamalıdır.

Son olarak, matriksin karmaşıklığı da dikkate alınmalıdır. Örnek matriks türleri (Doku, süt, bal, yumurta ve balık gibi). Bal haricindeki tüm bu gıdalar, proteince zengindir (sütte%3'ten, ette %20'ye), bu da proteinlere kolayca bağlanan ilaçlar için önemlidir. Bal matriksinde ise genel problem antibiyotiklerin metaller ile kompleks oluşturması ve bulk düzeydeki şeker profili dolayısı ile glukoz molekülleri ile glukuronidasyon oluşturması ve enzimatik ya da asit-baz hidrolizi gerektirmesidir. Genel olarak birçok kalıntı konjuge formda bulunur ve ekstraksiyon öncesinde enzimatik veya kimyasal hidroliz yoluyla serbest bırakmayı gerektirir (Dasenaki ve ark., 2014). Yukarıda bahsedilen nedenlerle ve analitik prosedürlerin maliyet etkinliğini arttırma arzusundan dolayı, mümkün olduğunca çok sayıda bileşiği tespit edebilen, onaylayabilen ve nicelik kazanabilen çok aşamalı yöntemlerin geliştirilmesi kalıntıların analizinde öneme sahiptir.

1.18. Kinolonların Enstrümental Tayin Yöntemleri

1.18.1. Kapiler elektroforez

Kapiler elektroforez (CE), farklı analitlerin hem yüksek verimlilik hem de çözünürlük, düşük numune ve elektrolit tüketimi ve hızlı yöntem geliştirme olasılığı ile eşzamanlı olarak belirlenebilmesi nedeniyle yaygın şekilde kabul gören ayırıcı bir analitik tekniktir (Opekar ve ark., 2009). CE, kromatografik teknikler için yeterli bir alternatiftir, özellikle de küçük numune miktarları mevcut olduğunda tercih edilebilmektedir. Bazı veteriner ilaçların fiziko kimyasal özellikleri, iyonlaşabilir yapıları, çoklu iyonizasyon grupları ve farklı su çözünürlükleri dolayısı ile onları elektroforetik analiz için oldukça elverişli hale getirir. Ayrıca, HPLC ile kombine edilmiş CE, otomasyon, küçük hacimlerde örneklerin enjeksiyonu ve çoklu algılama modları (ECD, UV, DAD, FLD, MS vb.) sağlamaktadır. Bu sebeplerden dolayı, CE, önem kazanmış ve bugün ağırlıklı olarak gıda ve ilaç analiz alanlarında uygulama alanlarını genişleten bir analitik araçtır (Robledo ve Smyth, 2009). CE'nin MS ile kombinasyonu, CE'nin mükemmel ayırma özelliklerini ve MS'in yapısal aydınlatmada ek olarak kullanılması veya arka plan gürültüsünü azaltarak hassasiyet analitik yöntemin gücünü arttırmaktadır. Tavuk kasındaki (Lara ve ark., 2008), kinolonların, domuz dokusundaki sülfonamitlerin (Font ve ark., 2007) ve et örneklerinde sülfonamitlerin ve trimetoprimlerin analizi için CE-MS ve CE-MS / MS yöntemleri bildirilmiştir. Bu avantajlarına karşın, farklı veteriner ilaç gruplarının belirlenmesini tanımlayan az sayıda yayın mevcuttur.

1.18.2. Kromatografik ayrım

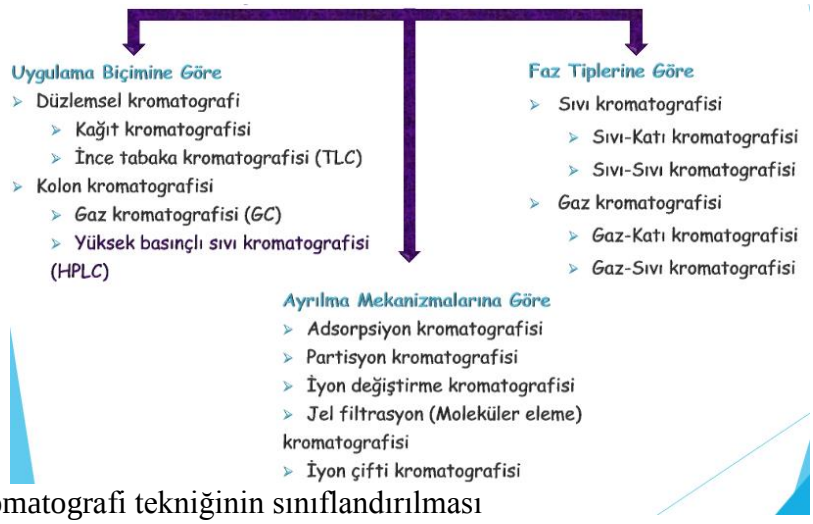
Kromatografi, kompleks karışımlardaki kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bilimin bütün dallarına uygulanan kromatografi, bilinen en genel uygulama alanına sahip ve güçlü ayrım tekniğidir (Skoog ve ark., 1998, Kazakrvich ve Lobrutto, 2007, Ahuja, 2003).

Tanımı: Kromatografik ayrımlar, analit karışımını gözenekli katı bir ortam vasıtasıyla zorla taşıyan sıvının ve analitlerdeki etkileşimlerin bu gözenekli ortamın yüzeyi ile olan farklı etkileşimleri ile sonuçlanan bir karışım bileşeni için oluşan farklı göç sürelerinin tespitine dayanır. İki farklı fazın varlığı analitin bu iki fazdan birindeki dağılımının

polaritesine bağlı olarak daha fazla olduğu anlamına gelmektedir. Bu fazlardan biri analit naklini sağlar ve genellikle mobil faz olarak adlandırılır, diğer faz hareketsizdir ve genellikle durağan ya da sabit faz olarak adlandırılır. Genelde analitler olarak adlandırılan bir bileşen karışımı, hareketli fazda ve sabit fazlardaki etkileşimlerine izin verecek şekilde moleküler seviyede mobil faza dağıtılır. Hareketli ve durağan fazlar arasındaki arayüzün yüksek yüzey alanı, karışımdaki farklı bileşenlerin alan ayırımı için gereklidir. Analit molekülleri mobil faz ve sabit faz yüzeyi arasında çoklu faz geçişlerine uğrarlar. Molekülün sabit faz yüzeyinde ortalama kalış süresi etkileşim enerjisine bağlıdır. Çok küçük etkileşim enerjisi farkına sahip farklı moleküller için, önemli yüzeyin varlığı kritiktir, çünkü analit moleküllerinin kromatografik kolon içinden geçerken geçtikleri faz geçişlerinin sayısı arttıkça tutunma farkı da o kadar yüksek olur. Hareketsiz ve hareketli fazların doğası, kolondan taşınma modu ile birlikte kromatografik yöntemlerin sınıflandırılmasına temel oluşturmaktadır.

1.18.3. Kromatografik ayrımların sınıflandırılması

Kromatografik teknikler 3 grupta incelenebilmektedir. Bunlar Faz tiplerine göre, uygulama biçimine göre ve ayrılma mekanizmasına göre şekillendirilebilmektedir.



Şekil 1. 5. Kromatografi tekniğinin sınıflandırılması

1.18.4. Sıvı kromatografisi

Sıvı kromatografisi (LC), çözelti içindeki bir karışımın ayrı bileşenlerine ayrılmasında kullanılan analitik bir teknik olan kromatografi biçimlerinden biridir. Tswett'in belirttiği gibi, bu ayrıştırma, birisi hareketsiz duran, diğerinin üstünde ilerlediği farklı fazların ya

da karışmayan tabakaların kullanılmasına dayanmaktadır. Sıvı kromatografi, mobil fazın bir sıvı olduğu herhangi bir kromatografik prosedürü tanımlamak için kullanılan genel addır. Ayırma, optimum koşullar kümesi altında, bir karışımdaki her bileşenin, karışımdaki diğer bileşenlere göre farklı iki faz ile etkileşime girmesi nedeniyle oluşur. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı mobil fazın mekanik olarak sabit faz içeren bir kolondan pompalanacağı sıvı kromatografisini tanımlamak için kullanılan terimdir. Dolayısıyla, bir HPLC aleti bir enjektör, bir pompa, bir kolon ve bir detektörden oluşmaktadır.

1.18.5. Ters faz kromatografisi

Normal fazlı LC'ye karşıt olarak, ters fazlı kromatografi esas olarak dağılma kuvvetleri (hidrofobik veya van der Waals etkileşimleri) kullanmaktadır. Hareketli ve durağan fazların polariteleri ters olarak addedilmektedir, öyle ki RP-LC'deki sabit fazın yüzeyi hidrofobik olur ve hareketli faz çoğunlukla su bazlı çözeltilerin kullanıldığı polar bileşenlerdir. RP-LC, en popüler kromatografi modudur. Düşük molekül ağırlıklı numunelerin analizlerinin yaklaşık %90'ı RP-LC kullanılarak yapılır. Yüksek popülaritesinin başlıca etkenlerinden biri, çok benzer özellik gösteren bileşenleri ayırt etme, tutma ve seçicilikteki modifikasyon kolaylığıdır. Bu kromatografi modunda kullanılan adsorbanlar, hidrofobik yüzeylere sahip gözenekli sert malzemelerdir. Analitin, yüzey etkileşimleri (NP, RP ve IEX) olan LC'nin tüm modlarında, adsorban yüzey alanı ne kadar benzer özellikte olursa, tutunma süresi artar ve çoğu durumda daha iyi ayrılma olur. RPLC'de kullanılan katı faz malzemelerinin çoğu kimyasal olarak modifiye edilmiş gözenekli silisdir. Silika özellikleri yıllarca araştırılmış ve kontrollü boyut ve gözeneklilikteki küresel parçacıkların imalatı daha iyi hale getirilmiştir. Piyasada bulunan ters faz sabit faz materyalleri ve kolonlarının birçoğu işlevsellikleri açısından değişkenlik gösterebilmekte olup, değişen hidrofobiklikleri ve farklı yapısal bileşenleri (doğrusal alkil zincirleri, aromatik halkalar, heterosiklik vb.) içermektedir.

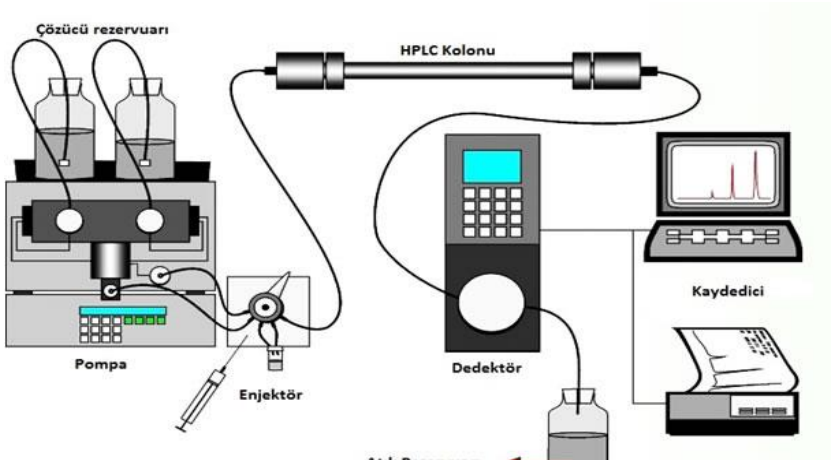
1.18.6. Sıvı kromatografisi cihazları

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), hidrofilik ve hidrofobik, termal olarak kararsız ve / veya yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerin analizi için çok uygundur. Enstrümental analizlerde, HPLC'nin esneklik, genellikle düşük çalıştırma

maliyetleri, seri olarak bağlanabilen bir dizi seçici dedektör ve otomasyon kolaylığı gibi ilave pratik avantajları vardır. Bu özellikler çoğu zaman çeşitli bileşiklerin (örneğin ilaç ve metabolitlerin) analizini kolaylaştırmak için kullanılabilmektedir.

1.18.7. HPLC enstrümanları

Modern sıvı kromatografisinde yaygın olarak bulunan 3 ila 10 µm boyut aralığındaki dolgu maddeleri ile hazırlanmış analitik kolonlardan analitleri elüe edebilmek için yüksek basınç sağlayan akışlar kullanmamız gerekmektedir. Bu basınçta genelde atmosfer basıncından daha yüksek olan işletim basınçları söz konusudur. Bu gereksinim için mobil fazı sisteme sürekli gönderecek yüksek basınca dayanıklı pompa sistemleri geliştirilmiş ve bu sistemler yüksek basınçlı sıvı kromatografi sistemleri ismini almıştır.



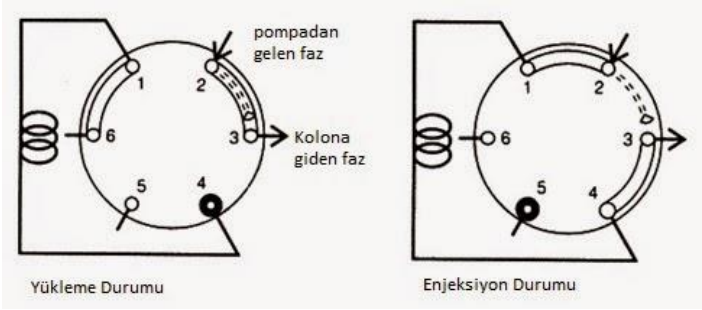
Şekil 1. 6. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazı genel diyagramı

1.18.7.1. Pompa sistemleri

Sıvı kromatografisinde kullanılan pompalar için çalışma şartları genellikle şu şekilde olmaktadır: (1) 6000 psi'ye kadar basıncın üretilmesi, (2) puls önleyici özellikte olması, (3) 0.1 ila 10 mL/dak. arasında değişen akış oranları, (4) Akış tekrarlanabilirliği %0,5 göreceli veya daha iyi ve (5) çeşitli solvent ile korozyon direnci. Yıllar içinde geniş bir yelpazede pompa tasarımı geliştirilmiş olmasına rağmen, 1980'lerden beri hemen hemen tüm LC pompaları, pistonlu pompanın çalışma prensibi ile çalışmaktadır.

1.18.7.2. Enjeksiyon sistemleri

Bir elastomerik septum içerisindeki şırınga enjeksiyonu sıvı kromatografisinde sıklıkla kullanılmasına rağmen, bu prosedür çok tekrarlanabilir değildir ve yaklaşık 1500 psi'den daha düşük basınçlarla sınırlandırılmıştır. Enjeksiyonda, mobil faz akışı anlık olarak durdurulur, numune doğrudan bir şırınga yardımıyla kolonun girişine enjekte edilir. Şırınga enjeksiyonu, basitliği nedeniyle önemli miktarda kullanım alanı olması dolayısı ile sıvı kromatografisinde numune girişinin en yaygın kullanılan yöntemidir, Şekil 1.7.'de örnekleme valfin çalışma prensibi gösterilmektedir.



Şekil 1. 7. HPLC örnekleme valfinin çalışma prensibi

Bu cihazlar çoğunlukla modern sıvı-kromatografi ekipmanının ayrılmaz bir parçasıdır ve 5-500 µl arasında değişen numune boyutları seçilebilmesini sağlayan değiştirilebilir helezon şeklinde numune hazneleri (loop) içerir. Sistem iki farklı konumda çalışarak yükleme ve kolona gönderme için farklı zamanlama imkânı sağlar ve bu şekilde numune bulunduğu kaptan (vialden) sisteme aktarılmış olur.

1.18.7.3. Kolonlar

Sıvı kromatografi kolonları genellikle paslanmaz çelik borudan imal edilmektedir. Ağır cam boru bazen düşük basınç uygulamaları (<600 psi) için kullanılırken, çoğu kolon, 10-30 cm arası uzunlukta paslanmaz çelikten imal edilir ve iç çapları 4 ila 10 mm arasında, tipik olarak partikül boyutlarında kolon dolgusu ile 5 veya 10 µm'dir. Son zamanlarda, iç çapı 1 ila 4.6 mm ve uzunluğu 3 ila 7,5 cm olan yüksek performanslı mikro kolonlar mevcuttur. 3 veya 5 µm'lik partiküllerle dolgulanmış bu kolonlar, dakikada 10.000 teorik plaka sayısı ihtiva eder ve hız ve minimum solvent tüketimi avantajlarına sahiptir.

Sıvı kromatografisi için en yaygın dolgulama şekli, silika partiküllerinden hazırlanır. Kullanılan silika partiküller genellikle yüzeyde kimyasal olarak veya fiziksel olarak bağlanan ince organik bir film ile kaplanır. Diğer dolgu malzemeleri, alümina partikülleri, gözenekli polimer partikülleri ve iyon değiştirici reçineleri içerir. Retensiyon mekanizmasının, molekülün lipofilik bölümünün sabit faza bölünmesinden kaynaklandığı ters fazlı bir dolgu olan oktadesil silan (ODS) kaplı silika jel şeklinde üretilmektedir. Silika jel ve ODS kaplı silika jel, sırasıyla normal ve ters faz kromatografi uygulaması için en yaygın kullanılan dolgu maddelerinden ikisidir. Ancak son yıllarda organik polimerlere dayanan sabit fazın kullanılmasına rağmen, çoğu silika jel yüzeyinin kimyasal modifikasyonunu temel alan çeşitli normal ve ters faz kolonları mevcuttur. Bir bileşiğin tutunma derecesi öncelikle silika jel durumunda polaritesine ve öncelikle ODS silika jel gibi bir ters fazlı dolgudaki lipofilik özelliklerine bağlı olacaktır. Çoğu antibiyotik molekülünün hem lipofilik hem de polar grupları vardır. Belirli bir bileşiğin sabit fazdan ayrı olarak tutunma derecesine göre düşünülmesi gereken diğer faktör mobil fazın niteliğidir. Daha polar bir mobil faz, polar yoğunluktaki bir molekülü daha hızlı bir şekilde bir silis jel kolondan elue ederken apolar bir bileşiği lipofilik bir mobil faz ters faz kolonundan daha hızlı elue edebilmektedir.

1.18.7.4. HPLC dedektörleri

İdeal HPLC dedektörü, yüksek hassasiyet, evrensel veya spesifik tepki, geniş doğrusal dinamik aralık, minimum bant genişlemesi, sıcaklık veya akış hızı ile istikrarlı bir yanıt sağlamalıdır. Şu anda, hiçbir dedektör numunenin bu gerekliliklerin tümünü karşılayabilmektedir. HPLC dedektörleri, analitin kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre bulk veya çözelti özellikli dedektörler olarak sınıflandırılmıştır;

Bulk özellikli dedektörler: Yığın özellikli dedektörler olarak da adlandırılabilmekte olup, analiz edilecek parametrenin mobil faz akışı sırasında yüksek konsantrasyonlarda seyretmesi gerekmektedir. Örnek olarak; bal numunelerinde şeker profilinin tespiti bu özellikte bir dedektör gereksinimi duymaktadır. (Refraktif indeks, dielektrik sabiti dedektörü, yoğunluk dedektörü buna örnek dedektörler olarak ön plana çıkmaktadır.) **Çözelti özellikli dedektörler ise;** örneğin UV veya görünür bölge absorpsiyonu, floresans veya difüzyon akımı ölçen dedektörler örnek olarak verilebilir. Bunun yanı

sıra; **Kütle hassasiyetine ve konsantrasyon duyarlılığına göre cevap veren dedektörlere örnek olarak**: Kütle hassas dedektörü, birim zamana kadar geçen çözünen kütlesine tepki verir ve bu nedenle mobil fazın hacim akışından bağımsız olarak çalışmaktadır. **Spesifik ve Özgül Dedektörler** ise belirli bir türe veya belirli bir kimyasal gruba tepki vermektedir. Örnek olarak floresans dedektörü sadece floresans ışıma yapan maddelere cevap veren tipik bir dedektördür. Sıvı kromatografik ayrımlarda kullanılan yaygın dedektörler genel olarak, UV / Görünür Bölge veya DAD dedektörler, floresans dedektörler, kızılötesi spektrometre dedektörler (IR), elektrokimyasal dedektörler, radyoaktif dedektörler, iletkenlik dedektörleri, dielektrik sabiti dedektörleri, refraktif indeks dedektörleri (kırılma indisi dedektörleri), yoğunluk dedektörleri, transport dedektörler, nükleer manyetik rezonans dedektörleri (NMR), kütle spektrometresi dedektörleri, evaporative light scattering dedektörler, sirküler dikroizm (kiral bileşik dedektörü) dedektörleridir (Scot, 1996, Skoog ve ark., 1998).

1.18.8. Ultra performanslı sıvı kromatografi–UPLC

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'nin, son 30 yılı aşkın bir süredir dünya çapında laboratuvarlarda kullanılan baskın bir teknoloji olduğu kanıtlanmıştır. Bu tekniğin gelişmesinin başlıca etkenlerinden biri de ayrımları gerçekleştirmek için kullanılan kolonlardaki dolgu malzemelerinin gelişimi olmuştur. Bu evrimin temelini oluşturan ilkeler, Van Deemter denklemi ile yönetilmektedir. Van Deemter denklemi doğrusal hız (akış hızı) ile plaka yüksekliği (HETP veya kolon etkinliği) arasındaki ilişkiyi açıklayan ampirik bir formüldür ve partikül boyutu, değişkenlerden biri olduğu için Van Deemter eğrisi, kromatografik performansı araştırmak için kullanılabilir. Ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC), yüksek akış hızlarında kromatografik ayrımı artırmak için kromatografinin prensiplerini yeniden tanımlayan bir analitik tekniktir. Aynı zamanda üstün çözünürlük ve hassasiyet elde etmeyi amaçlamaktadır.

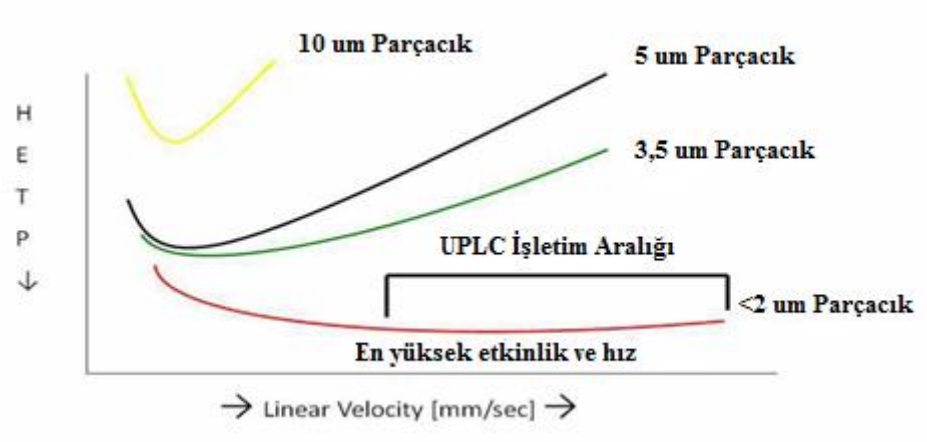
UPLC, sabit faz parçacık boyutundaki bir azalmanın herhangi bir kromatografik işleme maksimum fayda sağlayacağının fark edilmesi ile geliştirilmiştir. 2 μm ve daha düşük partiküller ile doldurulmuş HPLC kolonları kullanıldığı zaman mobil faz pompalarken karşılaşılan sistem basıncında büyük artışlara neden olmaktadır. Geleneksel HPLC sistemleri tipik olarak küçük partikül kromatografisi ile sağlanan basınçlar altında çalışamazlar. Bu sebepten bu tip kolonlar ile kullanılan pompa ve oto örnekleyici

sistemler (basınca dayanıklı) geliştirilmiş ve buna UPLC sistemleri ismi verilmiştir. UPLC, yüksek mekanik dayanıma sahip, 2 µm altında partiküller ile doldurulmuş kolonlarla çalışan kısa süreli analizi imkânı sağlayan yüksek çözünürlüklü bir sistemdir (Swartz, 2005, Jerkovich ve ark., 2005).

1.18.9. UPLC prensibi

Van Deemter denklemine göre, parçacık boyutu 2 µm'den daha düşük bir seviyeye düştüğünde, verimlilikte önemli bir kazanç sağlamakla kalmaz, aynı zamanda artan akış hızlarında veya doğrusal hızlarda verimlilik de düşmemektedir.

$$H = A + B\mu + C\mu$$



Şekil 1. 8. Van Deemter grafiklerinde, kolon dolgu maddesi parçacık boyutunun etkisi

Van Deemter denklemi, hareketli doğrusal hız (µ) ve kolon etkinliği (HETP veya H) arasındaki ilişkiyi açıklayan ampirik bir formüldür. Van Deemter grafiği, Van Deemter denkleminin prensiplerini gösterir ve kolon verimliliğinin en üst düzeye çıkartılacağı mobil faz akış oranını öngörmek ve belirlemek için kullanılabilmektedir. Parçacık çapı HETP'yi önemli ölçüde azaltabilir ve daha yüksek ayırma verimliliği sağlayabilir. Büyük parçacıklı kolonlarda görülen akış hızının artması ile ayrımımın kötüleşmesi 2 µm altındaki partiküller ile üretilmiş UPLC kolonlarda görülmemektedir. Bu durum, metot geliştirirken yüksek akışlarda verimliliği kaybetmeden daha kısa analiz sürelerine sahip analiz metotları yaratma imkânı sağlamaktadır. Temel çözünürlük (Rs) denkleminin gözden geçirilmesi, kromatografik çözünürlüğün kolon verimliliğinin kareköküyle doğru orantılı olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Çözünürlük, teorik plaka

sayısının (N) karekteriyle orantılıdır, ancak N, parçacık boyutuna (dp) ters orantılı olduğu için**: (N α 1/ dp)**

Partikül çapının düşmesi verimliliği arttırmakta buda genel çözünürlüğü olumlu etkilemektedir. Parçacık boyutu, örneğin 5 µm (HPLC ölçeği) ila 1,7 µm (UPLC ölçeği) arasında üç faktör düşürüldüğünde, N üç artırılır ve üç veya 1,7 faktör kareköklü çözünürlüğü yükseltir**: (N α 1/ w2)**

Pikler ne kadar dar ise, birbirlerinden ayrılmaları daha kolaydır. Ayrıca, tepe yüksekliği tepe genişliği ile ters orantılıdır**: (H α 1/*w*)**

Parçacık boyutu N'yi ve daha sonra Rs'yi arttırmak için azaldığından, daha dar pikler daha uzun tepeler olduğundan hassasiyet artışı elde edilir. Gradyan ayrımlarında daralan tepeler, birim zamanda daha fazla tepe kapasitesi anlamına gelir. Dahası, van Deemter teorisi, maksimum ayrılma verimlerine karşılık gelen optimum akış hızı (Fopt) ve parçacık boyutu düştükçe artmaktadır**: (Fopt α 1/dp)**

Van Deemter grafiğinden görülebileceği gibi parçacık boyutu düştükçe karşılık gelen HETP de azalır; bu da daha yüksek verimlilik sağlar. Van Deemter denkleminde, en yüksek verimlilik, daha büyük parçacıklara kıyasla daha küçük partiküller ile daha geniş akış yelpazesi aralığında mevcuttur. UPLC'de kullanılanlar gibi 1,7 µm sabit faz partikülleri kullanırken, elde edilen Van Deemter aralığı, daha büyük parçacıklara göre daha düşük bir HETP sergilemekle kalmaz aynı zamanda daha geniş bir doğrusal hız aralığı üzerinde çalışma imkânı sağlar. Sonuç olarak, akış hızı veya analiz hızı, çözünürlüğü ödün vermeden optimize edilebilir. Bu, 5 µm'den, 1,7 µm parçacıklara geçildiğinde, yalnızca kolon uzunluğunun faktör 3 oranında azaltılmasının yanı sıra, ayrımın akış hızının üç katında da gerçekleştirilebileceği anlamına gelir. Geri Basınç (Backpressure), akış hızı ile orantılı olduğundan, küçük partikül elde etmek için yüksek tepe kapasitesi ayrımları, bugünkü sistem tasarımlarının ötesinde yüksek geri basınçlarda çalışabilen tam olarak yeniden tasarlanmış HPLC sistemlerini gerektirir. Artan hızdan, üstün çözünürlükten ve küçük parçacıkların sağladığı duyarlılığın tümünden yararlanmak için, cihaz teknolojisi tamamen yeniden tasarlanmalıdır. UPLC Kolonlarının sağladığı dar pikler ile çalışırken endişelerden biri MS ve MS/MS data toplama hızının kromatografik olarak örtüşebilmesidir. Bir saniyeden daha kısa yarım yükseklik genişliklerine sahip analit tepe noktalarını doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde

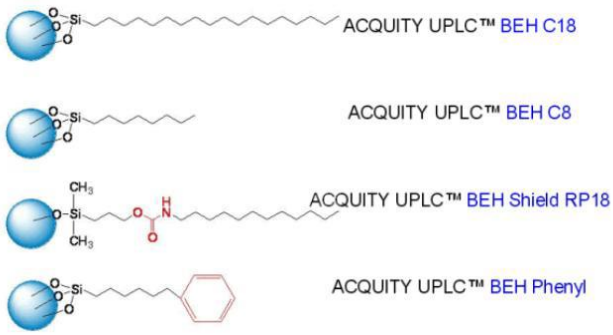
ölçmek için, hızlı veri toplama yeteneğine sahip algılama sistemleri gerekmektedir, bu tür dar pikler arasında yeterli veri noktalarını yakalamak için örnekleme oranlarının yeterince yüksek olmasını sağlamak önemlidir. Bu yüzden UPLC sistemler ile kombine edilecek dedektör istemlerinin data toplama hızlarının birim zamanda çok yüksek olması gerekmekte ve pik olarak adlandırılabilecek yükseltilerde maksimum data noktası verebilmelidir.

1.18.10. UPLC enstrümanları / sistemleri

Çalışmada kullanılan AQUITY UPLC, ikili bir solvent yöneticisi, oto örnekleyici (kolon fırını dahil), dedektör ve isteğe bağlı numune organizatöründen oluşmaktadır. İkili solvent yöneticisi, yüksek basınç altında karıştırılmış bir paralel ikili gradyanı sağlamak için iki ayrı seri akış pompası kullanır. Dört çözücüye kadar seçim yapmak için çözücü seçme valflerinin yanı sıra dahili bir çözücü alanı da vardır. 2 µm altındaki partiküllerden tam olarak yararlanmak için 15000 basınç sınırı (yaklaşık 1000 bar) vardır. Oto örnekleyici sistemi kolon ısıtıcısını da kontrol eder. Kolon sıcaklıkları 65°C'ye kadar ulaşılabilmektedir. Ölü hacmi azaltmak için kolon çıkışı ile MS arası mesafe minimum olacak şekilde tasarlanmıştır. Enjeksiyon döngü süresi, yıkamaya gerek duyulmaksızın 25 saniyedir ve bulaşmayı azaltmak için kullanılan çift yıkamalı sistemin çalışma süresi ortalama 60 saniyedir.

1.18.11. UPLC kolonları

UPLC ayrımlarının potansiyel hızını, hassasiyetini ve çözünürlüğünü tam olarak sağlayabilmek için yeni basınç toleranslı ters faz parçacığı geliştirilmiştir. Yüksek mekanik mukavemetli, son derece küçük, verimli parçacıkların üretilmesi mevcut HPLC kolon teknolojisinin performans standartlarını aşmaya olanak tanımaktadır. Waters firması, UPLC için gerekli mekanik dayanıklılığı sağlamak adına ikinci nesil köprülü etil hibrid (BEH) teknolojisi geliştirdi ve silis matriksindeki metil gruplarını köprü kurdurarak tasarlanmış ve mekanik stabiliteleri arttırılmıştır dolgu maddelerine farklı fonksiyonel gruplar bağlayarak 1,7 µm çapındaki parçacıklardan oluşan UPLC kolonlarını üretti. Çalışmada kullanılmış olan ve UPLC kolon sabit fazlarına örnek teşkil eden Aquity UPLC BEH kolonlarının bazıları Şekil 1.9.'da verilmektedir.



Şekil 1. 9. ACQUITY UPLC kolonları

1.18.12. UPLC dedektörleri

HPLC'de kullanılan dedektörler UPLC'de de kullanılabilmesine rağmen UPLC sistemleri ile kullanılan en verimli dedektör türleri Kütle Spektrometresi (MS) ve diyot dizili spektrofotometre dedektörleridir. Gelişmiş seçicilik ve hassasiyet LC-MS'i hem nicel hem de nitel analizlerin en ileri teknolojisi yapmıştır. Bununla birlikte, giderek artan sayı ve gelişmedeki bileşiklerin çeşitliliği ve analiz gerekliliği, biyolojik matrikslerin karmaşık yapısına bağlı olarak test edilme zorluğu, yeni analitik prosedürler ve teknoloji gereksinimlerini doğurmaktadır. Bu gereksinimler kalitatif ve kantitatif sonuç verebilen UPLC gibi hızlı bir teknikle kombine edilebilen bir dedektör seçimliliğini zorunlu hale getirmiştir. UPLC-MS/MS tekniği günümüz laboratuvar ihtiyaçlarını bu kapsamda karşılayabilmektedir.

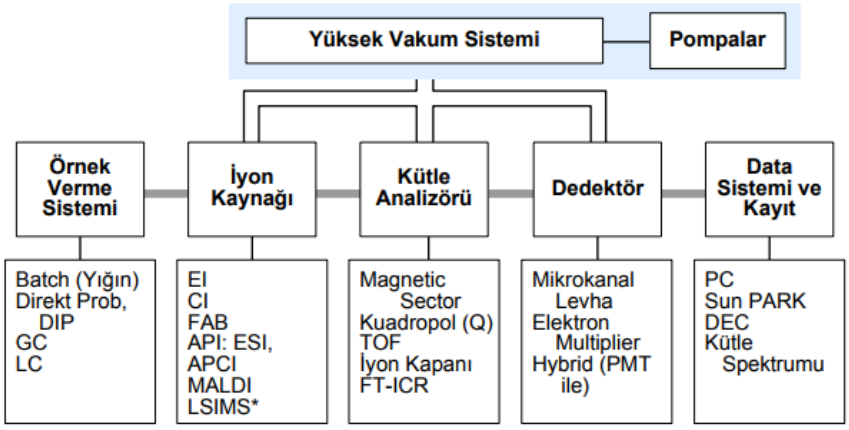
1.19. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi moleküllerin elektron iyonlaşması ve daha sonra parçalanması ve kütle / yük oranı (m / z) belirlenmesi ve iyonların göreceli bollukları ile ilgilidir. Moleküldeki fonksiyonel gruplar parçalanmayı, molekülün yapısını bilerek parçalanma modelini tahmin edebilecek şekilde yönlendirir. Bir kütle spektrometresi, yüklü moleküler parçalar oluşturarak, yüksek vakumda çalışmasını sağlar. İyonize moleküller gaz fazında üretilmelidir. Klasik kütle spektrometresinde, yüklü moleküllerin üretilmesi için sadece bir yöntem vardı, ancak şu anda pek çok alternatif bulunmaktadır. Moleküller yüklendiğinde ve gaz fazında bulunduklarında, molekül ağırlığının ve molekül parçalanmasıyla üretilen herhangi bir parçanın moleküler ağırlığının

belirlenmesini sağlamak için elektrik veya manyetik alanların uygulanmasıyla manipüle edilebilir (Brady, 1994, Moffat, 1986).

1.20. MS Enstrümantasyonu

MS'de, analitler iyonize edilir, bazen parçalanır ve daha sonra bir kütle analizörüne yönlendirilir ve burada kütle / yük oranlarına, m / z'ye göre ayrılırlar işlemlerin iyonlaşma sonrasındaki tüm kısmı yüksek vakum altında gerçekleştirilir. Üretilen iyon akımı, orjinal analitin karakteristiği olan ve hem nitel hem de nicel analiz için kullanılabilen bir kütle spektrumu üretmek için m / z oranları karşısında çizilir. Genellikle iyonların z değeri 1'dir, bu nedenle m / z oranı aslında o iyonun kütlesi ile aynıdır. Kütle spektrometrenin parçaları Şekil 1.10.'da şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 1. 10. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri (Beşergil, 2015)

MS sistemlerinde inlet kısmı, katı veya sıvı fazdaki numunenin bileşenlerinin gaz fazında iyonlara dönüşmesini sağlayan ve yüksek vakumlu ortama transferini sağlayan numunenin MS sistemine uygun forma dönüşmesini ve girişini sağlayan birincil kısımdır. İyon kaynağı gaz fazındaki molekülleri iyonize hale getirir ve dedekte edilebilir bir forma dönüştürür, devamında yüksek vakum altında kütle analizörleri farklı formlarda iyonize molekülleri kütle / yük oranlarına göre ayırır. Uygulanan farklı polaritedeki elektriksel alan ile iyonlar analizörler boyunca iyon kaynağından itibaren dedektöre doğru hızlandırılır. Detektör sistemi, iyonların saptanması ve çözünmüş iyonik türlerin her birinin nispi bolluğunun kaydedilmesi için sistemin devamında kullanılır. (Beşergil, 2015)

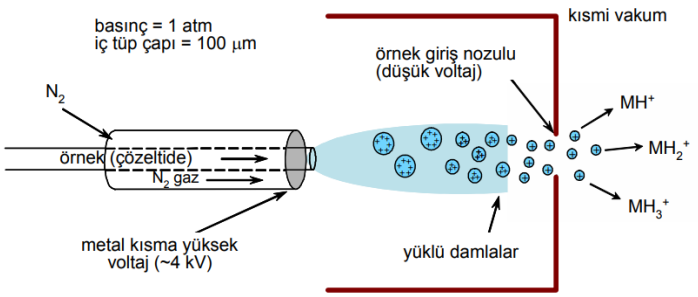
1.21. MS Dedektör İçin İyonizasyon Teknikleri

1.21.1. Termosprey metotlar

HPLC'de kolon sonrası akış (çıkış), düşük basınçlı bir bölgeye (yaklaşık 1 torr) çıkış yapan 400ºC'ye kadar muhafaza edilen bir mikro fırına gönderilir. Isı, çözücü buharının ve numune moleküllerinin ince bir damlacık içeren süpersonik, genişleyen bir aerosol jet oluşturur. Damlacıklar akış esnasında buharlaşır ve fazla olan buhar vakum ile dışlanır. Örnek moleküllerin iyonları, amonyum asetat gibi tamponlar içeren polar hareketli fazlarla kullanıldığında spreyle direkt desorp etme veya kimyasal iyonizasyon yoluyla oluşur. Bilinen bir elektron demeti, çözünen moleküllerin kimyasal olarak iyonlaşması için gaz fazı reaktif iyonları sağlamak için kullanılmaktadır.

1.21.1.1. Elektrosprey iyonizasyonu (ESI)

Atmosfer basıncında çalışırken, sıvı mobil faz, metal bir kılcal borudan, boru ve karşı elektrot arasında 3-6 kV'luk bir potansiyel farkı uygulanarak elde edilen bir elektrik alanına gönderilir. Damlalar, yüzeylerinde yük oluşturur ve buharlaşma ile küçüldükçe, daha küçük düşen damlacıklar haline gelirler. (Beşergil, 2015) Yüklenmemiş çözücü molekülleri pompalanır ve yüklü iyonlar kütle spektrometresine geçer (Şekil 1.11.).



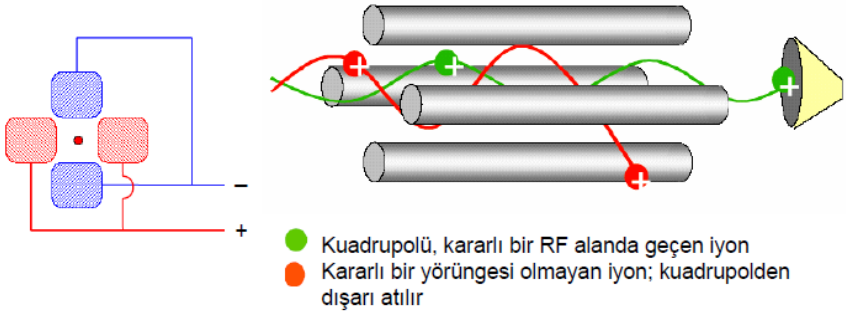
Şekil 1. 11. ESI- LC/MS arayüz diyagramı (Beşergil, 2015)

Kütle analizörlerinin işlevi, iyon kaynağında üretilen iyonları, farklı kütle-yük oranlarına göre ayırmaktır. Analizör bölümü sürekli olarak çok düşük bir vakuma pompalanır, böylece iyonlar atmosferdeki gaz molekülleri ile çarpışmadan dedektöre doğru geçebilir. MS analizörlerine doğru ilerleyen iyonların enerji ve ivmeleri,

analizörlerdeki voltajın hızlandırılması ve mevcut kütlenin sahip olduğu yüke göre belirlenebilmektedir.

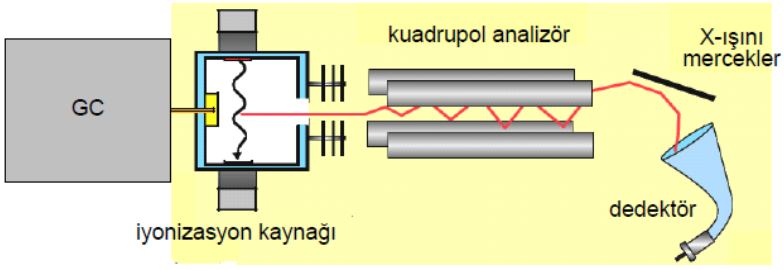
1.21.2. Kuadrupol cihazları

İyonları kendi m / z oranlarına göre ayırmak için bir manyetik alan yerine dik açılarla uygulanan iki elektrik alanı kullanan dörtlü metal çubuklara dayanır. (Beşergil, 2015) Kullanılan alanlardan biri DC, diğeri radyo frekansı olarak salınır (Şekil 1.12.).



Şekil 1. 12. Dört kutuplu bir (kuadrupol) kütle analizörü (Beşergil, 2015)

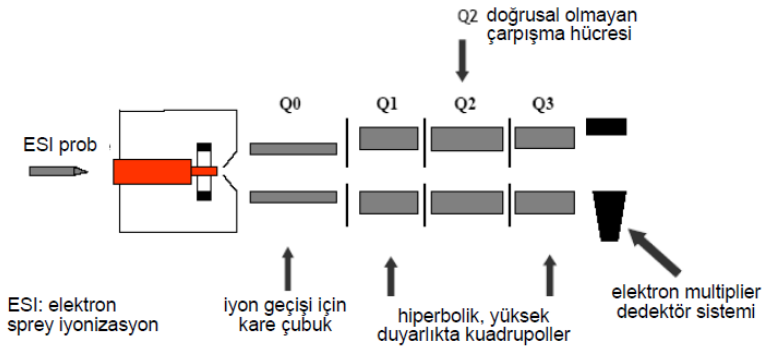
İki elektrostatik alanın dik açılı olarak birbirine uygulanması, rezonans etki yaratarak, her bir m / z değeri için bir farklı bir rezonans frekansı yaratmaktadır, kuadrupol frekansında rezonansa giren iyonlar birbirinden ayrılarak saptanabilir. Böylece, kütle spektrumunun kütle aralığı boyunca iyonlar, dörtlü kutupun rezonans frekansı değiştirildiğinden seçici şekilde saptanmış olur. Kuadrupol enstrüman manyetik bir sektör enstrümanından daha hassastır, çünkü daha geniş bir kinetik enerji yelpazesine sahip iyonları toplayabilir. Basit bir kuadrupol kütle spektrometresinin dezavantajı, iyonları > 0.1 akb'ye kadar çözemezken, bir manyetik alan enstrümanı, iyonları 0,0001 akb veya daha fazla bir seviyeye kadar çözebilir.



Şekil 1. 13. Kuadropol MS sistemin şematik görünümü (Beşergil, 2015)

1.22. Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS)

Bir tandem kütle spektrometresinde çarpışma ile indüklenen dissosiyasyon (CID) kullanılarak elde edilen kütle spektrumu türleri, EI koşulları altında elde edilen kütle spektrumlarına benzer. Tipik olarak, molekülün, moleküler iyonu ilk kuadrupol tarafından seçilir (öncü iyon) (Şekil 1.14.). Seçilen iyon daha sonra çarpışma hücresi olarak işlev gören argon gazı içine sokulan bir ikinci kuadrupol kullanılarak parçalanır. Üretilen parça (ürün iyonları) üçüncü kuadrupol kullanılarak ayrılır (Beşergil, 2015). Bu sistem, tandem MS cihazını tanı işareti bileşiklerinin klinik ve gıda taraması gibi alanlarda çok hızlı bir teknik haline getirmektedir.



Şekil 1. 14. Üç kademeli kuadrupol (TSQ) kütle analizörü (Beşergil, 2015)

1.23. Kütle Spektrometresi Dedektörleri

1.23.1. Electron çoklayıcı dedektör

Elektron çoğaltıcıda, bir iyon demetini, bir elektron demetine dönüştüren bir dönüştürme dinamosu söz konusudur, dedektöre ulaşan her bir iyon elektron salınımı yapar ve sinyal oluşturur. Manyetik bir alan ikincil elektronları dairesel yolları takip etmeye zorlar ve böylece elektronlar ardışık dinodlar vururlar ve sinyali güçlendirirler.

1.24. Tandem MS/MS Sisteminin Avantajları

Kütle spektrometresinin tıp ve gıda alanında kullanımı günümüzde gittikçe artan bir öneme sahiptir. Yüksek hassasiyeti ve güvenilirliği, analiz süresinin kısa olması ve bilgisayar kontrollü programlar sayesinde kütle spektrometreleri artık katkı kalıntı

tespitinde son derece kuvvetli bir analitik teknik haline gelmiştir. MS teknolojilerini avantajları şu şekilde sıralanabilir;

Kısa bir sürede analizin sonuçlanabilmesi, kromatografik ayrıma veya saflaştırmaya gerek kalmadan karışım halindeki örneklerin analiz edilebilmesi, son derece hassas ve güvenilir bir yöntem olması, otomasyona uygun olması ve kısa sürede çok sayıda analiz yapılabilmesi, testlerin çok az örnek miktarları ile çalışılabilmesi, yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların oranının az olması, birçok parametrenin aynı analizde taranabilmesi, maliyet açısından ekonomik olmasıdır.

BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

2.1.1. Bal numuneleri

Araştırma materyali olarak bal numuneleri, yaygın olarak arıcılık yapılan merkezlerden toplanmış ve hiçbir işlem görmemiş çiçek, çam, kestane ve narenciye ballarıdır. Örnek sayısı lokasyonlara bağlı olarak 2016 yılındaki numunelerden olmak üzere 4 adet narenciye, 4 adet kestane, 13 adet çam ve 29 adet çiçek balı olarak toplam 50 örnek şeklinde toparlanmıştır. Numuneler cam kavanozlara alınarak hermetikli olarak kapatılmış ve analizlere kadar kapalı bir ortamda, düşük sıcaklıkta stabil şekilde muhafaza edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan kimyasallar

- Asetik Asit (Merck, Darmstadt, Germany)
- Formik Asit (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Metanol (LC Saflıkta) (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Asetonitril (LC Saflıkta) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Amonyum Format (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Amonyum Asetat (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Disodyum etilendiamintetraasetat dihidrat (EDTA) (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Etanol (HPLC Saflıkta) (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Sitrik Asit Monohidrat (Merck, Darmstadt, Germany)
- Disodyum Hidrojen Fosfat (Merck, Darmstadt, Germany)
- Hidroklorik Asit (HCL) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Sodyum Sülfat (Anhydrous) (Merck, Darmstadt, Germany)
- DMSO (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)

- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Oksalik Asit (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Enrofloksasin-D5 hydrochloride (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Lomofloxacin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Norfloksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Nalidiksik asit (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Oflaksosin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Flumekuin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Sinoksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Sarafloksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Fleroksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Danofloksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Marbofloksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Enrofloksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Siprofloksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Sparfoksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Difloksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Enoksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Oksolinik asit (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Nadifloksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Orbifloksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Pipemidik asit (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Pazufloksasin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Pefloksasin mesylate dihydrate (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)

- Magnezyum Sülfat (Anhydrous) (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Sodyum Asetat (Anhydrous) (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany)
- Sodyum Klorür (Merck, Darmstadt, Germany)
- DisQuE Quechers, 1.5g NaOAc/ 6g $MgSO_4$ (Waters, Milford, Massachusetts, ABD) (186004571)
- **Bond Elut** QuEChERS Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon Kiti (**1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA and 400 mg C18, 15** mL) (Agilent, Santa Clara, ABD) (5982-5158)
- **Siliaquick** Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon Kiti, (**1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA and 400 mg C18, 15** mL) (Silicycle, Quebec City, Kanada) (QD-2006 155)
- Bond Elut QuEChERS Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon Kiti (**1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA, 15** mL) (Agilent, Santa Clara, ABD) (5982-5058)
- DisQuE QuEChERS Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon Kiti (**900 mg $MgSO_4$ and 150 mg PSA, 15** mL) (Waters, Milford, Massachusetts, ABD) (186004833).

2.1.3. Kullanılan ekipmanlar

2.1.3.1. Laboratuvar araçları ve cam materyaller

- Otomatik mikropipet (10 – 100 µl and 100 -1000 µl) (Eppendorf Research Plus Hamburg, Germany)
- pH metre (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)
- Hassas Terazi (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)
- Ultrasonik Banyo (Sonorex RK 154 BH, Bandelin Electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Germany)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich, Rotina 35R Type, Tuttlingen, Germany)
- Vortex karıştırıcı (Labnet VX100, MO BIO Laboratories, Inc., NJ, USA)
- Ultra Saf Su Sistemi (Human, Zeneer Navi UP, Song Pa-Ku, Seoul, Korea)
- Azot Uçurma Sistemi (Biotage, Sweden)
- Buzdolabı (Siemens, Munich, Germany)

- Derin dondurucu (Jounsa Deep Freezer VXE490, Jouan, Czech Republic)
- Balon joje 5-500 mL, (İsolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Cam Uçurma Tüpü (İsolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Cam Beher 50-100 mL, (İsolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Mobil Faz Şişesi 1 Litre, Borosilikat cam (Schott-Duran) (İsolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Falkon vidalı kapak santirfüj tüpü 15 mL (İsolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Falkon vidalı kapak santirfüj tüpü 50 mL (İsolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Vial 2 mL, Amber cam (La-pha-Pack, Germany)
- Vial Kapağı (La-pha-Pack, Germany)
- Şırınga filtresi (PVDF, 0,22 μm) (İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- 2,5 mL'lik steril plastik şırınga (La-pha-Pack, Germany)

2.1.3.2. LC-MS/MS cihazı ve ekipmanları

- UPLC/Tandem MS (UPLC-MS/MS) (Waters, Milford, Massachusetts, ABD)
- ACQUITY Ultra Basınçı Pompa (UPLC) (Waters,Milford, Massachusetts, ABD)
- ACQUITY Oto-Örnekleyici (Waters, Milford, Massachusetts, ABD)
- ACQUITY Kolon Fırını (Waters, Milford, Massachusetts, ABD)
- Xevo Triple Quadruple / ESI İyon Kaynaklı Kütle Spektormetresi Dedektörü (Waters, Milford, Massachusetts, ABD)
- Azot Jeneratörü (Peak Scientific, Glasgow, Scotland)
- Vakum Pompası (Varian HS 602) (Santa Clara, Kaliforniya, ABD)

2.1.3.3. UPLC kolonları

- WATERS, ACQUITY BEH C18 (50 mm × 2,1 mm i.d), 1,7µm Partikül Çapı
- WATERS ACQUITY HSS T3 (75 mm ×2,1 mm i.d), 1,7µm Partikül Çapı
- WATERS, ACQUITY HSS C18 SB (75 mm ×2,1 mm i.d), 1,7µm Partikül Çapı
- WATERS, ACQUITY BEH C18 (100 mm × 2,1 mm i.d), 1,7µm Partikül Çapı

2.1.4. Kullanılan reaktifler ve hazırlanışları

2.1.4.1. Mobil fazların hazırlanması

Mobil Faz A' nın Hazırlanması

1000 mL ultra saf su mezür ile ölçülür. 1 litrelik şişeye konur. Üzerine 50 µl Formik Asit ve 0,5 mL, 1 M Amonyum Format eklenir. İyice karışması için çalkalanır.

Mobil Faz B' nin Hazırlanması

1000 mL MeOH mezür ile ölçülür. 1 litrelik şişeye konur. Üzerine 50 µl Formik Asit eklenir. İyice karışması çalkalanır.

2.1.4.2. Kullanılan reaktiflerin hazırlanması

Kuvvetli yıkama çözeltisi %50 ACN / %50 MeOH)

500 mL MeOH üzerine 500 mL ACN eklenir, 1000 mL' lik kapaklı şişeye konur.

Zayıf yıkama çözeltisi (90/10 USS/MeOH)

100 mL MeOH 1000 mL'lik kapaklı şişeye konu. 900 mL USS mezür ile ölçülür ve eklenir. İyice karışması için çalkalanır.

Seyrelt & Enjekte et Reaktifi (EDTA Mcilvaine Tamponu pH=6,0)

631,5 mL 0,2 M Na_2HPO_4 ve 368,5 mL 0,2 M sitrik asit çözeltisinden alınır ve 1 Litrelik uygun kapaklı bir cam şişeye alınır. İyice karışması için kapağı kapalı durumda iken çalkalanır. 37,25 g EDTA Disodyum tuzu tartılıp, hazırlanan bu 1 Litre tampon çözelti içerisinde çözülür.

Seyrelt & Enjekte et Reaktifi (EDTA Mcilvaine Tamponu pH=5,0)

514 mL 0,2 M Na_2HPO_4 ve 486 mL 0,2 M sitrik asit çözeltisinden alınır ve 1 Litrelik uygun kapaklı bir cam şişeye alınır. İyice karışması için kapağı kapalı durumda iken çalkalanır. 37,25 g EDTA Disodyum tuzu tartılıp, hazırlanan bu 1 Litre tampon çözelti içerisinde çözülür.

Seyrelt & Enjekte et Reaktifi (EDTA Mcilvaine Tamponu pH=4,0)

386 mL 0,2 M Na_2HPO_4 ve 614 mL 0,2 M sitrik asit çözeltisinden alınır ve 1 Litrelik uygun kapaklı bir cam şişeye alınır. İyice karışması için kapağı kapalı durumda iken çalkalanır. 37,25 g EDTA Disodyum tuzu tartılıp, hazırlanan bu 1 Litre tampon çözelti içerisinde çözülür.

%1 Asetik asitli Asetonitril Çözeltisi

495 mL ACN mezür ile ölçülür, kapaklı bir şişeye konur. 5 mL asetik asit yavaşça eklenir kapaklı bir şişede karıştırılır. İyice karışması için çalkalanır.

2.1.4.3. Kullanılan standartların stok ve çalışma standartlarının hazırlanması

Floksasin Ana Stok Standardlarının (S_0) Hazırlanışı – 1000 mg/L (+ 4-8 ^{0}C de 6 ay)

21 adet 15 mL'lik santrifüj tüpü alınır. Her bir floksasin türü için saflık değeri hesaba katılarak (10/P%) Standart Tartım Şablonu'na göre (±0,05 mg) Tablo 2.1.'de belirtilen miktarlarda tartımlar alındıktan sonra, her biri ayrı ayrı santrifüj tüplerine aktarılır. Santrifüj tüplerine alınan kimyasallar Tablo 2.1.'de belirtilen çözücüler ile ultrasonik banyoda çözülür. Daha sonra -18°C' de saklanır.

Tablo 2. 1. Stok standart hazırlama tablosu

Sıra	Analit	Tartılacak miktar	Çözücü Türü	Çözücü Miktarı
1	**Enrofloksasin D-5-IS**	10 mg	DMSO	10 mL
2	**Lomefloksasin**	10 mg	1:1 USS:MeOH	10 mL
3	**Nalidiksik asit**	10 mg	DMSO	10 mL
4	**Oflaksosin**	10 mg	DMSO	10 mL
5	**Flumekuin**	10 mg	MeOH	10 mL
6	**Sinoksasin**	10 mg	1:1 MeOH:1N HCl	10 mL
7	**Sarafloksasin**	10 mg	1:1 MeOH:DMSO	10 mL
8	**Fleroksasin**	10 mg	1:1 MeOH:1N HCl	10 mL
9	**Danofloksasin**	10 mg	1:1 MeOH:DMSO	10 mL
10	**Marbofloksasin**	10 mg	1:1 MeOH:DMSO	10 mL
11	**Enrofloksasin**	10 mg	MeOH	10 mL

Tablo 2. 2. (Devam) Stok standart hazırlama tablosu

12	**Siprofloksasin**	10 mg	0,1 N HCl	10 mL
13	**Sparfoksasin**	10 mg	1:1 MeOH:DMSO	10 mL
14	**Difloksasin**	10 mg	MeOH	10 mL
15	**Enoksasin**	10 mg	1:1 USS:DMSO	10 mL
16	**Oksolinik asit**	10 mg	1:1 MeOH:DMSO	10 mL
17	**Pipemidik asit**	10 mg	DMSO	10 mL
18	**Pazufloksasin**	10 mg	MeOH	10 mL
19	**Norfloksasin**	10 mg	1:1 MeOH:1N HCl	10 mL
20	**Pefloksasin mesylate dihydrate**	10 mg	1:1 USS:MeOH	10 mL
21	**Nadifloksasin**	10 mg	DMSO	10 mL
22	**Orbifloksasin**	10 mg	MeOH	10 mL

Stok Floksasin Mix S_1 Standardının Hazırlanışı (+ 4-8 ^{0}C de 6 ay)(10 mg/L)

15 mL'lik bir santrifüj tüpüne herbir floksasin ana stok standardından (S_0), Enrofloksasin D-5 IS hariç 100 µl alınır ve karışım MeOH ile 10 mL'ye tamamlanır, vortekslenir.

Floksasin Mix S_2 Standardının Hazırlanışı (+ 4-8 ^{0}C de 6 ay)(100 µg/L)

100 µl Floksasin Mix S_1'dan 15 mL'lik bir santrifüj tüpüne alınır. MeOH ile 10 mL' ye tamamlanır, vortekslenir (-18°C) saklanır.

Enrofloksasin D-5 Standardı-S_1 (iç standart) (+ 4-8 ^{0}C de 6 ay) (10 mg/L)

Enrofloksasin D-5 Standardı-S_0 (1000 mg/L) 'dan 100 µl alınır ve karışım MeOH ile 10 mL'ye tamamlanır, vortekslenir (-18°C) saklanır.

Enrofloksasin D-5 Standardı-S_2 (iç standart) (+ 4-8 ^{0}C de 6 ay) (100 µg/L)

100 µl Enrofloksasin D-5 Standardı-S1 15 mL'lik bir santrifüj tüpüne alınır MeOH ile 10 mL'ye tamamlanır, vortekslenir (-18°C) saklanır.

Kalibrasyon ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

Kalibrasyon standartları 0, 1, 2, 5, 10, 20 µg/kg denk gelecek şekilde her gün taze hazırlanır. Bal numunesi hazırlamak için ise 15 mL'lik falcon tüpüne 1 g bal tartılır, tabloda belirtilen miktarlarda reaktifler eklenir. Aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda 15 mL' lik falkon tüpünde karışımlar hazırlanır, vortekslenerek homojenize edilir. Daha sonra şırınga ucu filtreden cam viale süzülüp cihaza verilir.

Tablo 2. 3. Kalibrasyon standartları hazırlama tablosu (seyrelt & enjekte et)

Kalibrasyon Çöz. / Numune Tanımı	**Boş Bal miktarı (g)**	**IS- S_2 (µl) (Enrofloksasin D-5 iç standart)**	**Floksasin Mix S_2 (µl)**	**Ekstraksiyon çözeltisi (µl)**
Blank	1	100	-	7900
1 ppb	1	100	10	7890
2 ppb	1	100	20	7880
5 ppb	1	100	50	7850
10 ppb	1	100	100	7800
20 ppb	1	100	200	7700
Numune	-	100	-	7900

Tablo 2. 4. Kalibrasyon standartları hazırlama tablosu (QUECHERS)

Kalibrasyon Çöz. / Numune Tanımı	**Boş Bal miktarı (g)**	**IS- S_2 (µl) (Enrofloksasin D-5 iç standart)**	**Floksasin Mix S_2 (µl)**
Blank	5	100	-
0,5 ppb	5	100	25
1 ppb	5	100	50
2 ppb	5	100	100
5 ppb	5	100	250
10 ppb	5	100	500
Numune	5	100	-

2.2. Yöntemler

2.2.1. Florokinolonların ballarda tespiti için geliştirilen yöntemler

2.2.1.1. Örnek hazırlama-1 (Dilute & Shoot) (seyrelt-enjekte et)

- 1 g homojenize bal numunesi 15 mL'lik santrifüj tüpüne tartılır. **(± 0,005g)**
- **IS- S_2**'den 100 µl eklenir.
- 7,9 mL ekstraksiyon çözeltisi konur.
- Numuneler ekstraksiyon için, yatay çalkalıyıcıda 2 dakika çalkalanır.
- Tüpten yaklaşık 2000 µl 2,5 mL'lik steril plastik şırınga ile alınır.
- Numuneler, 0,20 µm'lik filtreden geçirilir ve numune kodu önceden üzerlerine yazılmış viallere konur.
- Vialler, otoörnekleyiciye sırası ile yerleştirilir ve **15** µl enjeksiyon UPLC-ESI-MS/MS sistemine verilir.

2.2.1.2. Örnek hazırlama-2 (QuEChERS)

- 5 g ± 0,005 g homojenize bal numunesi 50 mL'lik dereceli santrifüj tüpüne tartılır (± 0,005g).
- 10 mL USS eklenir ve vorteks ile tamamen çözülür.
- 15 mL ekstraksiyon çözeltisi (**1% Asetik Asitli ACN**) eklenir ve numune 2 dakika kadar çalkalanır.
- DisQuE Quecher kiti (**1.5 g Sodyum Asetat ve 6 g $MgSO_4$**) numuneye eklenir ve 1 dakika kadar çalkalanır.
- Numune soğutmalı santrifüjde 7000 rpm, 5 dakika kadar santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası oluşan üst fazdan dikkatlice 10 mL kadar numune, dispersif SPE tüpüne aktarılır (DisQuE QuEChERS Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon Kiti (1200 mg $MgSO_4$ and 400 mg PSA) ve 2 dakika kadar vortekslenir.
- Santrifüj sonunda oluşan berrak çözeltiden 7 mL alınır ve bekletmeden cam uçurma tüpünde azot akımı altında 40 °C'de numune solventi uçurulur.
- Uçurma sonrasında numune üzerine 100 µl USS eklenir ve 900 µl mobil faz A eklenir ve 30 saniye kadar ultrasonik banyoda bekletilir ardından 30 saniye kadar vortekslenir.
- Numuneler, 0,20 µm'lik filtreden geçirilir ve numune kodu önceden üzerlerine yazılmış viallere konur.
- Vialler, otoörnekleyiciye sırası ile yerleştirilir ve **20** µl enjeksiyon UPLC-ESI-MS/MS sistemine verilir.

2.2.2. UPLC / Tandem MS metot final parametreleri

Tablo 2. 5. UPLC metot şartları

Kolon	Acquity UPLC® BEH C18 1,8 µm 50x2,1 mm (Waters-186002350)
Mobil faz A	USS-%0,005 Formik Asit – 0,5 mM Amonyum Format
Mobil faz B	MeOH -%0,005 Formik Asit
Kolon sıcaklığı	40 °C
Otosampler sıcaklığı	4 °C

Tablo 2. 6. (Devam) UPLC metot şartları

Enjeksiyon hacmi	15 µl (Seyrelt & Enjekte et) -20 µl (Quechers)
Enjeksiyon türü	Kısmi loop
Zayıf Yıkama Çözeltisi	800 µl (10/90: USS/MeOH)
Güçlü Yıkama Çözeltisi	600 µl (%50 ACN - %50 MeOH)

Tablo 2. 7. UPLC pompa gradyan programı

Süre dak.	Mobil faz A (A hattı) %	Mobil faz B (B hattı) %	Akış mL/dak.	Eğim
0	90	10	0,4	Başlangıç
1,30	90	10	0,4	6
4,00	60	40	0,4	6
5,00	0	100	0,4	6
6,00	0	100	0,4	6
6,01	90	10	0,4	6
7,00	90	10	0,4	6

Tablo 2. 8. Kütle spektrometresi MS ve tune parametreleri

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

Tablo 2. 9. Geliştirilen metotlar için kantitasyon parametreleri

İntegasyon	Pik alanı
Miktar Tayini	İç standart metodu
Tanımlama	Tutulma zamanı, MRM Minumum 3 kütle 1 tanımlama 2 ölçme için
Kalibrasyon	İç standart ile Altı noktalı kalibrasyon
Kalibrasyon standartları	S0, S1, S2, S5, S10, S20 (Seyrelt ve enjekte et Metodu) S0, S0,5, S1, S2, S5, S10 (Quechers Metodu)
Enjeksiyon	1x15µl (Seyrelt ve enjekte et Metodu) veya 1x20 µl (Quechers Metodu)

Tablo 2. 10. Kütle spektrometresi valf programı

Zaman / Dakika	Durum	Aksiyon
0	Akış durumu	Atık
1,90	Akış durumu	Atık
1,95	Akış durumu	Dedektör
6,30	Akış durumu	Dedektör
6,31	Akış durumu	Atık
7,00	Akış durumu	Atık

Analiz Okuma Süresi : 7 min

Çarpışma Gazı **:** Argon

İyon Seçme Modu **:** Multi Reaction Monitoring (MRM)

İyonizasyon Modu **:** Elektrosprey modu (ESI) pozitif modda görüntüleme yapılmıştır.

2.3. Metot Geliştirme ve Optimizasyon

2.3.1. UPLC kromatografi optimizasyonu

Kromatografik şartların iyileştirilmesi için aşağıdaki başlıklar altında denemeler yapıldı ve karar verilen nihai kromatografik şartlar, Bulgular ve Tartışma bölümünde değerlendirilmiştir;

- Farklı mobil faz modifiye edicileri, farklı konsantrasyonlarda mobil faz içine eklenerek test edildi:

(0,5mM Amonyum Format, 1mM Amonyum Format, 5mM Amonyum Format, 2mM Amonyum Format, %0,005 Formik Asit, %0,005 Asetik Asit, %0,1 Formik Asit, %0,01 Formik Asit)

- Farklı mobil faz akışları test edildi : (0,5, 0,3 ve 0,4 mL /dak.) .
- Farklı sabit faz materyaline sahip kolon ve bu kolonların farklı uzunlukları test edildi (50 mm, 75 mm ve 100 mm uzunluk) (HSS T3, SBC18, (Bridge Ethylene Hybride) BEH-C18 sabit faz materyalleri).
- Farklı gradyan uygulamaları test edildi (A, B, C, D), (Lineer, Konveks, Konkav).
- Farklı kolon fırını sıcaklıkları test edildi (20°C, 30°C ve 40°C).

- Farklı enjeksiyon hacimleri ideal pik şekilleri ve hassasiyeti yakalamak adına test edildi (10 µl, 15 µl, 20 µl).

2.3.2. Tandem MS metot optimizasyonu

Analizde yer alan her bir parametre tekli olarak yüksek konsantrasyonda saf standart olarak hazırlanmış ve tarama numunesi olarak enjeksiyon yapılmıştır. Tarama çalışması ile ana moleküleri iyonları ve parçalanma iyonları tespit edilmiştir. Daha sonrasında MS geçişi belirlenen MRM listesi belirlenmiş her bir bileşen için cone voltaj ve çarpışma enerjisi optimizasyonu yapılmıştır.

2.3.3. Kütle spektrometresi valf program optimizasyonu

Geliştirilen numune hazırlık prosedürlerinden Seyrelt ve Enjekte et prosedüründe numuneye herhangi bir clean-up (Temizleme) işlemi uygulanmadığından ötürü, enjeksiyon yapılan numune, UPLC sistemi ile sağlanan kromatografik ayrımın devamında, MS sistemi girişinde kirliliğe ve tekrarlanabilir olmayan, düşük hassasiyetli analiz sonuçlarının elde edilmesine sebebiyet verebilmektedir. Söz konusu kirliliğe neden olan başlıca materyal, bal matriksinde yoğun miktarda bulunan başlıca makrolardan şeker profilidir. Yoğun miktardaki şeker konsantrasyonu kromatografik ayrım sonrasında direk olarak MS sistemine giriş yaptığında, yüksek sıcaklık ve mobil faz desolvatasyonu sebebi ile öncelikli olarak elektrosprey iğnesinde kalıntıya, tıkanıklığa veya kirliliğe devamında ise iyonların atmosferik basınçtan kurtulup, vakum arayüzüne ilk giriş yaptığı inlet kısmındaki parçalarda (cone) karamelize olmuş bir kirlilik ve kalıntıya sebep olacağı bilinmektedir. Numune hazırlık prosedüründe elenmeyen, şeker ve bunun haricindeki diğer partikül ve girişim yapacak tüm bileşenleri MS dedektörüne ulaşmadan atığa gönderebilmek ve bu sırada tüm kinolon parametrelerinin kolonda alıkonmuş şekilde beklemesi için uygulanan gradyan ile kordinasyonlu şekilde çalışabilecek bir MS valf prosedürü geliştirilmesi elzemdir. Yüksek su içerikli mobil faz gradyan başlangıcı kinolon antibiyotiklerinin kolonda alıkonması ve su ile elüe olabilen tüm maddelerin kolonda tutunmadan MS dedektörüne yönelmesi anlamına gelmektedir. Bu süreç esnasında MS sistemine gömülü ve Waters Masslynx MS yazılımı ile kontrol edilebilen bir valf yardımı ile elüe olan tüm bu maddeler MS'e ulaşmadan atığa gönderilmektedir. Daha sonra valf konumu

değiştirilerek kolondan elue olan kinolon grupları MS sistemine ulaşabilir formata döndürülmektedir. Tüm bu sürecin optimizasyonu için tıpkı mobil faz gradyan programı gibi bir MS valf programı optimize edilmiştir. Bu sayede MS sisteminde yüksek hassasiyetli, tekrarlanabilir analiz imkânı sağlanabilmiştir.

2.3.4. Numune hazırlık optimizasyonu

2.3.4.1. Seyrelt ve enjekte et metodu

Seyrelt ve enjekte et metodu için kullanılacak ekstraksiyon & seyreltme reaktif miktarı ve cinsi araştırılmıştır. Kullanılan reaktifler arasında oksalik asit çözeltisi ile çok düşük pH (1,8), EDTA McIlvaine Tamponları ile farklı pH'larda (4,0, 5,0, 6,0, 7,0) ve %10'luk MeOH çözeltileri ile denemeler yapılmış ve reaktifin cinsi ve pH seviyeleri maksimum sinyal üzerinden değerlendirilmiştir. Eklenecek reaktif miktarları çalışmalarında ise 6,9 mL, 7,9 mL, 8,9 mL, 9,9 mL şeklinde testler uygulanmıştır. (Tüm denemelere eklenecek seyreltme reaktif hacmi, 100 µl hacimde iç standart eklenecek şekilde hesaplama yapılarak planlanmıştır ve uygulanmıştır.)

2.3.4.2. Quechers metodu

Yapılan kinolon analizlerinde daha düşük limitlere inebilmek ve kalıntı görüntüleme metotlarının hassasiyetini arttırmak için başvurulabilecek bir teknik olarak Quechers metodolojisi kinolon analizlerinde alternatif olarak geliştirilmiştir. Numune hazırlık aşamasında bal numunelerinden farklı gamajlar (2g, 5g), farklı ekstraksiyon solventleri (Etil asetat / Asetonitril / asetik asitli Asetonitril) denenmiş olup, uygulanacak ekstraksiyon hacimleri optimize edilmiştir. (10 mL, 15 mL). Clean-up (temizleme) basamağında farklı materyallerin (PSA, C18, $MgSO_4$) farklı gamajlardaki karışımları test edilmiştir.

- Bond Elut QuEChERS Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon Kiti (**1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA and 400 mg C18, 15** mL) (Agilent, Santa Clara, ABD) (5982-5158),
- Siliaquick Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon Kiti, (**1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA and 400 mg C18, 15** mL) (Silicycle , Quebec City,Kanada) (QD-2006 155),

- Bond Elut QuEChERS Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon Kiti (**1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA, 15** mL) (Agilent, Santa Clara, ABD) (5982-5058),
- DisQuE QuEChERS Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon Kiti (**900 mg $MgSO_4$ ve 150 mg PSA, 15** mL) (Waters, Milford, Massachusetts, ABD) (186004833).

  Salting out (Tuz konsantrasyonu ile dışlama) basamağında sabit materyal kullanılıp (**DisQuE Quechers 1.5g Sodyum Asetat/ 6g $MgSO_4$** (Waters, Milford, Massachusetts, ABD) (186004571)), azot uçurma 40 °C' de uygulanmıştır.

2.4. Metot Validasyon Prosedürleri

2.4.1. Seçicilik

Yöntemin özgüllüğü, diğer tüm numunelerin varlığında bir analit konsantrasyonunu doğru bir şekilde ölçebilmesidir. Başka bir deyişle, spesifik metot sadece tek bir analit için bir yanıt üreten bir metot anlamına gelir. Yöntemlerin spesifikliklerinin test edilmesi, florokinolon antibiyotiği içermediği bilinen kör bir numune ile bilinen derişimde florokinolon standardı ile kirletilmiş numunenin karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadan blank numune geliştirilen her iki yöntemle de çalışılmış ve karşılığında yine her iki yöntem ile 10 ppb düzeyinde boş bal numunesi kirletilmiştir. Sistemin seçiciliği farklı matriks türleri ile de test edilmiş olup kestane, çiçek, narenciye ya da çam balı gibi farklı orjinlere sahip bal numunelerinin kinolon antibiyotiklerine kromatografik ve spektroskopik olarak girişim yapıp yapmadığı kontrol edilmiştir.

2.4.2. Aralık ve doğrusallık

Geliştirilen yöntem için aralık ve doğrusallık çalışmaları 21 florokinolon parametresi için minimum ve maksimum görüntülenebilir değerler belirlenerek çalışılmıştır. Quechers yöntemi ile belirlenen loq değeri (0,5 ppb) kalibrasyon aralığı için sıfır haricindeki ilk nokta olarak belirlenirken, maksimum konsantrasyon seviyesi 10 ppb olarak belirlenmiştir. Bu iki değer aralığında çalışılan quechers yöntemi ile geliştirilmiş metot için doğrusallık grafiği (kalibrasyon grafiği) sıfır dahil olmak üzere 6 noktalı şekilde çizilmiş olup, doğrusallık eğrisinde yer alan konsantrasyon noktaları sırası ile Blank-0,5ppb-1ppb-2ppb-5ppb-10ppb şeklindedir. Seyrelt ve enjekte et yöntemi ile

belirlenen loq (1ppb) değeri kalibrasyon aralığı için sıfır haricinden ilk nokta olarak belirlenir iken maksimum konsantrasyon seviyesi 20 ppb olarak belirlenmiştir. Bu iki değer aralığında çalışılan seyrelt ve enjekte et yöntemi ile geliştirilmiş metot için doğrusallık grafiği (kalibrasyon grafiği) sıfır dahil olmak üzere 6 noktalı şekilde çizilmiş olup, doğrusallık eğrisinde yer alan konsantrasyon noktaları sırası ile Blank-1ppb-2ppb-5ppb-10ppb-20ppb şeklindedir. Kalibrasyon grafikleri (doğrusallık çalışmaları) matriks etkisini içerecek şekilde, matriks eşleşmiş (matrix-matched) şekilde çizilmiştir.

2.4.3. Doğruluk

Analitik bir prosedürün doğruluğu, geleneksel bir gerçek değer olarak ya da kabul edilen bir referans değer olarak kabul edilen değer ile bulunan değer arasındaki yakınlığını ifade eder. Bu tezde, doğruluk (accuracy), florokinolon parametreleri için doğruluk geri kazanım (recovery) değerleri üzerinden valide edilmiştir. Kinolon antibiyotiklerinin doğruluk çalışması, her iki ön-hazırlık prosedürü için doğrusallık aralığında belirlenen maksimum, minimum ve orta seviye olmak üzere belirlenen 3 farklı düzeyde 7 tekrarlı çalışmalar yaparak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar, Quechers için 0,5ppb / 2 ppb / 10 ppb konsantrasyonlarında her konsantrasyon seviyesi için n = 7 olacak şekilde numune hazırlanmış ve cihazda okunmuş olup, Seyrelt ve enjekte et metodu için 1ppb / 2 ppb / 10 ppb konsantrasyonlarında her konsantrasyon seviyesi için n = 7 olacak şekilde numune hazırlanmış ve cihazda okunmuştur. Sonuçlardan elde edilen % relatif hata (%RSD), ve yüzde geri kazanım değerleri her iki yöntem içinde ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Bir analitin mutlak geri kazanımı, matrikste eklenen ve matriksten ekstrakte edilen analitin bir miktarından elde edilen dedektör tepkisi için bir karşılaştırmadır. Analiz edilen Florokinolon parametrelerinin tümünün yer aldığı bir sertifikalı referans malzeme (CRM) bulunmadığından geri kazanım çalışmaları kör olarak nitelendirilen içerisinde florokinolon bileşeni bulundurmadığı bilinen bir bal numunesine 3 farklı seviyede bilinen konsantrasyonda kinolon antibiyotikleri ile kirletilmesi sonucu oluşturulan referans malzeme ile gerçekleştirilmiştir. LOQ seviyesinde, doğrusallık grafiği orta noktasında ve yine doğrusallık grafiğinin üst noktasına denk gelecek şekilde 3 konsantrasyonda hazırlanan referans malzemeler ile yapılan analiz sonuçlarına göre geri

kazanım değerleri yüzde değer olarak belirtilmiştir. Metotların doğruluk ve seçicilik derecesi farklı matriks türleri ilede test edilmiş olup kestane, çiçek, narenciye ya da çam balı gibi farklı orjinlere sahip bal numunelerinin kinolon antibiyotiklerinin geri kazanımlarına numune hazırlık basamaklarında ne derece etki ettiği değerlendirilmiştir.

2.4.4. Kesinlik

2.4.4.1. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik

Analitik bir prosedürün kesinliği, aynı homojen numunenin çoklu enjeksiyonundan belirtilen şartlar altında elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki yakınlık (dağılım derecesi) olduğunu gösterir. Analitik prosedürün kesinliği genellikle bir dizi ölçümün varyansı, standart sapması veya varyasyon katsayısı olarak ifade edilir. Bu tezde, kesinlik gün içi tekrarlanabilirlik, analistler arası farklı günlerden oluşan tekrarüretilebilirlik ve sistem tekrarlanabilirliği olarak sunulmuştur. Kinolon antibiyotikleri ile her iki numune hazırlık prosedürü için doğrusallık aralığında belirlenen maksimum minimum ve orta seviye olmak üzere belirlenen 3 farklı düzeyde 7 tekrarlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Quechers için 0,5 ppb / 2 ppb / 10 ppb konsantrasyonlarında her konsantrasyon seviyesi için n = 7 olacak şekilde numune hazırlanmış ve cihazda okunmuş olup, Seyrelt ve enjekte et metodu için 1 ppb / 2 ppb / 10 ppb konsantrasyonlarında her konsantrasyon seviyesi için n = 7 olacak şekilde numune hazırlanmış ve cihazda okunmuştur. Aynı seviyede hazırlanmış standartlar 3 farklı seviye için aynı gün içinde analiz edilip gün içi arası tekrarlanabilirlik test edilmiştir. Ardından, günler arası ve analistler arası tekrarlanabilirliği belirlemek için standartlar ardışık 2 gün için farklı 2 analist tarafından hazırlanmış ve enjekte edilmiştir. Kesinlik değerleri, kinolon bileşenler için her konsantrasyon düzeyinde % RSD değerleri üzerinden değerlendirilmiştir.

2.4.4.2. Sistem tekrarlanabilirliği (sistem uygunluğu)

Sistem tekrarlanabilirliği, aynı çalışma koşulları altında hassasiyeti kısa bir zaman aralığında ifade eder. Sistem tekrarlanabilirliği, aynı zamanda, deneme içi kesinlik olarak adlandırılır. Enstrüman ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği testi, tek bir seviye kinolon standart karışımının (10 ppb seviyesinde, seyrelt & enjekte et metodu ile)

ardarda verilen 10 adet enjeksiyonunu kapsamaktadır. Tamamlanan 10 enjeksiyon sonucunda sistemin verdiği % RSD değeri, sistemin uygunluğu için bilgi vermektedir.

2.4.5. Hassasiyet

Metot validasyonlarında, metodun geçerli kılınması için en önemli parametrelerden olan hassasiyet, çalışmamızda dedeksiyon Limiti (LOD) ve kantitasyon Limiti (LOQ) araştırmaları ile gerçekleştirilmiştir.

2.4.5.1. Dedeksiyon limiti (LOD)

Belirli bir yöntemle tespit edilebilen en düşük miktarda analit algılama limiti olarak adlandırılır. Analitik yöntem doğrulama kılavuzuna göre, LOD, sinyal-gürültü oranının belirlenmesine bağlı olarak bulunmuştur. Kinolonlar için sinyal-gürültü oranı değerleri, standartlarından elde edilen ölçülen sinyalleri başlangıç sinyal seviyesiyle karşılaştırarak gerçekleştirildi. Florokinolonların dedeksiyon limitlerini tahmin etmek için yaklaşık bir sinyal-gürültü oranı 3 kat olarak her iki yöntem içinde sınır olarak tayin edilmiştir.

2.4.5.2. Kantitasyon limiti (LOQ)

LOQ, güvenilir şekilde ölçülebilen analitin en küçük miktarını tanımlar. Kinolonların LOQ seviyelerini belirlemek için 10:1'de sinyal-gürültü oranı sınır olarak tespit edilmiştir.

2.4.6. Sağlamlık (Ruggedness)

Sağlamlık, farklı laboratuvarlar, analistler, araçlar, reaktif veya günler içeren çeşitli koşullar altında elde edilen sonuçların tekrarlanabilirlik derecesidir. Kinolon standartlarının her bir kümesi iki farklı analist tarafından geliştirilmiş iki farklı yöntem için iki farklı cihazda ve iki aynı türden fakat farklı lot numaralı kolon ile analiz edildi ve sonuçların değişkenliği % geri kazanım üzerinden değerlendirmeye alındı. Çalışmalar sırasında 10 ppb düzeyinde floksasin karışım standardı ile kirletilmiş bal numunesi 2 farklı analist tarafından, 2 farklı hazırlık sürecinden geçirildikten sonra, deney materyali olarak kullanılmıştır.

2.4.7. Sağlamlık (Robustness)

Robustness, bir analizin güvenilirliğini, yöntem parametrelerindeki kasıtlı değişmelere göre göstermek için değerlendirilir. Analiz parametrelerinde, kolon fırını sıcaklık değerleri ±10°C (30°C ve 50°C) ve akış oranında ±%10 (0,360 ve 0,440 mL/dak.) olan değişiklikler test edildi. Sonuçların değişkenliği %RSD üzerinden değerlendirmeye alındı. Çalışmalar sırasında 10 ppb düzeyinde floksasin karışım standardı ile kirletilmiş bal numunesi seyrelt ve enjekte et yöntemi ile hazırlık sürecinden geçirildikten sonra, deney materyali olarak kullanılmıştır.

2.4.8. İç standart yöntemi ve seçimi

İç standart, cihaz varyasyonları veya kullanıcının numune hazırlığı esnasında yaptığı bir hata nedeniyle numune konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikleri telafi edebilir. Analitin iç standart pik alanlarına oranı, analitik parametre olarak işlev görür. Çalışmada iç standart olarak tüm floksasin bileşenlerini temsilen enrofloksasin antibiyotiğinin sentetik olarak üretilmiş enrofloksasin-D5 isimli döteryum izotopu denenmiştir. Kromatografik olarak enrofloksasin ile büyük benzerlik gösteren enrofloksasin-D5 bileşeni her numuneye ve kalibrasyon standardına eşit miktarda konarak izotop üzerinden geri kazanım kayıplarını tolere edebilmiştir.

BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bulgular

3.1.1. Balların palinolojik testi

Balların polen analizleri Altıparmak Gıda A.Ş. Araştırma & Geliştirme Laboratuvarı çalışanları tarafından, Altıparmak Gıda A.Ş. Apilab Araştırma & Geliştirme Laboratuvarı / Çekmeköy, Türkiye'de yapıldı. Bal polenleri mikroskobik olarak tespit edildi. Sayım sonucuna göre bala kaynak oluşturan bitkilerin polen oranları ve cinslerine göre numuneler sınıflandırıldı. Bu bağlamda, palinolojik test için her bir örnekten bal numunesi tedarik edildi. Toplanan bu numuneler 1/2 oranında saf su ile homojen hale getirildi ve santrifüjlendi. Oluşan pellet, kurutma kâğıdı yardımı ile süzüldü. Pellet, lama yayılarak kurutuldu ve gliserin jelli boya ile boyanarak polenlerin tanımlanması için preparatlar hazırlandı, mikroskopta incelendi, çalışma sonucunda orjinleri belirlenen bal numuneleri çam, çiçek, kestane ve narenciye balı olarak sınıflandırılmış ve sonrasında geliştirilmiş yöntemlerle analize tabi tutulmuştur.

3.1.2. UPLC kromatografi optimizasyonu sonuçları

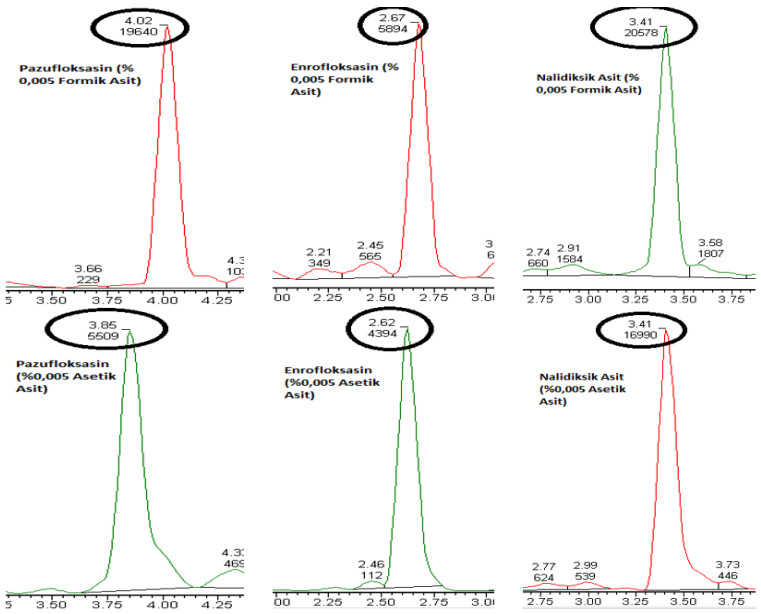
Bu çalışmada, florokinolonların ballarda UPLC ile kromatografik ve kütle dedeksiyonu ile tespitine yönelik farklı parametrelerin etkileri araştırılmış ve incelenmiştir. Böylece optimizasyon çalışmasında UPLC sisteminde mobil fazın içeriğinin, kolon uzunluğunun, mobil fazın akış hızının, numune hazırlık süreçlerinin ve gradyan profili özelliklerinin içeriği ve kombinasyonu en ideal şekilde belirlenebilmiştir.

3.1.2.1. Mobil faz modifiye edicilerin etkileri

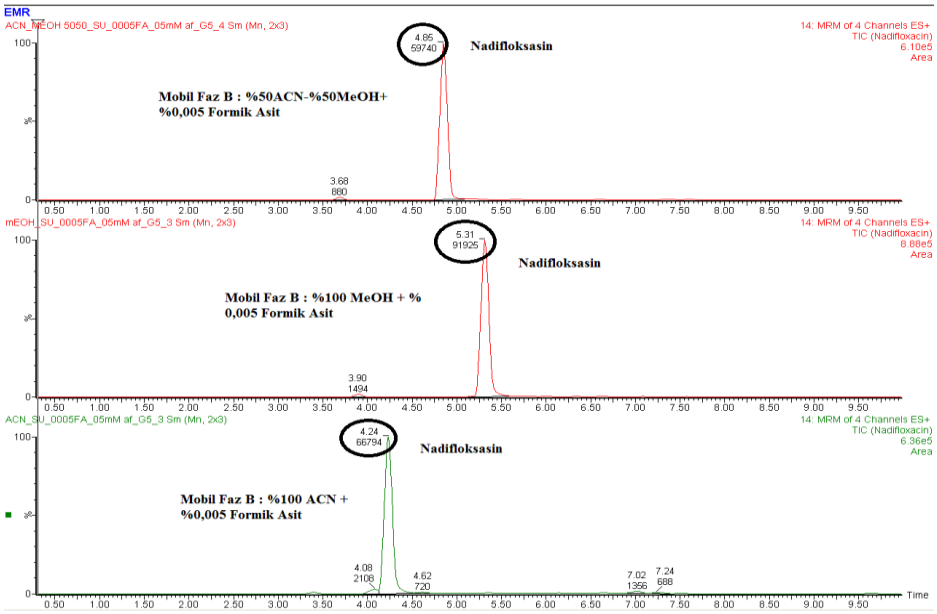
Kullanılan mobil fazlar için modifiye edici ajan olarak amonyum format, amonyum asetat ve asetik asit, formik asit kombinasyonları farklı derişimlerde mobil fazlara eklenerek test edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda elde edilen datalarda pik şekilleri, iyonizasyon derecesinin artması ya da baskılanması ve buna bağlı olarak elde edilen pik alanları, sonuçların tekrarlanabilir olması, alıkonma sürelerindeki değişimler, metanol, su ve asetonitril içerisindeki çözünürlükleri gözlemlenmiş olup, optimizasyon yapılmıştır.

Kullanılan elektrosprey iyonizasyon tekniğinde pozitif polarizasyonun, kinolon türevlerinin iyonizasyonu için daha uygun olduğu tekli standartlar ile yapılan tarama modunda tespit edilmiştir. Pozitif polarizasyonlu iyonlaşma esnasında maddeler hidrojen, sodyum, potasyum veya amonyum gibi katyonlara bağlanarak muhtelif yalancı moleküler iyonlar meydana getirebilmektedir (pseudo molecular ions) (adduct formation). Yapılan tarama çalışmalarında florokinolon antibiyotiklerinin katyonik yalancı iyonlarının, hidrojen adduct üzerinden baskın olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebepten gradyan esnasında kullanılan mobil fazlar için, ağırlıklı olarak gözlenen hidrojen adduct moleküllerinin yaratılması adına hidrojen donör ajanlar mobil faza eklenmelidir. Bunun için LC-MS sistemlerinde uçucu asitlerin seyreltik çözeltileri sıklıkla kullanılmakta olup bilinen en uygun uçucu seyreltik asit ajanları asetik ve formik asittir. Kullanılan su ve metanol gradyanına sırası ile farklı konsantrasyonlarda asetik ve formik asit eklenmiş ve iyonlaşma derecesine olan etkisi gözlemlenmiştir. %0,005 formik asit en yüksek iyonlaşma sinyali ürettiğinden, final asit modifiye edici olarak seçilmiştir. Ayrıca zayıf mobil faz olarak kullanılan su, metanol ve asetonitril ile farklı gradyan uygulamaları ile değerlendirilmiştir. Asetonitrilin piklerin etkinliğini arttırdığı, bant genişliğini azalttığı, sistem geri basıncını düşürdüğü ve analiz süresini kısaltabildiği gözlemlenmek ile birlikte kinolonların kromatografik ayrımına olumlu etki yapmadığı, elüsyon gücünün metanole göre fazla olması dolayısı ile bakılan 21 parametreden birkaç kinolon antibiyotiğinin alıkonma sürelerinin eş zamanlı olması ve spektroskopik ayrım haricinde özgüllüğü destekleyici parametrelerden olan kromatografik ayrıma olan negatif etkisi ve de bazı analitlerin pik alanlarında düşüşe sebep vermesi dolayısı ile metanolün daha uygun bir gradyan çözücüsü olduğuna karar verilmiştir. Kullanımına karar verilen tamponlar içinde metanol, asetonitrile göre daha iyi bir çözücü ortamı sağlamaktadır. Gradyan sistemleri kullanarak, florokinolon pikleri için kapasite faktörü değerleri asetonitril veya metanol değişim yüzdesine göre azalacak veya artacaktır. Kapasite faktörü değerleri ACN kullanıldığında çok düşük MeOH kullanıldığında ise maksimum rezolüsyonu verdiği gözlemlenmiştir. Öte yandan, florokinolonlar için (N) teorik plaka sayısı % ACN arttıkça azalmıştır. Bunun yanı sıra kullanımına karar verilen formik asidin, asidik düzeye getirdiği metanol ve su içerikli güçlü ve zayıf mobil fazların pH değerini tamponlamak, pik simetrisini düzenlemek ve iyonizasyon kabiliyetlerini arttırmak adına her iki faz içinde amonyum asetat ve

amonyum format uçucu tuzlarının düşük konsantrayonlarda ilavesi değerlendirilmiştir. Formik asitle konjuge çift olarak uyum gösteren amonyum format bahsedilen etkileri en uygun şekilde verdiği gözlemlenmiş olup, düşük konsantrasyonlarda (0,5mM) formik asit (%0,005) ile birlikte su ve metanollü fazda kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3. 1. Asetik asit ve formik asit eklentisinin (%0,005), 1 ppb konsantrasyondaki kinolonlara etkisi (alıkonma süreleri ve pik alanlarının karşılaştırılması)



Şekil 3. 2. Mobil faz B'nin organik solvent yüzdesinin optimizasyonu (MeOH ve ACN karşılaştırması)

Tablo 3. 1. Mobil faz modifiye edicilerin kinolon antibiyotiklerinin iyonlaşma derecelerine olan etkileri

Mobil Faz Modifikasyon Denemeleri	**PİK İNTEGASYON SONUÇLARI (ALAN) (10 µg/kg)**						
	Norfloksasin	**Pazufloksasin**	**Pipemidik asit**	**Sinoksasin**	**Flumekuin**	**Oksolinik asit**	**Nalidiksik asit**
% 0,01 Formik Asit	1291	6355	1934	12555	6904	13397	15175
% 0,1 Formik Asit	772	3248	1835	6854	2096	3129	10927
% 0,005 Formik Asit	2553	6402	3289	17459	4497	8747	16607
% 0,005 Asetik Asit	3338	5509	1827	16936	9052	12896	16990
0,5 mM Amonyum Format	1146	1375	2298	9360	19533	46793	60946
% 0,005 Formik Asit + 0,5 mM Amonyum Format	**3631**	**16154**	**14109**	**42516**	**15779**	**41555**	**70571**
% 0,005 Formik Asit + 5 mM Amonyum Format	2238	1719	9538	59117	24549	**64631**	45534
% 0,005 Formik Asit + 2 mM Amonyum Format	3247	963	14889	**52843**	**24432**	46360	43346
% 0,005 Formik Asit + 1 mM Amonyum Format	2643	2243	19158	54621	22312	49965	58533
% 0,1 Formik Asit + 5 mM Amonyum Format	5103	1343	10608	33945	20203	23318	47338
Mobil Faz Modifikasyon Denemeleri	**PİK İNTEGASYON SONUÇLARI (ALAN) (10 µg/kg)**						
	Nadifloksasin	**Enrofloksasin**	**Danofloksasin**	**Lomefloksasin**	**Pefloksasin**	**Siprofloksasin**	**Enoksasin**
% 0,01 Formik Asit	18245	3327	1726	14106	5324	2627	2512
% 0,1 Formik Asit	8377	737	1241	4512	1848	2764	1299
% 0,005 Formik Asit	21375	6180	1970	10352	7946	5174	6182
% 0,005 Asetik Asit	25917	4394	553	13514	6399	3275	4589
0,5 mM Amonyum Format	35006	3178	2045	15483	9553	2340	4629
% 0,005 Formik Asit + 0,5 mM Amonyum Format	**67050**	**5720**	**4512**	**16232**	**11286**	**4430**	**8234**
% 0,005 Formik Asit + 5 mM Amonyum Format	37737	5637	3407	5274	4912	3091	5858

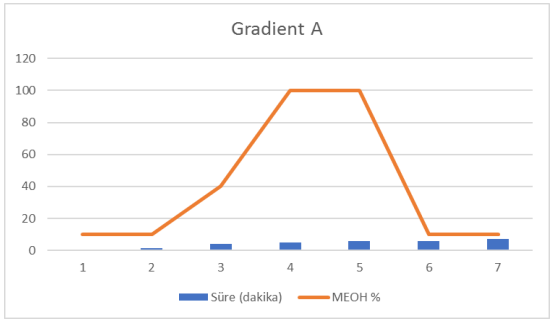
Tablo 3.1. (Devam) Mobil faz modifiye edicilerin kinolon antibiyotiklerinin iyonlaşma derecelerine olan etkileri

Mobil Faz Modifikasyon Denemeleri	**PİK İNTEGASYON SONUÇLARI (ALAN) (10 µg/kg)**						
	Nadifloksasin	**Enrofloksasin**	**Danofloksasin**	**Lomefloksasin**	**Pefloksasin**	**Siprofloksasin**	**Enoksasin**
% 0,005 Formik Asit + 2 mM Amonyum Format	40195	4441	2309	12260	10748	5399	5425
% 0,005 Formik Asit + 1 mM Amonyum Format	53921	**6830**	1237	10482	8845	4930	7750
% 0,1 Formik Asit + 5 mM Amonyum Format	41693	5720	**7069**	8475	**16834**	**7802**	**11289**
Mobil Faz Modifikasyon Denemeleri	**PİK İNTEGASYON SONUÇLARI (ALAN) (10 µg/kg)**						
	Difloksasin	**Orbifloksasin**	**Sparfoksasin**	**Sarafloksasin**	**Fleroksasin**	**Marbofloksasin**	**Oflaksosin**
% 0,01 Formik Asit	4899	1606	3575	4215	14294	8405	7894
% 0,1 Formik Asit	2091	1084	3056	3576	5307	4014	4621
% 0,005 Formik Asit	9708	2077	5640	5838	14134	13136	16869
% 0,005 Asetik Asit	9942	1367	3751	6083	17707	9971	12719
0,5 mM Amonyum Format	10531	7167	6479	5869	25971	17759	16719
% 0,005 Formik Asit + 0,5 mM Amonyum Format	**9593**	**8103**	**5190**	**7058**	**31728**	**25086**	**15049**
% 0,005 Formik Asit + 5 mM Amonyum Format	7482	**9671**	3114	5421	19239	12436	14576
% 0,005 Formik Asit + 2 mM Amonyum Format	13288	6586	3662	5755	30721	14560	**20535**
% 0,005 Formik Asit + 1 mM Amonyum Format	13067	9162	5426	7022	24474	17891	19737
% 0,1 Formik Asit + 5 mM Amonyum Format	**14009**	7834	5409	5613	23116	16417	18123

3.1.2.2. Gradyan profillerinin etkileri

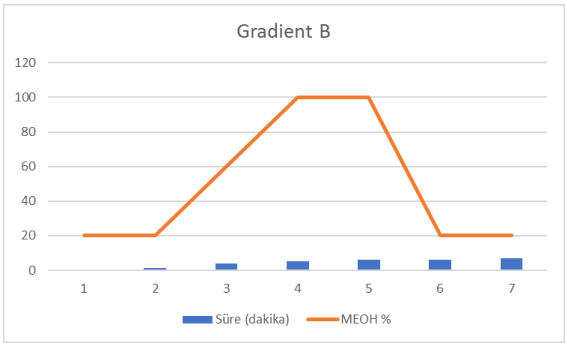
Zayıf çözücü olan su ve kuvvetli çözücü olan metanol ile yapılan gradyan uygulamalar ile en ideal analiz süresinde, en ideal çözünürlükte ve en ideal sinyal büyüklüğünde pikler 21 ayrı florokinolon parametresi için elde edilmeye çalışıldı. Bunun için yapılan profiller A, B, C, ve D isimleri ile Şekil 3.3., Şekil 3.4., Şekil 3.5., Şekil 3.6.'da belirtilmiştir. Uygulanan, lineer, konveks ve konkav gradyan profillerinde en kısa sürede en iyi ayrım elde edilmeye çalışıldı. En ideal analiz süresi 7 dakika olarak tüm parametreler için ortak olarak tespit edildi. Daha sonra test edilen tüm gradyan profilleri için maksimum sinyal oluşturan, bant genişliği minimum, kromatografik ayrımı yeterli pikler en kısa analiz süresinde elde edilmeye çalışıldı. A kodlu gradyan istenilen sinyali en kısa sürede ve en ideal seçicilikte / rezolüsyonda vermiştir.

Süre (dakika)	MeOH %
0,00	10
1,30	10
4,00	40
5,00	100
6,00	100
6,01	10
7,00	10



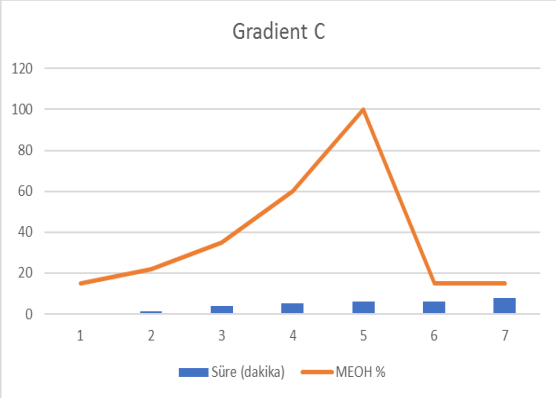
Şekil 3. 3. Optimizasyon çalışmalarında uygulanan gradyan profilleri (A-Lineer)

Süre (dakika)	MeOH %
0,00	20
1,30	20
4,00	60
5,00	100
6,00	100
6,01	20
7,00	20



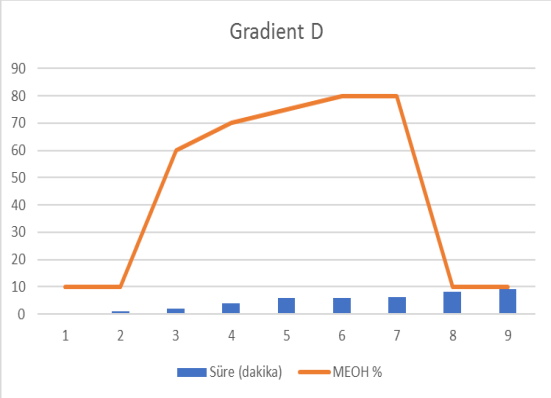
Şekil 3. 4. Optimizasyon çalışmalarında uygulanan gradyan profilleri (B-Lineer)

Süre (dakika)	MeOH %
0,00	15
1,30	22
4,00	35
5,00	60
6,00	100
6,01	15
8,00	15



Şekil 3. 5. Optimizasyon çalışmalarında uygulanan gradyan profilleri (C-Konveks)

Süre (dakika)	MeOH %
0,00	10
1,00	10
2,00	60
4,00	70
6,00	75
6,10	80
6,30	80
8,00	10
9,00	10

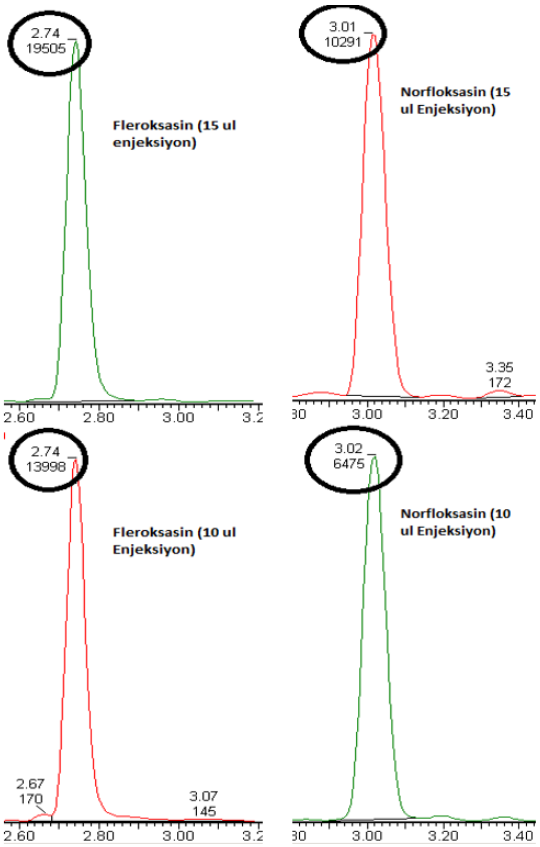


Şekil 3. 6. Optimizasyon çalışmalarında uygulanan gradyan profilleri (D-Konkav)

3.1.2.3. Enjeksiyon hacminin etkileri

Enjeksiyon hacimleri, maddenin konsantrasyonuna ve solvent gücüne göre kromatografik ayrımı ve pik şekillerini oldukça etkileyebilen bir parametredir. Yapılan enjeksiyon hacimleri Quechers ve seyrelt / enjekte et metodu için ayrı ayrı değerlendirilmiş olup, seyreltme metodu için 15 µl, Quecher metodu için ise 20 µl olarak karar verilmiştir. Yüksek miktarda enjeksiyon hacmi pik şekillerinde bant genişlemesine ve kuyruklanmaya sebebiyet vermek ile birlikte pik alanlarında doğrusal bir artışa sebep olmamaktadır. Ayrıca daha fazla numune herhangi bir temizleme işlemi yapılmadığından ötürü daha fazla partikülü kolona gönderebilme riskini taşıdığından yüksek hacimler tercih edilmemektedir. Bu yüzden LC-MS sistemleri için ideal olan 10-20 µl aralığında enjeksiyon hacimleri geliştirdiğimiz metotlar için de uygun

gözükmektedir. Düşük hassasiyeti yakalamak için Quechers yönteminde 20 µl enjeksiyon tercih edilmiş olup, herhangi bir temizleme ön işlemi uygulanmamış olan seyrelt ve enjekte et metodunda 15 µl enjeksiyon hacmi sistemde ve analitik kolonda kirliliğe sebebiyet vermeden yeterli hassasiyeti sağlayabilmektedir.



Şekil 3. 7. Seyrelt ve enjekte et metodu ile gerçekleştirilen floksasin analizinde, 10 ve 15 µl enjeksiyonun karşılaştırılması

3.1.2.4. Mobil faz akışının etkileri

Bu analiz süresi içerisinde akış hızları arttırıp / azaltılarak test edildi ve 7 dakikalık analiz süresinde maksimum sinyal büyüklüğü elde edilecek şekilde uygulanacak MeOH-SU gradyanına karar verildi. Uygulanan akış hızları tablo 3.2'de belirtilmiştir. Daha sonra test edilen tüm akış hızları için florokinolon piklerinin kromatografik parametreleri (Pik asimetrisi, Teorik plaka katsayısı (N), Alıkonma süreleri) hesaplandı. Mobil faz akış hızının UPLC'deki kinolonların analiz performanslarına etkisi, sırasıyla 0,3, 0,4, ve 0,5 mL/dak.'da test edildi.

Gradyan sisteminin akış hızının arttırılması, analit ile kolon katı fazı arasındaki etkileşim süresini azaltacaktır. Sonuç olarak, Floksasin alıkonma süresinin ve teorik plaka sayısının azaltılması akış hızının artmasıyla elde edilmiştir. Fakat yüksek miktardaki akış hızı analiz süresini azaltsada, normal koşullarda yüksek seyreden UPLC sistem basıncının dahada artmasına sebep olacaktır. Buda hem kolon ömrünü hemde metot tekrarlanabilirliğini olumsuz etkileyen bir durum olmaktadır. Aynı zamanda yüksek mobil faz akışı piklerin alanlarında da kısmen azalmalara sebep vermektedir. Bu sebepten analiz süresini fazla uzatmayan, yüksek teorik plaka sayısı oluşturan ve makul bir sistem basıncı veren 0.4 mL /dak.'lık mobil faz akış hızı metot için seçilmiştir.

Tablo 3. 2. Kinolon bileşenlerinin analizinde, akış hızının kromatografik parametrelere olan etkisi

	Nadifloksasin			Enrofloksasin			Danofloksasin			Lomefloksasin		
Akış Hızı (mL/dak)	RT	PA	N	RT	PA	N	RT	PA	N	RT	PA	N
0,3 mL /dak.	5,4	0,9	27462	3,63	0,98	28422	3,56	1,2	27462	3,8	1	21862
0,4 mL /dak.	**5,02**	**1,02**	**23566**	**3,31**	**1**	**25236**	**3,29**	**1,1**	**23566**	**3,33**	**1**	**20236**
0,5 mL /dak.	4,75	1	15426	2,95	1	12436	2,89	1,1	15426	3,01	1,01	16426
RT: Alıkonma Süresi (dak.), PA: Pik Asimetrisi, N: Teorik Plaka Katsayısı												

3.1.2.5. Kolon ve kolon uzunluğunun etkileri

Çalışmada dört faklı özellikte UPLC kolonu C18 fonksiyonel grubu içeren formlarda test edilmiştir. Fiziksel özellikleri bakımından, Kullanılan kolonların tümü aynı iç çapa (2,1 mm i.d) ve aynı parçacık boyutuna (1,7 µm) sahip iken sadece uzunlukları, ancak 50 mm, 75 mm ve 100 mm gibi farklı değerlerdedir. Kolon denemeleri sabit belirlenen analiz parametreleri üzerinden değerlendirildi. Dolgu maddeleri silika tabanlı olmak ile birlikte deneme yapılan kolonlar aşağıdaki gibidir;

- Non-endcapped olarak üretilen HSS SB C18 (75 mm x 2,1 mm i.d.)
- UPLC Acquity BEH C18, 1.7µm (50 mm x 2,1 mm i.d.)
- UPLC Acquity BEH C18, 1.7µm (100 mm x 2,1 mm i.d.)
- UPLC Acquity HSS T3, 1.7µm (75 mm x 2,1 mm i.d.)

Deneme yapılır iken kullanılan kolonların ters faz kolonu olması kinolon antibiyotiklerinin ağırlıklı olarak lipofilik yapıları sayesinde hidrofobik fonksiyonel grup ile disperse olabilmesinden kaynaklanmaktdır. HSS T3 isimli kolon, kinolonların

flor grupları dolayısı ile kazandıkları polar kısmi özelliklerinin alıkonmaya ne kadar etki edeceğini görebilmek için denenmiştir.

Kolon uzukları için kinolonlar oldukça iyi bir alıkonma süresi ve yeterli seçicilik sağlandığından 50 mm'lik uzunluğa sahip kolonlar kısa süreli bir analiz süresini, yeterli rezolüsyonda sağlamaktadır, 75 ve 100 mm'lik kolonlar kromatografik ayrımı (rezolüsyonu) iyileştirseler de sistem geri basıncını arttırmaları, analiz sürelerini uzatmaları, daha yüksek maliyetleri ve yeni gradyan uygulamalar geliştirilmesi gerekliliğiden tercih edilmemiştir. Fonksiyonel grup türü bakımından ise C18 ters faz kolonları yeterli alıkonmayı sağlarken SB C18 daha uzun bir kolon olmasına karşın silikaya bağlı C18 zincir sayısının az olması dolayısı ile yüksek seçicilik göstermemiştir. HSS T3 ise polar bileşenler için daha iyi bir alıkoyma sağladığından, floksasin gibi hidrofobik etkileşimi daha güçlü olan bileşinler için bir avantaj sağlamamaktadır. Farklı kolonlar ile kinolon piklerinin kromatografik parametreleri tabloda hesaplanarak verilmiştir (Tablo 3.3). Kromatografik koşulların optimizasyonundan sonra, UPLC Acquity BEH C18, 1,7 μm (50 mm x 2,1 mm i.d.) en ideal kolon olarak belirlenmiştir.

Tablo 3. 3. Kolon uzunluklarının kromatografik parametrelere olan etkisi

	Difloksasin			Orbifloksasin			Sparfoksasin			Sarafloksasin		
Kolon Uzunluğu (mm)	RT	PA	N	RT	PA	N	RT	PA	N	RT	PA	N
50 mm	**3,5**	**1**	**30176**	**3,42**	**0,98**	**28156**	**3,9**	**1**	**22255**	**3,53**	**1,1**	**27156**
100 mm	5,01	1,1	50217	4,85	1	40568	5,12	1	38968	4,92	1	52138
RT:AlıkonmaSüresi(dak.), PA: Pik asimetrisi, N: Teorik Plaka Katsayısı												

3.1.2.6. Farklı kolon fırını sıcaklıklarının etkisi

UPLC sisteminde analitik kolonun bulunduğu ortamın sıcaklığı analiz süresi, pik şekli, bant genişliği, sistem geri basıncı gibi parametreleri yakından ilgilendirmektedir. Uygulamada tercih edilecek sıcaklığın düşük tutulması, mobil faz akışının vizkozitesini arttıracağından ötürü, sistem geri basıncını arttırmakta fakat alıkonma sürelerini ise ötelemektedir. Sıcaklığın yüksek tutulması ise basıncı azaltacağı gibi alıkonma sürelerinide geri çekmektedir. Ayrıca tüm bunların haricinde analiz edilecek moleküller ile kolon ve mobil faz arasındaki etkileşimlerin de sıcaklık ile değişmesi, dolayısı ile de seçiciliklerin elüsyon sıralarının ve kapasite fktörlerinin de olumlu ya da olumsuz yönde değişmesi söz konusu olmaktadır. Tüm bunlar ışığında oda sıcaklığını temsilen 20°C,

yüksek fakat kolonun dayanma kapasitesini fazla zorlamayacak şekilde olan 40°C ve orta derece olarak 30°C sıcaklıklar deneme sıcaklıkları olarak test edilmiştir. UPLC sistemi olması dolayısı ile en kısa sürede en ideal pik şeklini kabul edilebilir basınçta sağlayan 40°C ideal kromatografik ayrımı sağlamıştır.

3.1.2.7. Tandem MS metot optimizasyonu sonuçları

Analiz metodunda yer alacak olan her bir parametre tekli olarak yüksek konsantrasyonda (10 ppm) ve uygun solventte çözülerek saf standart olarak hazırlanmış ve tarama numunesi olarak enjeksiyon yapılmıştır. Tarama çalışmasında öncelikli olarak parent iyon (ana iyon / precursor ion) tespit edilmiş olup tüm kinolon bileşikleri için yalancı moleküler iyon (pseudomoleculer ion) hidrojen atomu eklenmiş formda en yüksek iyonlaşma derecesini göstermektedir (hydrogen adduct moleculer ion-parent ion). Her bir florokinolon bileşeni için belirlenmiş olan ana iyonlar farklı cone voltaj ve çarpışma enerji gradyanları uygulanarak maksimum sinyal verebildiği değerler tespit edilmiştir.

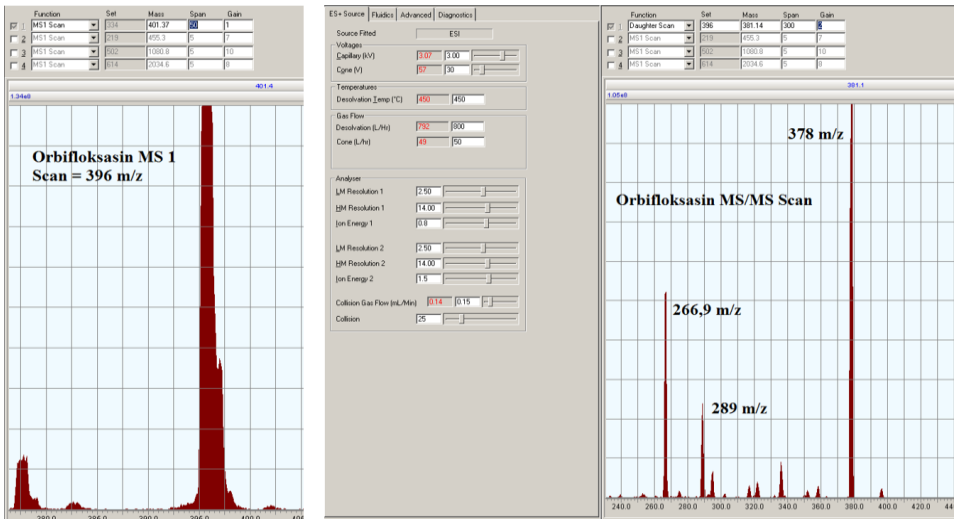
- Uygulanan Cone Voltajlar (10 V, 20 V, 30 V, 40V)
- Uygulanan Collision Enerjileri (Çarpışma Enerjileri) (5,10,15,20,25,30,35,40).

Kinolon ana iyonları argon gazı aktif edilerek parçalanma ürünleri oluşturulmuş ve kantitasyon ve konfirmasyon amaçlı toplamda minimum 3 farklı parçalanma ürünü her bir kinolon ana iyonu için seçilmiş ve MRM metodu 21 farklı kinolon için oluşturulmuştur. Her bir parçalanma ürünü için yukarıda belirtildiği şekilde cone ve çarpışma enerjileri optimize edilmiştir ve MRM metot panosuna işlenmiştir. Tüm parametreler için değişken olan ve karar verilen nihai sonuçlar Şekil 3.9'da belirtilmiştir.

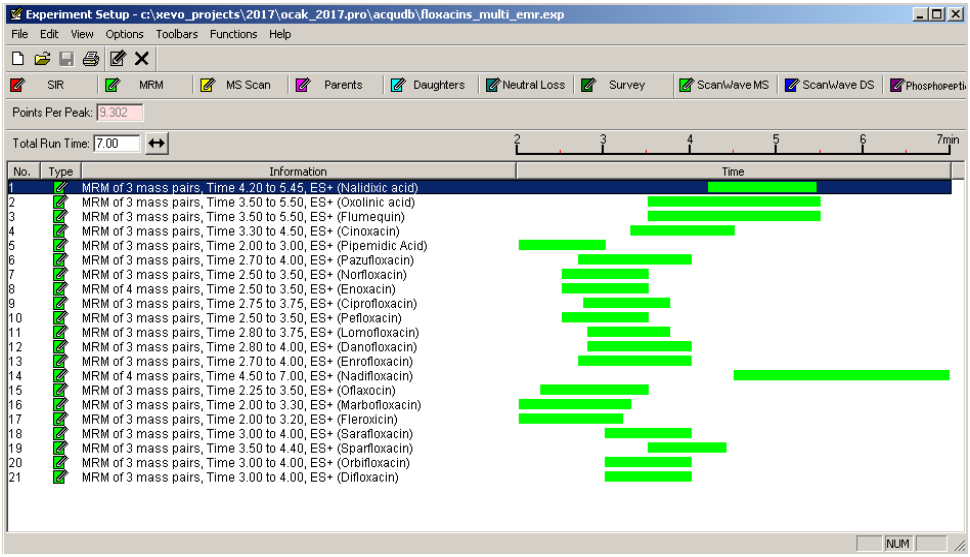
Tüm MRM metodu yazıldıktan sonra ESI iğnesine uygulanan gerilimi belirlemek için tüm bileşenlerin maksimum sinyal verdiği kapiler voltaj değeri belirlenmiştir. Denemelerde, 1 kV, 2 kV, 3 kV değerleri test edilmiş olup, maksimum sinyal 1 kV değerinde elde edilebilmiştir. Kapiler gerilimine ve MRM tablosuna tümü ile karar verildikten sonra, MS metodu için son optimizasyon, desolvatasyon sıcaklığı, desolvatasyon ve nebulizasyon için kullanılan azot gazının birim zamanda akış miktarının optimizasyonudur. Sıcaklık olarak 350°C, 400°C, 450°C, 500°C, Azot akış

hızı ise 900 L/saat, 850 L/saat, 800 L/saat test edilmiş olup, sinyal gücüne fazla etki etmemiştir. 450°C desolvatasyon sıcaklığına ve 850 L/saat akış hızına, metotta kullanmak üzere karar kılınmıştır.

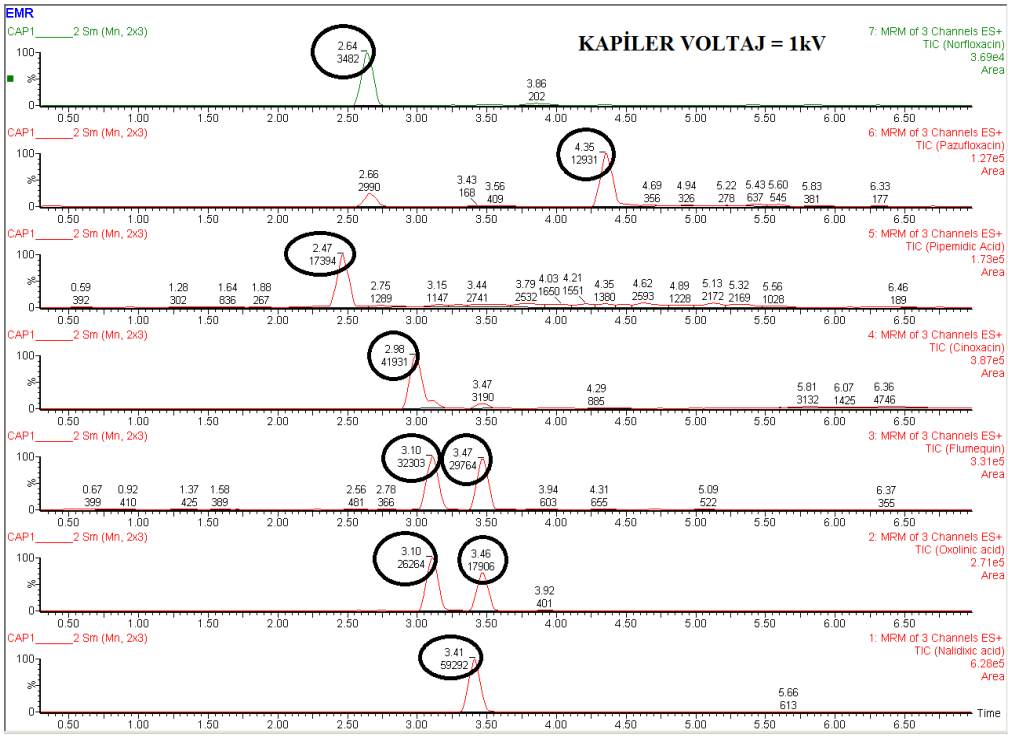
MS dedektörde her bir kinolon analitinin sinyal gücünü arttırmak ve hassasiyeti yüksek bir analiz metodu yaratmak adına MRM panosunda yer alan her bir bileşen için alıkonma süresine göre, yani eş zamanlı olarak kolondan elüe olduktan sonra, MS'te sinyal verdiği dakika üzerinden bir dedeksiyon zaman aralığı belirlenmiş olup, mümkün olan en dar aralık MRM panosuna tarama aralığı (time segment-range) değerleri olarak kayıt edilmiştir. Metot zaman aralıkları Şekil 3.9.'da ve Tablo 3.5.'de belirtilmiştir.



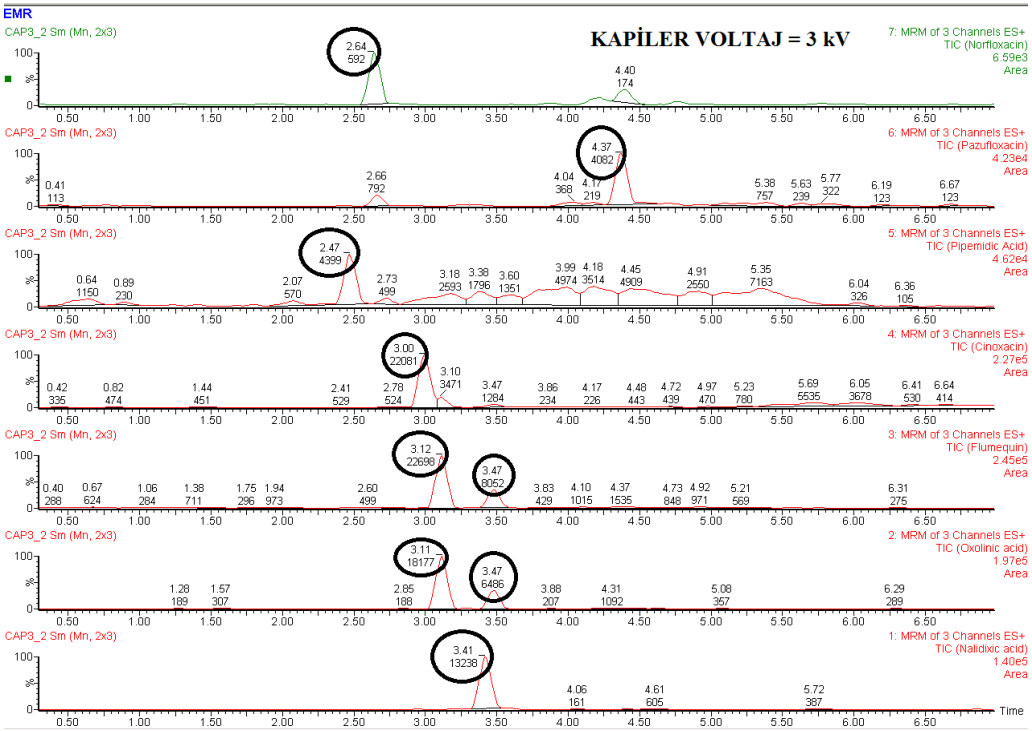
Şekil 3. 8. Orbifloksasin analitik saf standardının, MS 1 ve MS/MS modundaki tarama çalışmaları sonucunda tespit edilen kütle spektrumları



Şekil 3. 9. MRM kütüphanesindeki, kinolon bileşenlerine ait tarama aralığı



Şekil 3. 10. Elektrosprey iğnesine uygulanan 1 kV 'lık gerilim sonucu elde edilen kinolon analitlerine ait kromatogramlar



Şekil 3. 11. Elektrosprey iğnesine uygulanan 3 kV 'lık gerilim sonucu elde edilen kinolon analitlerine ait kromatogramlar

Tablo 3. 4. Kütle spektrometresi MS ve tune parametreleri

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

Tablo 3. 5. ESI-MS metodu için kullanılan kinolon ana ve parçalanma iyonları ve bunlara ait optimize edilmiş cone voltajları ve çarpışma enerjileri

Analit	Ana İyon	Parçlanma İyonu	Dwell (sn) (Otomatik)	Cone Voltajı	Çarpışma Enerjisi	Tarama Aralığı
Enrofloksasin D-5	365	245	0,005	30	25	2,60-4,00
Enrofloksasin D-5	365	316	0,005	30	25	2,60-4,00
Enrofloksasin D-5	365	342	0,005	30	25	2,60-4,00
Lomefloksasin	352	251	0,005	30	25	2,80-3,75
Lomefloksasin	352	265	0,005	30	25	2,80-3,75
Lomefloksasin	352	308	0,005	30	15	2,80-3,75
Nalidiksik Asit	233	159	0,024	30	25	4,20-4,45
Nalidiksik Asit	233	187	0,024	30	25	4,20-4,45
Nalidiksik Asit	233	215	0,024	30	20	4,20-4,45
Oflaksosin	362	261	0,005	30	25	2,25-3,50
Oflaksosin	362	318	0,005	30	20	2,25-3,50
Oflaksosin	362	344	0,005	30	20	2,25-3,50
Flumekuin	262	174	0,005	30	25	3,50-5,50
Flumekuin	262	202	0,005	30	25	3,50-5,50
Flumekuin	262	244	0,005	30	20	3,50-5,50
Sinoksasin	263	189	0,005	30	25	3,30-4,50
Sinoksasin	263	217	0,005	30	25	3,30-4,50
Sinoksasin	263	245	0,005	30	15	3,30-4,50
Sarafloksasin	386	299	0,005	30	25	3,00-4,00
Sarafloksasin	386	342	0,005	30	20	3,00-4,00
Sarafloksasin	386	368	0,005	30	20	3,00-4,00
Fleroksasin	370	269	0,005	30	25	2,00-3,20
Fleroksasin	370	326	0,005	30	20	2,00-3,20
Fleroksasin	370	352	0,005	30	20	2,00-3,20
Danofloksasin	358	283	0,005	30	20	2,80-4,00
Danofloksasin	358	314	0,005	30	20	2,80-4,00
Danofloksasin	358	340	0,005	30	20	2,80-4,00
Marbofloksasin	363	72	0,005	30	25	2,00-3,30
Marbofloksasin	363	320	0,005	30	15	2,00-3,30
Marbofloksasin	363	345	0,005	30	20	2,00-3,30
Enrofloksasin	360	245	0,005	30	25	2,70-4,00
Enrofloksasin	360	316	0,005	30	25	2,70-4,00

Tablo 3.5. (Devam) ESI-MS metodu için kullanılan kinolon ana ve parçalanma iyonları ve bunlara ait optimize edilmiş cone voltajları ve çarpışma enerjileri

Enrofloksasin	360	342	0,005	30	25	2,70-4,00
Siprofloksasin	332	245	0,005	30	25	2,75-3,75
Siprofloksasin	332	288	0,005	30	20	2,75-3,75
Siprofloksasin	332	314	0,005	30	25	2,75-3,75
Sparfloksasin	393	251	0,005	30	30	3,50-4,40
Sparfloksasin	393	292	0,005	30	25	3,50-4,40
Sparfloksasin	393	349	0,005	30	25	3,50-4,40
Difloksasin	400	299	0,005	30	25	3,00-4,00
Difloksasin	400	356	0,005	30	20	3,00-4,00
Difloksasin	400	382	0,005	30	25	3,00-4,00
Enoksasin	321	206	0,005	30	25	2,50-3,50
Enoksasin	321	234	0,005	30	25	2,50-3,50
Enoksasin	321	257	0,005	30	25	2,50-3,50
Enoksasin	321	303	0,005	30	25	2,50-3,50
Oksolinik Asit	262	160	0,005	30	25	3,50-5,50
Oksolinik Asit	262	216	0,005	30	25	3,50-5,50
Oksolinik Asit	262	244	0,005	30	25	3,50-5,50
Pipemidik asit	304	215	0,005	25	30	2,00-3,00
Pipemidik asit	304	258	0,005	25	30	2,00-3,00
Pipemidik asit	304	286	0,005	25	20	2,00-3,00
Pazufloksasin	319	243	0,005	30	25	2,70-4,00
Pazufloksasin	319	281	0,005	30	25	2,70-4,00
Pazufloksasin	319	301	0,005	30	20	2,70-4,00
Norfloksasin	320	233	0,005	30	25	2,50-3,50
Norfloksasin	320	276	0,005	30	20	2,50-3,50
Norfloksasin	320	302	0,005	30	25	2,50-3,50
Pefloksasin	334	233	0,005	30	20	2,70-4,00
Pefloksasin	334	290	0,005	30	20	2,70-4,00
Pefloksasin	334	316	0,005	30	20	2,70-4,00
Nadifloksasin	361	257	0,024	30	35	4,50-7,00
Nadifloksasin	361	283	0,024	30	35	4,50-7,00
Nadifloksasin	361	325	0,024	35	35	4,50-7,00
Nadifloksasin	361	343	0,024	30	25	4,50-7,00
Orbifloksasin	396	266,9	0,005	30	35	3,00-4,00
Orbifloksasin	396	289	0,005	30	30	3,00-4,00
Orbifloksasin	396	378	0,005	30	20	3,00-4,00

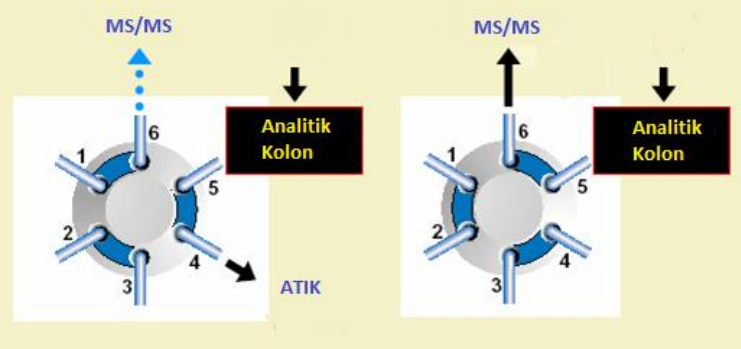
3.1.2.8. Kütle spektrometresi valf program optimizasyon sonuçları

Yapılan valf programı optimizasyonu sonucunda şeker ve diğer suda çözünebilen girişim kaynağı olabilecek maddeler 1,90 dakika süresince atığa gönderilirken, kinolon antibiyotikleri kolonda alıkonmuş şekilde valf programının 2. basamağı olan 1,30. dakikaya kadar analitik kolonda beklemektedir. Devamında 1,90. dakika sonrasında valfin MS'e enjekte etme pozisyonu alması ve eşzamanlı olarak gradyan profilinde metanol konsantrasyonunun artması ile birlikte kinolon bileşenleri MS'te sinyal

verebilecek konumda kolondan elue edilmiştir. Yapılan optimizasyon sonucunda nihai olarak karar verilmiş valf programı Tablo 3.6.'da belirtilmiştir.

Tablo 3. 6. Yapılan optimizasyon sonucu elde edilen MS valf çalışma programı

Zaman / Dakika	Durum	Aksiyon
0	Akış durumu	Atık
1,90	Akış durumu	Atık
1,95	Akış durumu	Dedektör (ESI-MS)
6,30	Akış durumu	Dedektör (ESI-MS)
6,31	Akış durumu	Atık
7,00	Akış durumu	Atık

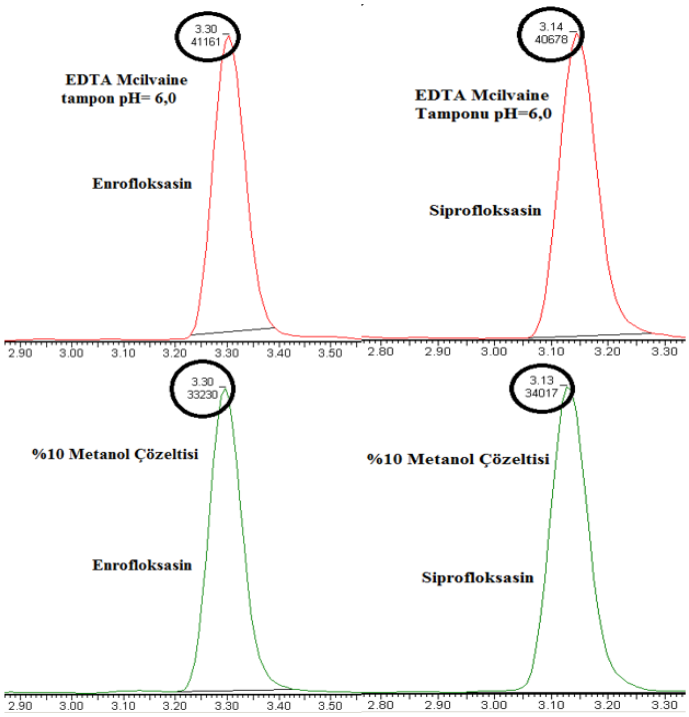


Şekil 3. 12. MS sistemi üzerinde bulunan dağıtıcı valfin çalışma prensibi

3.1.2.9. Seyrelt ve enjekte et metodu optimizasyon sonuçları

Seyrelt ve enjekte et metodu için kullanılacak ekstraksiyon & seyreltme reaktif miktarı ve cinsi araştırılmıştır. Kullanılan reaktifler arasında oksalik asit çözeltisi ile çok düşük pH (1,8), EDTA McIlvaine tamponları ile farklı pH' larda (4,0, 5,0, 6,0, 7,0) ve %10'luk MeOH çözeltileri ile denemeler yapılmış ve reaktifin cinsi ve pH seviyeleri maksimum sinyal ve geri kazanım üzerinden değerlendirilmiştir. Kinolonların numune yapısındaki, kullanılan reaktiflerin ya da mobil fazların yapısında bulunan veya bulunabilecek metaller şelat kompleksleri oluşturarak düşük geri kazanıma sebep verdikleri bilinmektedir. Bu sebepten pH'tan bağımsız olarak kullanılacak reaktifte EDTA antişelatlaştırıcı olarak kullanmak, ekstraksiyon geri kazanım değerlerini arttırmaktadır. Bunun yanı sıra EDTA içeren reaktifin ekstraksiyonun pH değeri açısından da nötre yakın olması kinolonların stabilitesi ve çözelti içinde iyonlaşmasını baskılamak açısından avantaj yaratmaktadır. Kullanılacak reaktif miktarı ise, reaktifin ekleneceği matriks olan balın vizkozitesini, şırınga filtresinden fazla geri basınç

yaratmadan geçebilecek ve otoörnekleyiciler tarafından rahatlıkla, tekrarlanabilir şekilde enjeksiyon yapılabilecek seviyeye getirebilecek miktarda olması gerekmektedir. Seyreltme miktarı dedeksiyon limitini de tolere edebilecek düzeyde olup, fazla miktarlar numuneyi çok seyreltik hale getirip istenilen miktarların dedeksiyonuna engel teşkil edebilmektedir. Tüm bunların ışığında yapılan denemelerde eklenen reaktif miktarları, 6,9 mL, 7,9 mL, 8,9 mL, 9,9 mL şeklinde test edilmiştir. (Tüm denemelere 100 µl hacimde iç standart eklenecek şekilde hesaplama yapılmıştır.) Yapılan denemeler sonucu elde edilen pik alanları karşılaştırmalı olarak **Şekil 3.13.'de** belirtilmiştir.



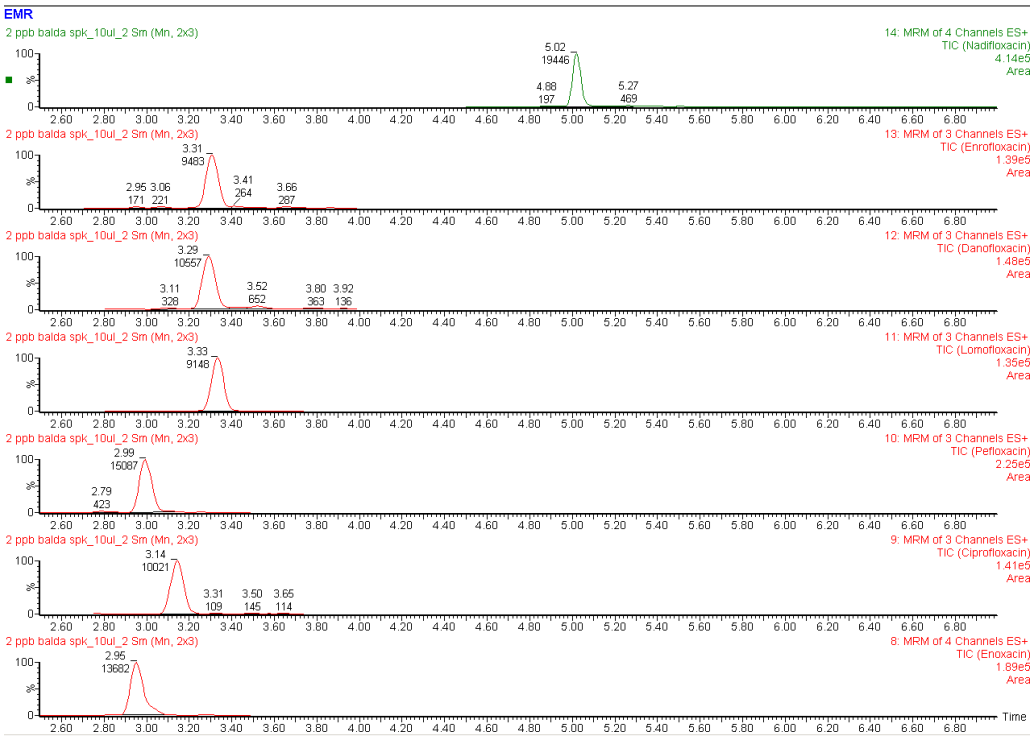
Şekil 3. 13. EDTA Mcilvaine tamponu ve %10 Meoh çözeltilerin kullanımı ile elde edilen karşılaştırma kromatogamları (5 µg/kg)

Tablo 3. 7. Seyrelt ve enjekte et metodu ile hazırlanmış, 10 µg/kg derişimindeki kinolon analizinde, farklı solventlerin geri kazanıma olan etkileri

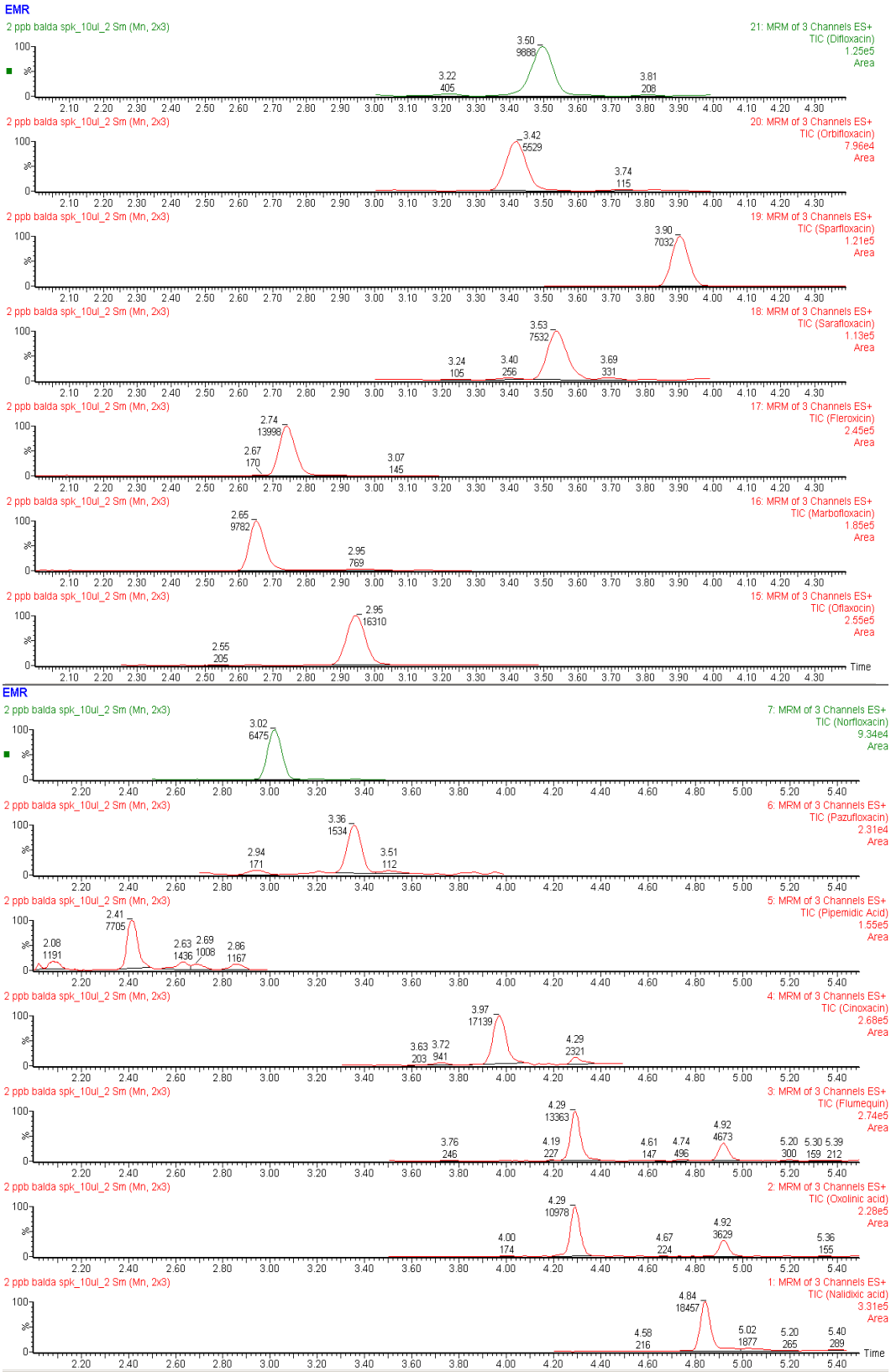
Solventler	Ortalama Geri Kazanım (%)
Okzalik Asit (pH=1,8)	71,54
%10 MeOH	81,13
Mcilvaine EDTA (pH = 4,0)	92,48
Mcilvaine EDTA (pH = 5,0)	96,36
Mcilvaine EDTA (pH = 6,0)	**98,75**
Mcilvaine EDTA (pH = 7,0)	88,66
n=7 (7 tekrarlı çalışma sonucudur)	

Tablo 3. 8. Seyrelt ve enjekte et metodu ile hazırlanmış, 10 µg/kg derişimindeki kinolon analizinde, farklı solventlerin geri kazanıma olan etkileri

ANALİTLER / SOLVENTLER	Pik İntegasyon Sonuçları (Alan) (10 µg/Kg)			
	Lomefloksasin	Pefloksasin	Siprofloksasin	Enoksasin
Okzalik Asit (pH=1,8)	11216	20874	13694	21547
%10 MeOH	18324	40716	30514	31257
Mcilvaine EDTA (pH = 4,0)	22671	48627	38546	29117
Mcilvaine EDTA (pH = 5,0)	28456	60431	39587	47862
Mcilvaine EDTA (pH = 6,0)	**30411**	**65237**	**40678**	**52734**
Mcilvaine EDTA (pH = 7,0)	27618	57618	38149	42116



Şekil 3. 14. Seyrelt ve enjekte et metodu ile hazırlanmış, 2 µg/kg florokinolon mix standart ile kirletilmiş bal numunesine ait örnek kromatogramlar



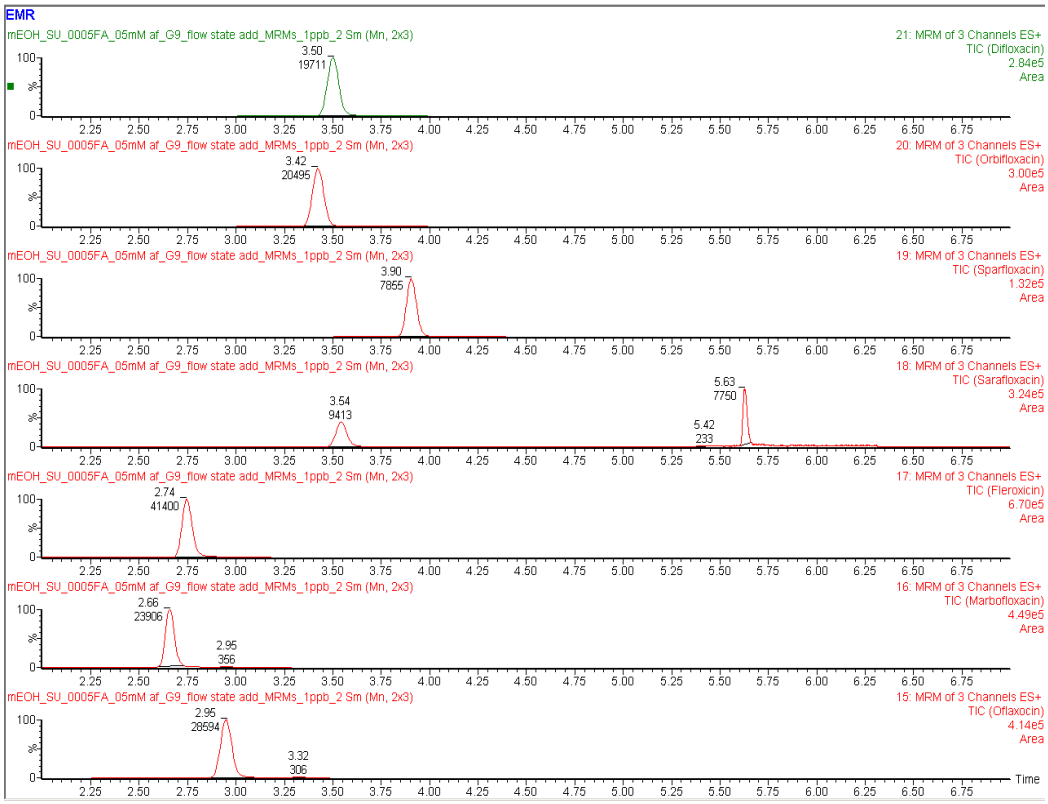
Şekil 3.14. (Devam) Seyrelt ve enjekte et metodu ile hazırlanmış, 2 µg/kg florokinolon mix. standart ile kirletilmiş bal numunesine ait örnek kromatogramlar

3.1.2.10. Quechers metodu ile hazırlık optimizasyon sonuçları

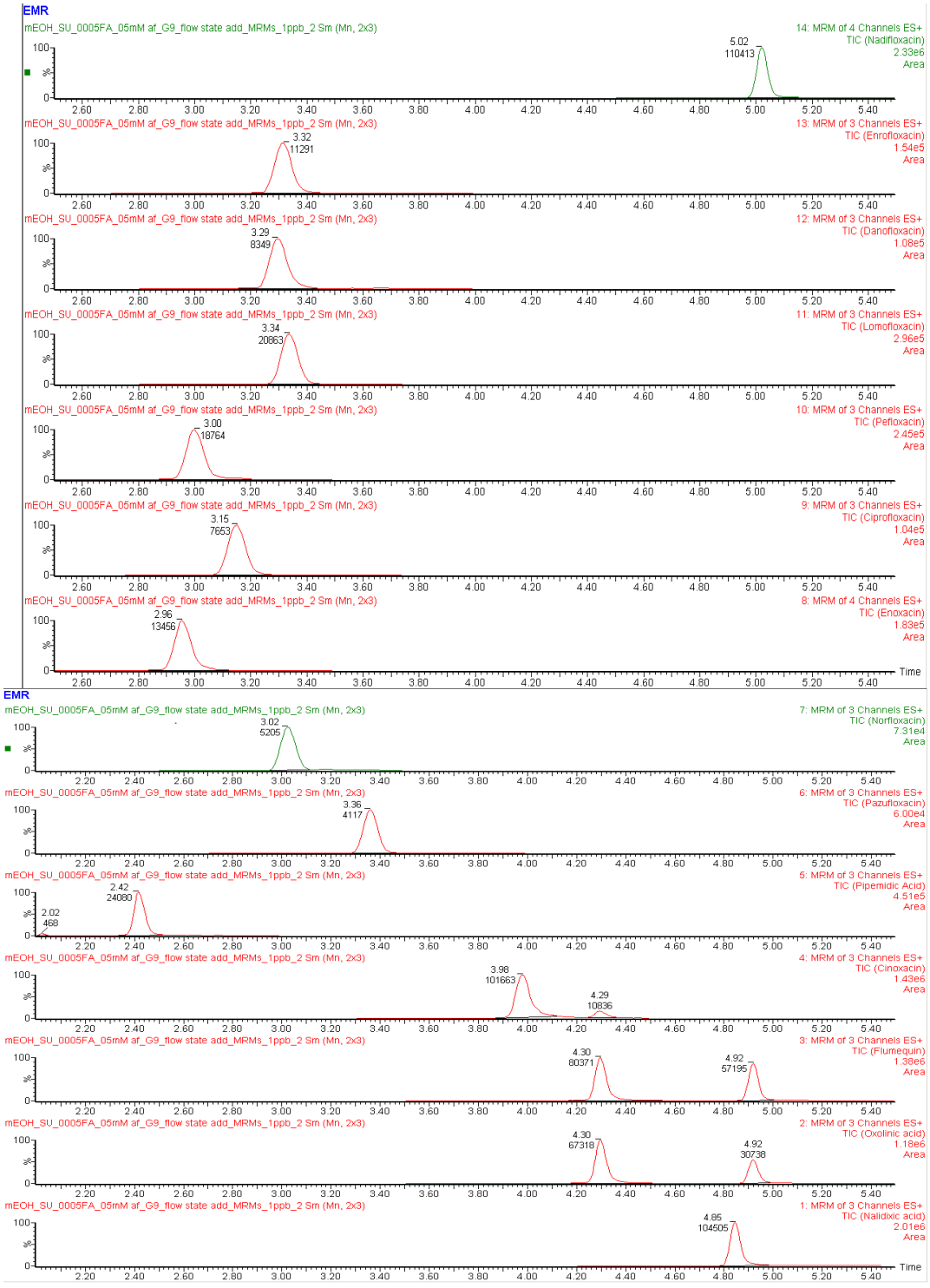
Yapılan kinolon analizlerinde daha düşük limitlere inebilmek ve kalıntı görüntüleme metotlarının hassasiyetini arttırmak için başvurulabilecek bir teknik olarak Quechers metodolojisi kinolon analizlerinde alternatif olarak geliştirilmiştir. Numune hazırlık aşamasında farklı gramajlar, farklı tuz kombinasyonları, farklı ekstraksiyon solventleri ve asitlik dereceleri denenmiş olup, temizleme basamağında farklı materyaller farklı gramajlarda denenmiştir. Maksimum hassasiyet yakalayabilmek adına yüksek bir gramaj seçilmiş olup (5 g) sulandırma ve homojenize etme prosedürler 1'e 1 ve 1'e 2 şeklinde optimize edilmiştir. 10 mL su ile homojenize edilen numune etil asetat ve asetonitril ekstraksiyonlarından asetik asitli asetonitril ile 10 mL ve 15 mL hacimlerinden 15 mL ile en yüksek geri kazanımı sağlamıştır. Salting out basamağında sıklıkla kullanılan magnezyum sülfat ve sodyum asetat tuz kombinasyonu tercih edilmiş olup karar verilen gramaj kit ile birlikte tedarik edilen 6 g $MgSO_4$ ve 1,5g NaOAc şeklindedir. Ekstraksiyon sonrası oluşan üst fazı temizleme aşamasında ise PSA, C18, $MgSO_4$ materyalleri ve karışımları denenmiş olup en ideal sonuç kit ile tedrik edilen, Bond Elut QuEChERS Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon (**1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA, 15 mL**) ile elde edilmiştir. Burda C18 içeriği numunede daha iyi bir temizlik sağlamış olsa da kinolonlarda kısmı bir geri kazanım kaybı yaşatmıştır. Balın temel bileşeni olan şeker eliminasyonu için PSA (primer sekonder amin) elzem olmak ile birlikte kalıntı halinde son aşamaya kadar gelebilen ve uçurma prosedüründe zorluk yaşamaya sebep olabilecek suyun uzaklaştırılması için $MgSO_4$, temizleme aşamasında tercih edilmiştir. Uçurma basamağı herhangi bir numune kaybı yaşamamak adına maksimum 40°C'de azot akımı altında gerçekleştirilmiş olup, kurutulmuş numune mobil faz A ve saf su karışımı ile ultrasonik banyoda çözülmüş ve herhangi bir partikülün kolona ve sisteme gitmemesi için filtreleme işlemi yapılmıştır. Elde edilen ortalama geri kazanım değerleri Tablo 3.9'da belirtilmiştir.

Tablo 3. 9. Quechers metodu ile hazırlanmış, 10 µg/kg derişimindeki kinolon analizinde, farklı d-SPE içeriklerinin geri kazanıma olan etkileri

Metot	d-spe mix - 1	d-spe mix - 2	d-spe mix - 3	d-spe mix - 4
Ekstraksiyon Tuz karışımı	6g $MgSO_4$ + 1,5g NaOAc	6g $MgSO_4$ + 1,5g NaOAc	6g $MgSO_4$ + 1,5g NaOAc	6g $MgSO_4$ + 1,5g NaOAc
d-SPE içerik	1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA and 400 mg C18, (Agilent)	900 mg $MgSO_4$ ve 150 mg PSA (Waters)	1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA (Agilent)	1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA and 400 mg C18, (Siliacycle)
Ekstraksiyon Solventi (15 mL)	1% Asetik Asitli ACN	1% Asetik Asitli ACN	1% Asetik Asitli ACN	1% Asetik Asitli ACN
Eklenen su miktarı (mL)	10	10	10	10
Bal miktarı (g)	5	5	5	5
Kinolonlar için ortalama Geri Kazanım (%)	**73,88**	**88,34**	**92,03**	**76,82**
n=7 (7 tekrarlı çalışma sonucudur)				



Şekil 3. 15. Quechers et metodu ile hazırlanmış, 1 µg/kg derişimde florokinolon mix standart ile kirletilmiş bal numunesine ait örnek kromatogramlar

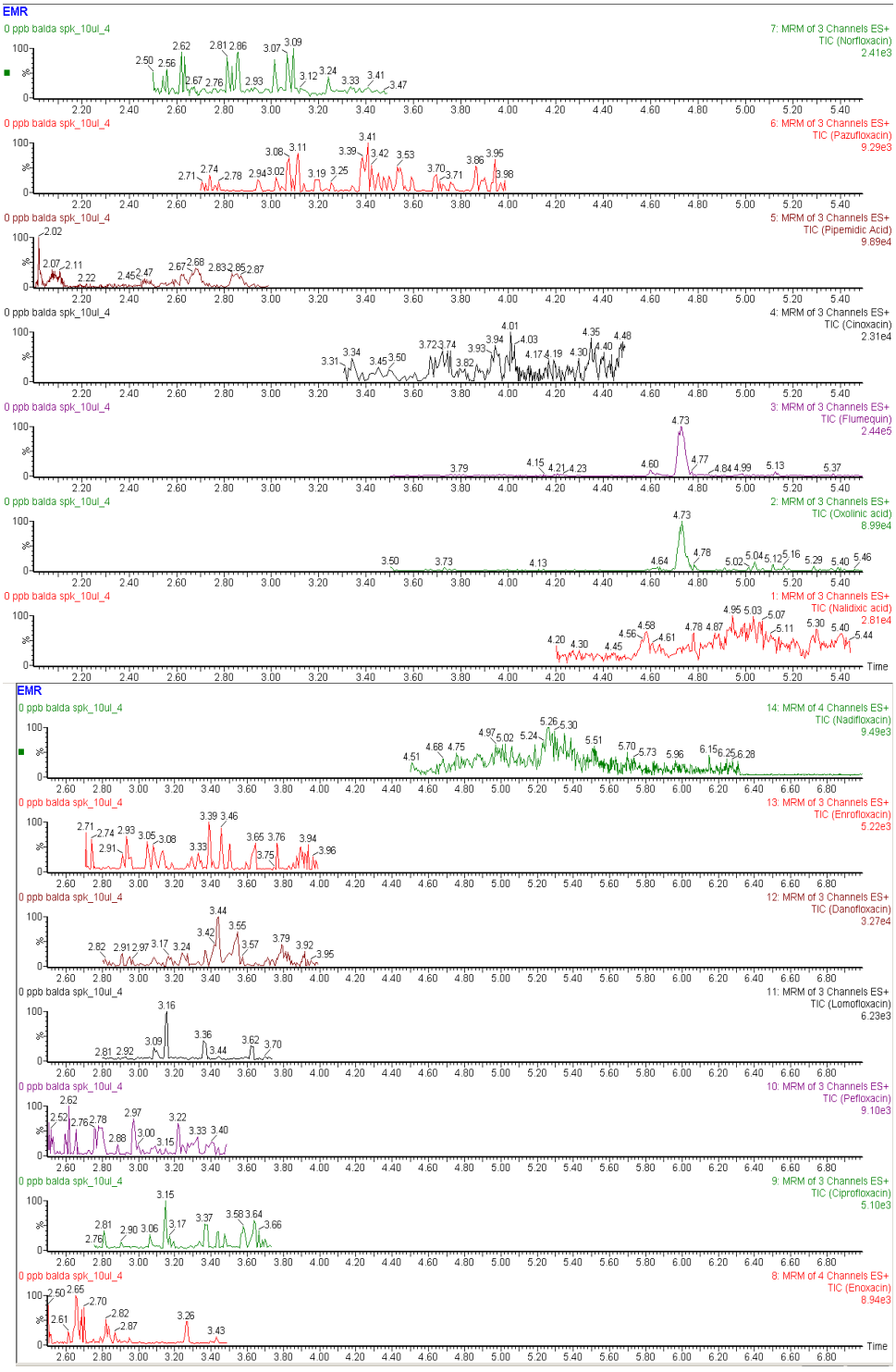


Şekil 3.15. (Devam) Quechers et metodu ile hazırlanmış, 1 µg/kg derişimde florokinolon mix standart ile kirletilmiş bal numunesine ait örnek kromatogramlar

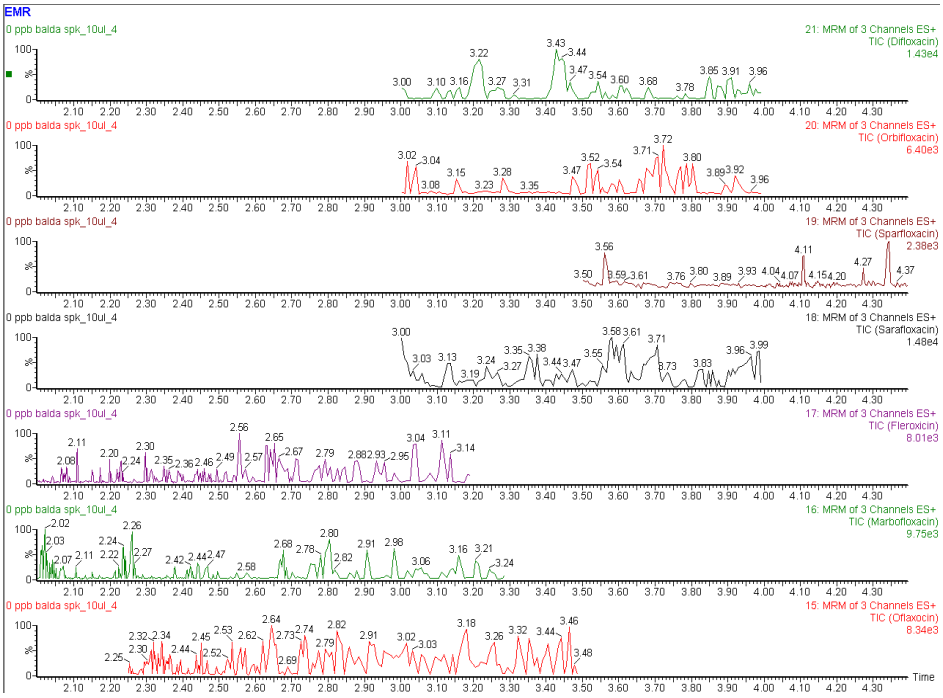
3.1.3. Metot validasyon sonuçları

3.1.3.1. Seçicilik sonuçları

Kinolonların niteliksel ve niceliksel olarak tayin edilmesi için, pozitif mod ESI kullanılarak Tandem MS'de oluşan spesifik iyonların ve parçalanma ürünlerinin seçimi gerçekleştirildi. Pozitif iyon modunda, hidrojen katılma ürünleri ($[M + H]^+$) parçalanır ve sonuçta minumum üç ürün iyonu oluşur. Her bir kinolon grubu 3 farklı MS geçişi ile tespit edilmektedir. Bu geçiş molekül reaksiyon görüntülemesi (molecule reaction monitoring- MRM) olarak nitlendirilmiş ve her bir kinolon bileşeni için 3 adet MRM set edilmiştir. Buda MS'in sağlamış olduğu kromatografik ayrım haricinde molekülün kütlesi ve MS'teki davranışı üzerine tespit imkânı belirtmektedir. Dataya üçüncü bir boyut kazandıran bu özellik sinyal şiddeti ve alıkonma süresi haricinde analitin özgül şekilde tayin edilebilmesi için ilave bir avantaj sağlamaktadır. Burada bir kinolon molekülü için belirlenen 3 MRM'den bir hesaplatma için kullanılırken, seçicilik ispatı olarak diğer iki iyon geçişi konfirmasyon (doğrulama) amaçlı tercih edilmektedir. Kantitasyon için kullanılan iyonlar en yüksek sinyali veren base peak denilen geçiş olup, düşük sinyalli ama LOQ seviyesinde cevap verebilen diğer iki bileşen doğrulama amaçlı tanımlanmıştır. MS'teki özgüllük haricinde, kromatografik olarakta ayrım en ideal şekide gerçekleştirilmiş olup, hiçbir yanlış pozitif hataya el vermeyecek şekilde metot optimize edilmiştir. Florokinolon piklerinin gürültüden iyi ayrıldığı ve rezolüsyonunun iyi olduğu, matriks kaynaklı girişimlerin piklerin şekline ve cevabında etkili olmadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle geliştirilen yöntemler spesifiktir denilebilmektedir.



Şekil 3. 16. Matriks etkisi olan kör numune kromatogramları (seyrelt & enjekte et)



Şekil 3.16. (Devam) Matriks etkisi olan kör numune kromatogramları (seyrelt & enjekte et)

3.1.3.2. Hassasiyet sonuçları (LOD & LOQ)

Yöntemin duyarlılığı, kinolonların, LOD ve LOQ değerlerinin S / N oranı yöntemi ile belirlenmesiyle değerlendirildi. LOD, her bir kinolon pikinin S / N ≥ 3 verdiği analit konsantrasyonu iken LOQ, analitin minimum hesaplatma konsantrasyonu olup değerlendirilen pikler S / N ≥ 10'dur.

Tablo 3. 10. LOD ve LOQ değerleri

Bileşen İsmi	Seyrelt ve Enjekte Et				Quechers				Kabul Edilen LOQ (µg/kg)	
	Ort.	Std.	**LOD**	**LOQ**	Ort.	Std.	**LOD**	**LOQ**	Seyrelt ve Enjekte Et	Quechers
Nadifloksasin	0,9714	0,0951	**0,2854**	**0,9512**	0,5300	0,0416	**0,1249**	**0,4163**	1,0	0,5
Enrofloksasin	0,9571	0,0976	**0,2928**	**0,9759**	0,5300	0,0545	**0,1634**	**0,5447**	1,0	0,5
Danofloksasin	0,9143	0,1069	**0,3207**	**1,0690**	0,5157	0,0454	**0,1362**	**0,4541**	1,0	0,5
Lomefloksasin	0,9429	0,0787	**0,2360**	**0,7868**	0,5214	0,0573	**0,1718**	**0,5728**	1,0	0,5
Pefloksasin	0,9429	0,0787	**0,2360**	**0,7868**	0,5129	0,0439	**0,1316**	**0,4386**	1,0	0,5
Siprofloksasin	0,9857	0,0690	**0,2070**	**0,6901**	0,5286	0,0422	**0,1266**	**0,4220**	1,0	0,5
Enoksasin	0,9286	0,0951	**0,2854**	**0,9512**	0,5257	0,0450	**0,1351**	**0,4504**	1,0	0,5
Difloksasin	0,9143	0,0900	**0,2699**	**0,8997**	0,5371	0,0541	**0,1622**	**0,5407**	1,0	0,5
Orbifloksasin	0,9571	0,0976	**0,2928**	**0,9759**	0,5343	0,0486	**0,1458**	**0,4860**	1,0	0,5

Tablo 3.10. (Devam) LOD ve LOQ değerleri

Sparfloksasin	0,9429	0,0976	**0,2928**	**0,9759**	0,5414	0,0505	**0,1514**	**0,5047**	1,0	0,5
Sarafloksasin	0,9429	0,0976	**0,2928**	**0,9759**	0,5057	0,0565	**0,1696**	**0,5653**	1,0	0,5
Fleroksasin	0,9857	0,0900	**0,2699**	**0,8997**	0,5071	0,0531	**0,1594**	**0,5314**	1,0	0,5
Marbofloksasin	0,9857	0,0900	**0,2699**	**0,8997**	0,5043	0,0519	**0,1557**	**0,5192**	1,0	0,5
Oflaksosin	1,1571	0,0535	**0,1604**	**0,5345**	0,5186	0,0456	**0,1369**	**0,4562**	1,0	0,5
Norfloksasin	0,9857	0,1069	**0,3207**	**1,0690**	0,5214	0,0505	**0,1514**	**0,5047**	1,0	0,5
Pazufloksasin	1,0143	0,0690	**0,2070**	**0,6901**	0,4900	0,0551	**0,1652**	**0,5508**	1,0	0,5
Pipemidik Asit	0,9143	0,0900	**0,2699**	**0,8997**	0,5300	0,0513	**0,1539**	**0,5132**	1,0	0,5
Sinoksasin	0,9571	0,0976	**0,2928**	**0,9759**	0,5114	0,0570	**0,1710**	**0,5699**	1,0	0,5
Flumekuin	0,9857	0,1069	**0,3207**	**1,0690**	0,5157	0,0489	**0,1468**	**0,4894**	1,0	0,5
Oksolinik Asit	0,9429	0,0976	**0,2928**	**0,9759**	0,4971	0,0431	**0,1293**	**0,4309**	1,0	0,5
Nalidiksik Asit	0,9714	0,0951	**0,2854**	**0,9512**	0,4900	0,0332	**0,0995**	**0,3317**	1,0	0,5
n=7										

3.1.3.3. Aralık ve doğrusallık sonuçları

Her bir floksasin miktarının hesaplanması için kalibrasyon eğrileri, optimize edilmiş doğrusal dinamik konsantrasyon aralığında ayrı ayrı yapılmıştır. 6 noktalı kalibrasyon eğrileri, standart ile zenginleştirilmiş şekilde ve matriks eşleşme yöntemi kullanılarak, yani numune kör numune içeren ve bilinen derişimlerde standart ekleme yöntemi ile hazırlanmış olup, kullanılan kalibrasyon aralıkları seyret ve enjekte et yöntemi için 0 ppb, 1 ppb, 2 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb ve Quechers yöntemi için ise 0 ppb, 0,5 ppb, 1 ppb, 2 ppb, 5 ppb ve 10 ppb' dir. Yanıt olarak tepe alanının (Her bir floksasin için ayrı bir alan / I.S. tepe alanı) oranı, her analit için konsantrasyonları (ng/dak.) cinsinden çizildi ve kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallığını kontrol etmek için floksasinlerin konsantrasyonunun beklenen değerleri, kalibrasyon eğrilerinden hesaplanan değerlere karşı çizilmiştir.

Kalibrasyon grafik sonuçları her iki metot içinde **EK A** bölümünde **Şekil A.1. ve Şekil A.2. 'de** belirtilmiştir.

Tablo 3. 11. Kalibrasyon grafikleri rakamsal verileri

	Seyrelt & Enjekte et		**QUECHERS**	
Analitler	**R2**	**Denklem**	**R2**	**Denklem**
Nadifloksasin	**0,997**	y=8675,73 x+1371,76	**0,995**	y=7408,56 x+1768,13
Enrofloksasin	**0,998**	y=4037,73 x+488,056	**0,997**	y=3434,96 x+-104,307
Danofloksasin	**0,995**	y=3894,05 x+2500,81	**0,998**	y=5852,28 x+743,189
Lomefloksasin	**0,996**	y=3080,43 x+163,2	**0,993**	y=3010,17 x+-11,8891
Pefloksasin	**0,996**	y=6090,01 x+689,728	**0,998**	y=5048,22 x+249,704
Siprofloksasin	**0,996**	y=3509,83 x+273,438	**0,996**	y=3391,92 x+-720,407
Enoksasin	**0,996**	y=5186,43 x+446,039	**0,999**	y=4552,54 x+386,618
Difloksasin	**0,994**	y=3911,81 x+868,663	**0,997**	y=3557,36 x+629,53
Orbifloksasin	**0,993**	y=2280,2 x+479,045	**0,993**	y=1671,05 x+209,51
Sparfoksasin	**0,994**	y=3156,84 x+283,768	**0,997**	y=2671,16 x+158,481

Tablo 3.11. (Devam) Kalibrasyon grafikleri rakamsal verileri

Sarafloksasin	**0,992**	y=2725,42 x+1512,58	**0,993**	y=2718,49 x+902,162
Fleroksasin	**0,995**	y=4947,56 x+807,455	**0,993**	y=7428,56 x+1528,24
Marbofloksasin	**0,996**	y=3790,02 x+234,843	**0,995**	y=3597,69 x+448,643
Oflaksosin	**0,995**	y=6181,49 x+1934	**0,992**	y=5421,97 x+243,728
Norfloksasin	**0,995**	y=2643,12 x+103,604	**0,998**	y=2468,04 x+374,16
Pazufloksasin	**0,991**	y=541,289 x+211,757	**0,991**	y=602,702 x+557,787
Pipemidik asit	**0,99**	y=3105,55 x+996,809	**0,998**	y=3783,79 x+103,249
Sinoksasin	**0,992**	y=7408,56 x+1768,2	**0,997**	y=7462,09 x+993,615
Flumekuin	**0,993**	y=2822,7 x+555,825	**0,997**	y=2256,75 x+788,752
Oksolinik asit	**0,995**	y=5207,05 x+181,311	**0,996**	y=4580,43 x+696,124
Nalidiksik asit	**0,992**	y=7827,24 x+4784,11	**0,997**	y=5864,77 x+1111,67

3.1.3.4. Doğruluk sonuçları

Doğruluk parametrelerinin validasyonu için yapılan geri kazanım çalışmaları, 2 farklı numune hazırlık yöntemi ile florokinolonlar için 3 farklı konsantrasyondan hesaplanan %RSD ve yüzde geri kazanım değerleri üzerinden değerlendirilmiştir

Tablo 3. 12. Geri kazanım sonuçları (seyrelt ve enjekte et)

Analit	Konsantrasyon (µg/kg)	Ölçülen Değer (Ortalama)	Ortalama % GK n=7	Ortalama % RSD	Analit	Ölçülen Değer (Ortalama)	Ortalama % GK n=7	Ortalama % RSD
Nadifloksasin	1	1,0507	**105,07**	8,2	**Fleroksasin**	0,9014	**90,14**	6,4
	2	1,8286	**91,43**	4,1		1,7714	**88,57**	2,8
	10	9,3	**93**	1,6		9,9857	**99,857**	0,7
Enrofloksasin	1	0,9714	**97,14**	9,8	**Marbofloksasin**	0,9857	**98,57**	9,1
	2	1,8001	**90,005**	9,6		1,7857	**89,285**	8,2
	10	9,6714	**96,714**	1,5		10,1143	**101,143**	3,3
Danofloksasin	1	0,9098	**90,98**	9,1	**Oflaksosin**	1,0571	**105,71**	4,6
	2	1,7143	**85,705**	4,3		1,8429	**92,145**	4,8
	10	9,8857	**98,857**	3,8		9,9286	**99,286**	2,2
Lomefloksasin	1	0,9429	**94,29**	8,3	**Norfloksasin**	0,9143	**91,43**	7,5
	2	1,9005	**95,025**	5,3		1,8714	**93,57**	5,9
	10	9,8714	**98,714**	3,5		10,0571	**100,571**	4,3
Pefloksasin	1	0,9714	**97,14**	5,1	**Pazufloksasin**	1,1286	**112,86**	7,2
	2	1,7571	**87,855**	5,6		1,9286	**96,43**	9,3
	10	9,8571	**98,571**	2,1		9,2571	**92,571**	7,2
Siprofloksasin	1	0,9857	**98,57**	7,2	**Pipemidik asit**	0,9571	**95,71**	9,2
	2	1,8429	**92,145**	5,3		1,9571	**97,855**	5,8
	10	9,9429	**99,429**	2,7		10,0429	**100,429**	5,5
Enoksasin	1	0,9571	**95,71**	8,2	**Sinoksasin**	0,8857	**88,57**	7,8
	2	1,7714	**88,57**	5,4		1,7286	**86,43**	8,7
	10	9,7143	**97,143**	2,9		9,9286	**99,286**	7,4
Difloksasin	1	0,9714	**97,14**	9,8	**Flumekuin**	0,9286	**92,86**	8,1
	2	1,8571	**92,855**	6,1		1,8714	**93,57**	5,5
	10	10,1714	**101,714**	2,9		9,4714	**94,714**	2,3
Orbifloksasin	1	0,9725	**97,25**	9,8	**Oksolinik asit**	0,926	**92,6**	8,1
	2	1,8143	**90,715**	3,8		1,7571	**87,855**	4,5
	10	10,2143	**102,143**	4,7		9,5475	**95,475**	4,8
Sparfoksasin	1	0,9789	**97,89**	5,2	**Nalidiksik asit**	1,0286	**102,86**	9,2
	2	1,7143	**85,715**	4,1		1,8714	**93,57**	4,0
	10	9,71431	**97,1431**	1,9		9,8143	**98,143**	1,7
Sarafloksasin	1	0,9614	**96,14**	7,8				
	2	1,8143	**90,715**	8,1				
	10	10,0714	**100,714**	2,8				

Tablo 3. 13. Geri kazanım sonuçları (QUECHERS).

QUECHERS Metodu								
Analit	**Konsantrasyon (µg /kg)**	**Ölçülen Değer (Ortalama)**	**Ortalama % GK n=7**	**Ortalama % RSD**	**Analit**	**Ölçülen Değer (Ortalama)**	**Ortalama % GK n=7**	**Ortalama % RSD**
Nadifloksasin	0,5	0,5371	**107,42**	7,3	**Fleroksasin**	0,4814	**96,28**	11,3
	2	1,8143	**90,715**	12,1		1,8143	**90,715**	8,7
	10	9,7667	**97,667**	3,4		9,7286	**97,286**	4,0
Enrofloksasin	0,5	0,4965	**99,3**	10,9	**Marbofloksasin**	0,4614	**92,28**	10,3
	2	2,2651	**113,255**	8,3		2,2547	**112,735**	10,5
	10	9,6714	**96,714**	3,9		9,8429	**98,429**	3,0
Danofloksasin	0,5	0,5029	**100,58**	8,6	**Oflaksosin**	0,5157	**103,14**	10,1
	2	2,3571	**117,855**	10,1		1,9468	**97,34**	15,1
	10	9,6748	**96,748**	1,2		10,0492	**100,492**	4,5
Lomefloksasin	0,5	0,5071	**101,42**	10,2	**Norfloksasin**	0,5186	**103,72**	10,0
	2	2,2286	**111,43**	6,7		2,1143	**105,715**	10,7
	10	9,9857	**99,857**	4,9		9,5857	**95,857**	2,3
Pefloksasin	0,5	0,5057	**101,14**	10,8	**Pazufloksasin**	0,4743	**94,86**	9,3
	2	1,9286	**96,43**	10,7		2,1286	**106,43**	12,3
	10	9,7714	**97,714**	3,5		9,8426	**98,426**	3,0
Siprofloksasin	0,5	0,5129	**102,58**	12	**Pipemidik asit**	0,5186	**103,72**	9,9
	2	1,9002	**95,01**	8,0		2,2568	**112,84**	8,0
	10	9,5814	**95,814**	0,9		10,0584	**100,584**	3,6
Enoksasin	0,5	0,4157	**83,14**	11,2	**Sinoksasin**	0,4514	**90,28**	12,7
	2	2,2501	**112,505**	10,8		2,1571	**107,855**	11,3
	10	9,8001	**98,001**	5,5		9,6429	**96,429**	1,6
Difloksasin	0,5	0,4986	**99,72**	8,0	**Flumekuin**	0,4771	**95,42**	8,2
	2	2,1429	**107,145**	13,2		1,8857	**94,285**	6,4
	10	9,6001	**96,001**	1,8		10,0571	**100,571**	4,7
Orbifloksasin	0,5	0,5671	**113,42**	4,5	**Oksolinik asit**	0,52	**104**	9,7
	2	2,1143	**105,715**	7,9		2,1286	**106,43**	13,2
	10	9,8857	**98,857**	4,8		9,9001	**99,001**	3,6
Sparfoksasin	0,5	0,4143	**82,86**	5,7	**Nalidiksik asit**	0,5414	**108,28**	7,0
	2	2,0587	**102,935**	8,5		1,9714	**98,57**	8,6
	10	9,8741	**98,741**	2,7		10,0021	**100,021**	4,3
Sarafloksasin	0,5	0,4971	**99,42**	13,4				
	2	1,8569	**92,845**	10,3				
	10	9,7429	**97,429**	3,8				

3.1.3.5. Kesinlik sonuçları

Geliştirilmiş UPLC / MS yöntemi kullanılarak yapılan kesinlik çalışmaları, sistem tekrarlanabilirliği ve 2 farklı ön hazırlık metodu için elde edilen kesinlik çalışmaları verileri, tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik olarak 3 alt sınıfta değerlendirilmiştir.

Tablo 3. 14. Quechers yöntemi için tekrarlanabilirlik verileri

Analitler	Konsantrasyon (µg/kg)	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7	Ortalama	SD	%RSD
Nadifloksasin	0,5	0,48	0,56	0,54	0,54	0,56	0,59	0,49	0,5371	0,0395	**7,3**
Enrofloksasin	0,5	0,41	0,47	0,48	0,56	0,47	0,48	0,56	0,4900	0,0535	**10,9**
Danofloksasin	0,5	0,52	0,52	0,49	0,52	0,52	0,41	0,54	0,5029	0,0435	**8,6**
Lomefloksasin	0,5	0,48	0,59	0,47	0,52	0,48	0,45	0,56	0,5071	0,0515	**10,2**
Pefloksasin	0,5	0,41	0,54	0,45	0,54	0,56	0,52	0,52	0,5057	0,0547	**10,8**
Siprofloksasin	0,5	0,49	0,59	0,56	0,49	0,49	0,41	0,56	0,5129	0,0613	**12,0**
Enoksasin	0,5	0,52	0,48	0,52	0,41	0,59	0,48	0,47	0,4957	0,0556	**11,2**
Difloksasin	0,5	0,47	0,45	0,54	0,48	0,47	0,54	0,54	0,4986	0,0398	**8,0**
Orbifloksasin	0,5	0,59	0,56	0,56	0,59	0,52	0,56	0,59	0,5671	0,0256	**4,5**
Sparfoksasin	0,5	0,48	0,54	0,48	0,47	0,49	0,48	0,45	0,4843	0,0276	**5,7**
Sarafloksasin	0,5	0,48	0,56	0,45	0,59	0,45	0,54	0,41	0,4971	0,0668	**13,4**
Fleroksasin	0,5	0,52	0,59	0,47	0,54	0,49	0,41	0,49	0,5014	0,0567	**11,3**
Marbofloksasin	0,5	0,49	0,45	0,49	0,52	0,41	0,45	0,56	0,4814	0,0498	**10,3**
Oflaksosin	0,5	0,56	0,47	0,56	0,48	0,47	0,48	0,59	0,5157	0,0519	**10,1**
Norfloksasin	0,5	0,54	0,48	0,45	0,59	0,47	0,56	0,54	0,5186	0,0521	**10,0**
Pazufloksasin	0,5	0,48	0,41	0,47	0,45	0,54	0,45	0,52	0,4743	0,0443	**9,3**
Pipemidik asit	0,5	0,59	0,52	0,49	0,48	0,59	0,49	0,47	0,5186	0,0511	**9,9**
Sinoksasin	0,5	0,45	0,56	0,45	0,56	0,52	0,56	0,41	0,5014	0,0636	**12,7**
Flumekuin	0,5	0,47	0,49	0,48	0,52	0,41	0,45	0,52	0,4771	0,0390	**8,2**
Oksolinik asit	0,5	0,56	0,56	0,45	0,56	0,47	0,48	0,56	0,5200	0,0507	**9,7**
Nalidiksik asit	0,5	0,49	0,59	0,56	0,49	0,54	0,56	0,56	0,5414	0,0380	**7,0**
	Konsantrasyon (µg/kg)	**n=1**	**n=2**	**n=3**	**n=4**	**n=5**	**n=6**	**n=7**	**Ortalama**	**SD**	**%RSD**
Nadifloksasin	2	2,3	1,7	1,7	1,8	1,7	1,7	1,8	1,8143	0,2193	**12,1**
Enrofloksasin	2	2,5	2,1	2,6	2,3	2,2	2,6	2,5	2,4000	0,2000	**8,3**
Danofloksasin	2	2,6	2,2	2,1	2,6	2,3	2,6	2,1	2,3571	0,2370	**10,1**
Lomefloksasin	2	2,3	2,2	2,1	2,1	2,5	2,1	2,3	2,2286	0,1496	**6,7**
Pefloksasin	2	1,8	2,1	2,2	1,7	1,7	1,9	2,1	1,9286	0,2059	**10,7**
Siprofloksasin	2	1,9	1,9	1,9	1,8	1,9	2,2	1,7	1,9000	0,1528	**8,0**
Enoksasin	2	2,1	2,3	2,6	2,5	2,1	2,3	1,9	2,2571	0,2440	**10,8**
Difloksasin	2	2,3	1,8	2,2	2,1	2,6	1,8	2,2	2,1429	0,2820	**13,2**

Tablo 3.14. (Devam) Quechers yöntemi için tekrarlanabilirlik verileri

Orbifloksasin	2	2,2	1,9	2,1	2,3	2,3	1,9	2,1	2,1143	0,1676	**7,9**
Sparfoksasin	2	1,7	2,2	2,1	2,2	2,2	2,1	2,1	2,0857	0,1773	**8,5**
Sarafloksasin	2	2,3	1,8	2,2	2,1	1,8	2,2	2,3	2,1000	0,2160	**10,3**
Fleroksasin	2	1,9	2,1	1,7	1,9	1,7	1,7	1,7	1,8143	0,1574	**8,7**
Marbofloksasin	2	2,2	2,5	2,5	2,2	2,3	2,3	1,8	2,2571	0,2370	**10,5**
Oflaksosin	2	1,9	1,9	2,1	1,7	1,6	2,5	1,9	1,9429	0,2936	**15,1**
Norfloksasin	2	1,9	2,5	2,2	1,8	2,1	2,1	2,2	2,1143	0,2268	**10,7**
Pazufloksasin	2	2,2	2,1	1,7	2,3	2,2	1,9	2,5	2,1286	0,2628	**12,3**
Pipemidik asit	2	2,1	2,5	2,2	2,1	2,5	2,3	2,1	2,2571	0,1813	**8,0**
Sinoksasin	2	2,2	2,3	2,1	2,5	2,1	2,2	1,7	2,1571	0,2440	**11,3**
Flumekuin	2	2,1	1,8	1,9	1,9	1,7	1,9	1,9	1,8857	0,1215	**6,4**
Oksolinik asit	2	1,7	2,2	2,2	2,3	2,5	2,2	1,8	2,1286	0,2812	**13,2**
Nalidiksik asit	2	1,9	1,9	1,8	1,9	2,3	2,1	1,9	1,9714	0,1704	**8,6**
	Konsantrasyon (µg/kg)	**n=1**	**n=2**	**n=3**	**n=4**	**n=5**	**n=6**	**n=7**	**Ortalama**	**SD**	**%RSD**
Nadifloksasin	10	9,7	10,2	9,9	9,8	9,9	9,7	9,2	9,7667	0,3327	**3,4**
Enrofloksasin	10	9,6	9,5	9,6	9,4	10,5	9,6	9,5	9,6714	0,3729	**3,9**
Danofloksasin	10	9,6	9,7	9,6	9,9	9,7	9,6	9,6	9,6714	0,1113	**1,2**
Lomefloksasin	10	10,4	9,6	9,7	10,4	10,4	10,2	9,2	9,9857	0,4845	**4,9**
Pefloksasin	10	9,6	10,2	9,4	10,2	9,7	9,4	9,9	9,7714	0,3402	**3,5**
Siprofloksasin	10	9,5	9,6	9,7	9,5	9,6	9,5	9,7	9,5857	0,0900	**0,9**
Enoksasin	10	9,6	9,7	9,2	9,9	10,5	9,2	10,5	9,8000	0,5416	**5,5**
Difloksasin	10	9,7	9,9	9,4	9,5	9,7	9,5	9,5	9,6000	0,1732	**1,8**
Orbifloksasin	10	9,2	10,4	9,9	10,4	9,4	9,7	10,2	9,8857	0,4776	**4,8**
Sparfoksasin	10	10,2	9,5	9,7	10,2	9,7	9,9	9,9	9,8714	0,2628	**2,7**
Sarafloksasin	10	9,7	9,9	10,5	9,5	9,6	9,6	9,4	9,7429	0,3690	**3,8**
Fleroksasin	10	9,4	9,4	9,7	9,9	9,5	10,5	9,7	9,7286	0,3861	**4,0**
Marbofloksasin	10	9,9	9,9	9,6	10,2	9,7	10,2	9,4	9,8429	0,2992	**3,0**
Oflaksosin	10	10,5	10,4	9,9	9,4	10,4	9,5	10,2	10,0429	0,4504	**4,5**
Norfloksasin	10	9,7	9,5	9,2	9,5	9,7	9,9	9,6	9,5857	0,2193	**2,3**
Pazufloksasin	10	9,9	10,2	9,7	10,2	9,4	9,6	9,9	9,8429	0,2992	**3,0**
Pipemidik asit	10	9,6	10,2	10,5	10,5	9,9	9,7	10,2	10,0857	0,3625	**3,6**
Sinoksasin	10	9,5	9,7	9,9	9,7	9,7	9,5	9,5	9,6429	0,1512	**1,6**
Flumekuin	10	10,2	9,2	10,4	10,4	9,6	10,4	10,2	10,0571	0,4721	**4,7**
Oksolinik asit	10	9,7	9,9	9,4	10,2	9,9	9,7	10,5	9,9000	0,3606	**3,6**
Nalidiksik asit	10	10,4	9,7	10,5	9,7	9,9	9,4	10,4	10,0000	0,4320	**4,3**

Tablo 3. 15. Seyrelt ve enjekte et yöntemi için tekrarlanabilirlik verileri

Analitler	Konsantrasyon (µg/kg)	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7	Ortalama	SD	%RSD
Nadifloksasin	1	1,1	1	0,9	0,9	1	1	1,1	1,0000	0,0816	**8,2**
Enrofloksasin	1	0,8	1	1	1	1	0,9	1,1	0,9714	0,0951	**9,8**
Danofloksasin	1	0,8	0,9	0,9	1	0,9	0,8	1	0,9000	0,0816	**9,1**
Lomefloksasin	1	0,9	1	0,9	1	1	1	0,8	0,9429	0,0787	**8,3**
Pefloksasin	1	1	1	0,9	1	1	0,9	1	0,9714	0,0488	**5,0**
Siprofloksasin	1	0,9	1	1,1	1	1	0,9	1	0,9857	0,0690	**7,0**
Enoksasin	1	0,9	1	0,9	0,9	1,1	0,9	1	0,9571	0,0787	**8,2**
Difloksasin	1	1	0,9	0,9	1,1	1,1	0,9	0,9	0,9714	0,0951	**9,8**
Orbifloksasin	1	1	0,9	1	1	1	0,8	1,1	0,9714	0,0951	**9,8**
Sparfoksasin	1	1	1	1	1	0,9	0,9	1	0,9714	0,0488	**5,0**
Sarafloksasin	1	1	0,9	1	0,9	1	1,1	0,9	0,9714	0,0756	**7,8**
Fleroksasin	1	0,9	0,9	1	0,9	0,8	0,9	0,9	0,9000	0,0577	**6,4**
Marbofloksasin	1	1,1	0,9	1	1,1	0,9	1	0,9	0,9857	0,0900	**9,1**
Oflaksosin	1	1,2	1,1	1,2	1,1	1,2	1,2	1,1	1,1571	0,0535	**4,6**
Norfloksasin	1	0,9	1	0,9	0,8	0,9	1	0,9	0,9143	0,0690	**7,5**
Pazufloksasin	1	1,4	1,4	1,2	1,4	1,2	1,3	1,4	1,3286	0,0951	**7,2**
Pipemidik asit	1	0,9	0,8	0,8	1	0,8	0,8	0,9	0,8571	0,0787	**9,2**
Sinoksasin	1	0,9	0,9	1	0,8	0,9	0,9	0,8	0,8857	0,0690	**7,8**
Flumekuin	1	0,8	0,9	0,9	1	1	1	0,9	0,9286	0,0756	**8,1**
Oksolinik asit	1	1	1	0,9	0,8	1	0,9	0,9	0,9286	0,0756	**8,1**
Nalidiksik asit	1	1,2	1,1	1	1	0,9	1	1	1,0286	0,0951	**9,2**
	Konsantrasyon (µg/kg)	**n=1**	**n=2**	**n=3**	**n=4**	**n=5**	**n=6**	**n=7**	**Ortalama**	**SD**	**%RSD**
Nadifloksasin	2	1,9	1,8	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7	1,8286	0,0756	**4,1**
Enrofloksasin	2	1,7	1,6	1,9	1,7	2,1	1,9	1,7	1,8000	0,1732	**9,6**
Danofloksasin	2	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7	1,6143	0,0690	**4,3**
Lomefloksasin	2	2	1,9	1,7	1,9	1,9	2	1,9	1,9000	0,1000	**5,3**
Pefloksasin	2	1,8	1,7	1,8	1,7	1,6	1,9	1,8	1,7571	0,0976	**5,6**
Siprofloksasin	2	2	1,8	1,8	1,7	1,9	1,9	1,8	1,8429	0,0976	**5,3**
Enoksasin	2	1,7	1,7	1,9	1,8	1,7	1,7	1,9	1,7714	0,0951	**5,4**
Difloksasin	2	2,1	1,8	1,8	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8571	0,1134	**6,1**
Orbifloksasin	2	1,8	1,8	1,8	1,8	1,9	1,7	1,9	1,8143	0,0690	**3,8**
Sparfoksasin	2	1,8	1,7	1,7	1,6	1,7	1,7	1,8	1,7143	0,0690	**4,0**
Sarafloksasin	2	2	1,8	1,6	1,8	1,7	2	1,8	1,8143	0,1464	**8,1**
Fleroksasin	2	1,8	1,8	1,7	1,8	1,8	1,7	1,8	1,7714	0,0488	**2,8**
Marbofloksasin	2	1,6	1,9	1,7	1,6	1,9	1,9	1,9	1,7857	0,1464	**8,2**
Oflaksosin	2	1,7	1,6	1,7	1,6	1,5	1,7	1,7	1,6429	0,0787	**4,8**
Norfloksasin	2	1,8	2,1	1,8	1,8	1,8	1,9	1,9	1,8714	0,1113	**5,9**
Pazufloksasin	2	1,9	1,7	1,9	2,3	1,9	1,9	1,9	1,9286	0,1799	**9,3**

Tablo 3.15. (Devam) Seyrelt ve enjekte et yöntemi için tekrarlanabilirlik verileri

Pipemidik asit	2	1,9	2	1,9	1,9	1,9	1,9	2,2	1,9571	0,1134	**5,8**
Sinoksasin	2	2	1,6	1,7	1,8	1,6	1,8	1,6	1,7286	0,1496	**8,7**
Flumekuin	2	1,4	1,3	1,3	1,4	1,4	1,5	1,3	1,3714	0,0756	**5,5**
Oksolinik asit	2	1,8	1,8	1,9	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7571	0,0787	**4,5**
Nalidiksik asit	2	1,8	1,8	1,9	1,8	1,9	2	1,9	1,8714	0,0756	**4,0**
	Konsantrasyon (µg/kg)	**n=1**	**n=2**	**n=3**	**n=4**	**n=5**	**n=6**	**n=7**	**Ortalama**	**SD**	**%RSD**
Nadifloksasin	10	9,1	9,4	9,3	9,1	9,5	9,3	9,4	9,3000	0,1528	**1,6**
Enrofloksasin	10	9,7	9,5	9,5	9,7	9,8	9,9	9,6	9,6714	0,1496	**1,5**
Danofloksasin	10	9,8	10	10,5	9,9	10	9,3	9,6	9,8857	0,3805	**3,8**
Lomefloksasin	10	10,1	9,9	10	10	9,1	10,1	9,9	9,8714	0,3498	**3,5**
Pefloksasin	10	9,7	9,8	10	9,9	10,1	10	9,5	9,8571	0,2070	**2,1**
Siprofloksasin	10	10,1	9,8	9,8	10	10,3	10,1	9,5	9,9429	0,2637	**2,7**
Enoksasin	10	9,8	9,2	10	9,7	9,5	9,8	10	9,7143	0,2854	**2,9**
Difloksasin	10	10,1	9,7	10,4	10	10,1	10,6	10,3	10,1714	0,2928	**2,9**
Orbifloksasin	10	10,4	11	10,4	9,9	10,7	9,7	9,6	10,2143	0,4811	**4,7**
Sparfoksasin	10	9,6	9,8	9,6	9,6	9,9	10	9,5	9,7143	0,1864	**1,9**
Sarafloksasin	10	10,4	10	10	9,9	10	10,4	9,6	10,0714	0,2870	**2,8**
Fleroksasin	10	9,9	10	10	10	10	10,1	9,9	9,9857	0,0690	**0,7**
Marbofloksasin	10	9,6	10	10,1	10,6	10,5	10	10	10,1143	0,3388	**3,3**
Oflaksosin	10	9,9	9,8	9,8	9,8	9,9	9,9	10,4	9,9286	0,2138	**2,2**
Norfloksasin	10	10,2	9,5	10,4	9,4	10,4	10,4	10,1	10,0571	0,4315	**4,3**
Pazufloksasin	10	8,4	10	9	8,9	9,3	10,1	8,9	9,2571	0,6655	**7,2**
Pipemidik asit	10	9,6	10	10,4	10,6	9,5	10,6	9,3	10,0429	0,5563	**5,5**
Sinoksasin	10	10,8	11	8,9	9,9	9,7	9,6	9,6	9,9286	0,7342	**7,4**
Flumekuin	10	9,7	9,6	9,2	9,5	9,4	9,2	9,7	9,4714	0,2138	**2,3**
Oksolinik asit	10	9,2	10	8,9	10,1	9,6	9,4	9,1	9,4714	0,4536	**4,8**
Nalidiksik asit	10	9,9	10	9,5	9,8	9,9	9,9	9,7	9,8143	0,1676	**1,7**

Tablo 3. 16. Seyrelt ve enjekte et yöntemi için tekrarüretilebilirlik verileri

	Seyrelt ve Enjekte Et Metodu								
	Analist 1, Ölçülen Değerler (µg/kg)			Analist 1, Ölçülen Değerler (µg/kg)			Analist 1, Ölçülen Değerler (µg/kg)		
	Konsantrasyon = 1 µg/kg, n=7			Konsantrasyon = 2 µg/kg, n=7			Konsantrasyon = 10 µg/kg, n=7		
Analit	**Ort.**	**SD**	**%RSD**	**Ort.**	**SD**	**%RSD**	**Ort.**	**SD**	**%RSD**
Nadifloksasin	0,9471	0,0912	**9,6**	1,9714	0,1496	**7,5885**	9,7000	0,1414	**1,4580**
Enrofloksasin	0,9057	0,0207	**2,3**	1,8000	0,0577	**3,2075**	9,9857	0,3024	**3,0280**
Danofloksasin	0,9829	0,0840	**8,5**	2,0167	0,1602	**7,9442**	9,8143	0,2340	**2,3844**
Lomefloksasin	0,9457	0,0688	**7,3**	1,8143	0,0690	**3,8035**	9,6286	0,2138	**2,2206**
Pefloksasin	0,9971	0,0983	**9,9**	1,8429	0,1397	**7,5821**	9,9000	0,2582	**2,6081**
Siprofloksasin	0,8929	0,0535	**6,0**	1,7714	0,1254	**7,0766**	9,9143	0,2854	**2,8782**
Enoksasin	0,9729	0,0879	**9,0**	1,9000	0,1000	**5,2632**	9,7857	0,1952	**1,9945**
Difloksasin	0,9700	0,0632	**6,5**	1,8143	0,0900	**4,9592**	9,7000	0,1826	**1,8822**
Orbifloksasin	1,0371	0,1360	**13,1**	1,9143	0,1464	**7,6470**	9,9714	0,1604	**1,6082**
Sparfoksasin	1,0643	0,1029	**9,7**	1,9143	0,1676	**8,7561**	9,7286	0,2870	**2,9503**
Sarafloksasin	1,0100	0,1206	**11,9**	1,8429	0,0535	**2,9005**	9,5571	0,1272	**1,3314**
Fleroksasin	0,9257	0,1196	**12,9**	1,9571	0,1902	**9,7202**	9,8571	0,1813	**1,8389**
Marbofloksasin	1,0229	0,1386	**13,6**	1,9143	0,0690	**3,6048**	9,6286	0,3638	**3,7788**
Oflaksosin	0,9329	0,0256	**2,7**	1,8429	0,1134	**6,1529**	9,6143	0,0378	**0,3931**
Norfloksasin	0,9171	0,1279	**13,9**	1,8286	0,1604	**8,7695**	9,8429	0,2699	**2,7423**
Pazufloksasin	0,9857	0,1081	**11,0**	1,8714	0,0951	**5,0827**	9,9143	0,2035	**2,0530**
Pipemidik asit	0,9543	0,1112	**11,7**	1,9714	0,1254	**6,3587**	9,5857	0,1345	**1,4033**
Sinoksasin	0,8957	0,0315	**3,5**	1,7714	0,0488	**2,7546**	9,8000	0,2887	**2,9457**
Flumekuin	1,1143	0,1069	**9,6**	1,8429	0,0976	**5,2956**	9,8143	0,2035	**2,0739**
Oksolinik asit	0,9986	0,0960	**9,6**	1,9714	0,0488	**2,4751**	9,6286	0,2870	**2,9809**
Nalidiksik asit	1,0286	0,1231	**12,0**	1,7857	0,0378	**2,1166**	9,6857	0,3024	**3,1218**

Tablo 3.16. (Devam) Seyrelt ve enjekte et yöntemi için tekrarüretilebilirlik verileri

	Analist 2, Ölçülen Değerler (µg/kg)			**Analist 2, Ölçülen Değerler (µg/kg)**			**Analist 2, Ölçülen Değerler (µg/kg)**		
	Konsantrasyon = 1 µg/kg, n=7			**Konsantrasyon = 2 µg/kg, n=7**			**Konsantrasyon = 10 µg/kg, n=7**		
Analit	**Ort.**	**SD**	**%RSD**	**Ort.**	**SD**	**%RSD**	**Ort.**	**SD**	**%RSD**
Nadifloksasin	0,9571	0,0976	**10,1960**	1,8286	0,0756	**4,1340**	9,3000	0,1528	**1,6425**
Enrofloksasin	0,9714	0,0951	**9,7917**	1,8000	0,1732	**9,6225**	9,6714	0,1496	**1,5469**
Danofloksasin	0,9000	0,0816	**9,0722**	1,6143	0,0690	**4,2747**	9,8857	0,3805	**3,8487**
Lomefloksasin	0,9429	0,0787	**8,3448**	1,9000	0,1000	**5,2632**	9,8714	0,3498	**3,5439**
Pefloksasin	0,9714	0,0488	**5,0230**	1,7571	0,0976	**5,5539**	9,8571	0,2070	**2,1002**
Siprofloksasin	0,9857	0,0690	**7,0007**	1,8429	0,0976	**5,2956**	9,9429	0,2637	**2,6519**
Enoksasin	0,9571	0,0787	**8,2203**	1,7714	0,0951	**5,3696**	9,7143	0,2854	**2,9375**
Difloksasin	0,9714	0,0951	**9,7917**	1,8571	0,1134	**6,1056**	10,1714	0,2928	**2,8784**
Orbifloksasin	0,9714	0,0951	**9,7917**	1,8143	0,0690	**3,8035**	10,2143	0,4811	**4,7098**
Sparfoksasin	0,9714	0,0488	**5,0230**	1,7143	0,0690	**4,0254**	9,7143	0,1864	**1,9193**
Sarafloksasin	0,9714	0,0756	**7,7816**	1,8143	0,1464	**8,0685**	10,0714	0,2870	**2,8499**
Fleroksasin	0,9000	0,0577	**6,4150**	1,7714	0,0488	**2,7546**	9,9857	0,0690	**0,6911**
Marbofloksasin	0,9857	0,0900	**9,1278**	1,7857	0,1464	**8,1976**	10,1143	0,3388	**3,3494**
Oflaksosin	1,1571	0,0535	**4,6193**	1,6429	0,0787	**4,7892**	9,9286	0,2138	**2,1535**
Norfloksasin	0,9143	0,0690	**7,5476**	1,8714	0,1113	**5,9457**	10,0571	0,4315	**4,2905**
Pazufloksasin	1,3286	0,0951	**7,1595**	1,9286	0,1799	**9,3306**	9,2571	0,6655	**7,1888**
Pipemidik asit	0,8571	0,0787	**9,1793**	1,9571	0,1134	**5,7936**	10,0429	0,5563	**5,5397**
Sinoksasin	0,8857	0,0690	**7,7911**	1,7286	0,1496	**8,6547**	9,9286	0,7342	**7,3948**
Flumekuin	0,9286	0,0756	**8,1408**	1,3714	0,0756	**5,5120**	9,4714	0,2138	**2,2574**
Oksolinik asit	0,9286	0,0756	**8,1408**	1,7571	0,0787	**4,4777**	9,4714	0,4536	**4,7887**
Nalidiksik asit	1,0286	0,0951	**9,2477**	1,8714	0,0756	**4,0393**	9,8143	0,1676	**1,7079**

Tablo 3. 17. QUECHERS yöntemi için tekrarüretilebilirlik verileri

	QUECHERS Metodu								
	Analist 1, Ölçülen Değerler (µg/kg)			**Analist 1, Ölçülen Değerler (µg/kg)**			**Analist 1, Ölçülen Değerler (µg/kg)**		
	Konsantrasyon = 0,5 µg/kg, n=7			**Konsantrasyon = 2 µg/kg, n=7**			**Konsantrasyon = 10 µg/kg, n=7**		
Analit	**Ort.**	**SD**	**%RSD**	**Ort.**	**SD**	**%RSD**	**Ort.**	**SD**	**%RSD**
Nadifloksasin	0,4657	0,0257	**5,5243**	1,9286	0,1704	**8,8373**	9,7571	0,3101	**3,1787**
Enrofloksasin	0,4557	0,0382	**8,3901**	1,8714	0,2138	**11,4249**	9,6000	0,2517	**2,6215**
Danofloksasin	0,4571	0,0170	**3,7282**	1,7714	0,1799	**10,1583**	9,8143	0,2545	**2,5930**
Lomefloksasin	0,5014	0,0318	**6,3514**	2,0857	0,1464	**7,0185**	9,6714	0,2870	**2,9677**
Pefloksasin	0,4700	0,0200	**4,2553**	1,8143	0,1864	**10,2765**	9,7714	0,3592	**3,6764**
Siprofloksasin	0,4971	0,0275	**5,5349**	1,9000	0,1528	**8,0396**	9,6857	0,2545	**2,6274**
Enoksasin	0,4914	0,0285	**5,8067**	1,7429	0,2149	**12,3315**	9,8714	0,2360	**2,3911**
Difloksasin	0,4814	0,0367	**7,6252**	1,9286	0,1890	**9,7991**	9,5857	0,2545	**2,6548**
Orbifloksasin	0,4671	0,0236	**5,0528**	1,7714	0,0756	**4,2673**	9,7286	0,2870	**2,9503**
Sparfoksasin	0,4943	0,0336	**6,7965**	1,9286	0,1604	**8,3148**	9,8857	0,2673	**2,7035**
Sarafloksasin	0,4614	0,0324	**7,0145**	1,7571	0,1134	**6,4531**	9,8429	0,2992	**3,0398**
Fleroksasin	0,4914	0,0389	**7,9185**	1,9000	0,2309	**12,1547**	9,7571	0,2637	**2,7024**
Marbofloksasin	0,4643	0,0251	**5,4000**	1,8714	0,2059	**11,0005**	9,6429	0,3645	**3,7800**
Oflaksosin	0,4886	0,0234	**4,7897**	1,8571	0,2299	**12,3796**	9,9714	0,2289	**2,2952**
Norfloksasin	0,4786	0,0348	**7,2814**	1,8286	0,1496	**8,1814**	9,4714	0,1254	**1,3235**
Pazufloksasin	0,4857	0,0364	**7,5043**	1,9714	0,2138	**10,8454**	9,5857	0,1069	**1,1152**
Pipemidik asit	0,4657	0,0162	**3,4750**	1,8714	0,1113	**5,9457**	9,8000	0,3512	**3,5836**
Sinoksasin	0,4943	0,0336	**6,7965**	1,9571	0,2149	**10,9813**	9,8857	0,3078	**3,1139**
Flumekuin	0,4657	0,0162	**3,4750**	1,7571	0,1813	**10,3159**	9,7571	0,2936	**3,0089**
Oksolinik asit	0,4786	0,0344	**7,1807**	1,9143	0,1676	**8,7561**	9,7571	0,4036	**4,1360**
Nalidiksik asit	0,4629	0,0206	**4,4477**	1,8000	0,2160	**12,0014**	9,7571	0,3155	**3,2333**

Tablo 3.17. (Devam) QUECHERS yöntemi için tekrarüretilebilirlik verileri

	Analist 2, Ölçülen Değerler (µg/kg)			Analist 2, Ölçülen Değerler (µg/kg)			Analist 2, Ölçülen Değerler (µg/kg)		
	Konsantrasyon = 0,5 µg/kg, n=7			Konsantrasyon = 2 µg/kg, n=7			Konsantrasyon = 10 µg/kg, n=7		
Analit	**Ort.**	**SD**	**%RSD**	**Ort.**	**SD**	**%RSD**	**Ort.**	**SD**	**%RSD**
Nadifloksasin	0,5371	0,0395	**7,3464**	1,8143	0,2193	**12,0877**	9,7714	0,3039	**3,1105**
Enrofloksasin	0,4900	0,0535	**10,9268**	2,4000	0,2000	**8,3333**	9,6714	0,3729	**3,8556**
Danofloksasin	0,5029	0,0435	**8,6465**	2,3571	0,2370	**10,0565**	9,6714	0,1113	**1,1505**
Lomefloksasin	0,5071	0,0515	**10,1643**	2,2286	0,1496	**6,7129**	9,9857	0,4845	**4,8522**
Pefloksasin	0,5057	0,0547	**10,8221**	1,9286	0,2059	**10,6746**	9,7714	0,3402	**3,4813**
Siprofloksasin	0,5129	0,0613	**11,9518**	1,9000	0,1528	**8,0396**	9,5857	0,0900	**0,9386**
Enoksasin	0,4957	0,0556	**11,2232**	2,2571	0,2440	**10,8090**	9,8000	0,5416	**5,5266**
Difloksasin	0,4986	0,0398	**7,9750**	2,1429	0,2820	**13,1600**	9,6000	0,1732	**1,8042**
Orbifloksasin	0,5671	0,0256	**4,5200**	2,1143	0,1676	**7,9278**	9,8857	0,4776	**4,8311**
Sparfoksasin	0,4843	0,0276	**5,6997**	2,0857	0,1773	**8,4998**	9,8714	0,2628	**2,6619**
Sarafloksasin	0,4971	0,0668	**13,4291**	2,1000	0,2160	**10,2869**	9,7429	0,3690	**3,7878**
Fleroksasin	0,5014	0,0567	**11,3066**	1,8143	0,1574	**8,6733**	9,7286	0,3861	**3,9684**
Marbofloksasin	0,4814	0,0498	**10,3461**	2,2571	0,2370	**10,5020**	9,8429	0,2992	**3,0398**
Oflaksosin	0,5157	0,0519	**10,0668**	1,9429	0,2936	**15,1108**	10,0429	0,4504	**4,4847**
Norfloksasin	0,5186	0,0521	**10,0466**	2,1143	0,2268	**10,7260**	9,5857	0,2193	**2,2878**
Pazufloksasin	0,4743	0,0443	**9,3390**	2,1286	0,2628	**12,3449**	9,8429	0,2992	**3,0398**
Pipemidik asit	0,5186	0,0511	**9,8598**	2,2571	0,1813	**8,0307**	10,0857	0,3625	**3,5945**
Sinoksasin	0,5014	0,0636	**12,6879**	2,1571	0,2440	**11,3101**	9,6429	0,1512	**1,5679**
Flumekuin	0,4771	0,0390	**8,1812**	1,8857	0,1215	**6,4431**	10,0571	0,4721	**4,6940**
Oksolinik asit	0,5200	0,0507	**9,7427**	2,1286	0,2812	**13,2086**	9,9000	0,3606	**3,6420**
Nalidiksik asit	0,5414	0,0380	**7,0273**	1,9714	0,1704	**8,6452**	10,0000	0,4320	**4,3205**

Tablo 3. 18. Sistem tekrarlanabilirliği sonuçları

	10 µg/kg seviyesinde Ölçülen Alanlar												
	1.ölçüm	**2.ölçüm**	**3.ölçüm**	**4.ölçüm**	**5.ölçüm**	**6.ölçüm**	**7.ölçüm**	**8.ölçüm**	**9.ölçüm**	**10.ölçüm**	**Ort.**	**SD**	**%RSD**
Nadifloksasin	27054	27198	27559	27069	27490	27470	27846	27272	27587	27103	27364,8	265,50782	**0,970253**
Enrofloksasin	39575	38977	38960	39556	39888	39527	39094	39556	39233	38998	39336,4	324,68419	**0,825404**
Danofloksasin	39785	39797	39424	39878	39587	39585	39829	39785	39930	39034	39663,4	270,27032	**0,68141**
Lomefloksasin	30174	30711	30927	30959	30309	30150	30576	30732	30383	30975	30589,6	319,96882	**1,046005**
Pefloksasin	59877	59408	59380	59790	59152	59286	59304	59678	59337	59865	59507,7	267,76733	**0,449971**
Siprofloksasin	33784	33737	33617	33342	33460	33806	33449	33501	33170	33314	33518	214,36521	**0,639553**
Enoksasin	51318	52165	52055	52745	52839	52148	52304	51973	52138	52533	52221,8	432,12005	**0,827471**
Difloksasin	40241	40721	40434	40180	40436	40203	40101	40488	40356	40383	40354,3	181,49628	**0,449757**
Orbifloksasin	21133	21196	21212	21020	21949	21579	21464	21811	21875	21040	21427,9	356,92341	**1,665695**
Sparfoksasin	31509	31347	31687	31569	31602	31953	31347	31778	31527	31411	31573	192,89779	**0,610958**
Sarafloksasin	29923	29248	29678	29402	29714	29783	29666	29210	29740	29676	29604	236,09744	**0,797519**
Fleroksasin	49804	50180	49333	49398	49194	49623	49693	49875	49023	49501	49562,4	344,53518	**0,695154**
Marbofloksasin	40534	40070	40553	40582	40071	40284	40119	40617	40212	40941	40398,3	290,42729	**0,71891**
Oflaksosin	62377	62565	62758	62733	62440	62966	62916	62896	62898	62015	62656,4	305,47857	**0,487546**
Norfloksasin	86900	86671	86913	86240	86257	85956	86572	86016	86428	86877	86483	359,97809	**0,416241**
Pazufloksasin	4667	4664	4676	4671	4642	4688	4663	4624	4661	4672	4662,8	18,017276	**0,386405**
Pipemidik asit	30710	30654	30911	30521	30323	30437	30769	30517	30072	30782	30569,6	249,30847	**0,815544**
Sinoksasin	71801	71092	71689	71866	71792	71183	71069	71071	71377	71132	71407,2	341,03301	**0,477589**
Flumekuin	29389	29216	29062	29813	29491	29906	29314	29848	29588	29545	29517,2	280,9147	**0,951698**
Oksolinik asit	48327	48064	48591	48806	48194	48366	48370	48972	48839	48917	48544,6	323,5457	**0,666492**
Nalidiksik asit	80926	80190	80030	80168	80979	80940	80996	80974	80732	80357	80629,2	395,78047	**0,490865**

3.1.3.6. Sağlamlık (Ruggedness) sonuçları

Tablo 3. 19. Sağlamlık **(Ruggudness)** çalışması verileri

		Kolon Fırın Sıcaklığı (°C) Etkisi (Pik Alan Sonuçları)					Akış Hızı (mL/dak.) Etkisi (Pik Alan Sonuçları)					
Analitler	**40 °C**	**30 °C**	**50 °C**	**Ort.**	**SD**	**% RSD**	**0,4 mL/dak.**	**0,36 mL/dak.**	**0,44 mL/dak.**	**Ort.**	**SD**	**% RSD**
Norfloksasin	3031	3025	3125	3060,3	56,0833	**1,83259**	3031	2962	3012	3001,67	35,64174	**1,1874**
Pazufloksasin	16154	16255	15982	16130	138,03	**0,85572**	16154	16521	15984	16219,7	274,4564	**1,69212**
Pipemidik asit	14109	13964	14254	14109	145	**1,02771**	14109	14256	14123	14162,7	81,13158	**0,57286**
Sinoksasin	42516	42569	41986	42357	322,386	**0,76112**	42516	41965	42156	42212,3	279,7862	**0,66281**
Flumekuin	15779	16257	15789	15942	273,132	**1,71332**	15779	15789	15954	15840,7	98,27682	**0,62041**
Oksolinik asit	41555	41665	40968	41396	374,717	**0,9052**	41555	41256	41126	41312,3	219,978	**0,53248**
Nalidiksik asit	70571	70258	69869	70233	351,685	**0,50074**	70571	69548	70024	70047,7	511,9105	**0,7308**
Nadifloksasin	67050	67895	68521	67822	738,212	**1,08846**	67050	66985	67856	67297	485,1979	**0,72098**
Enrofloksasin	5220	5124	5226	5190	57,2364	**1,10282**	5220	5126	5147	5164,33	49,33896	**0,95538**
Danofloksasin	4512	4469	4587	4522,7	59,7188	**1,32043**	4512	4496	4524	4510,67	14,04754	**0,31143**
Lomefloksasin	12232	11965	12456	12218	245,814	**2,01195**	12232	12054	12245	12177	106,7193	**0,8764**
Pefloksasin	11286	10986	11235	11169	160,521	**1,4372**	11286	11215	10924	11141,7	191,8185	**1,72163**
Siprofloksasin	4430	4436	4398	4421,3	20,4287	**0,46205**	4430	4365	4456	4417	46,87217	**1,06118**
Enoksasin	8234	8124	8265	8207,7	74,0968	**0,90278**	8234	8146	8245	8208,33	54,26171	**0,66106**
Difloksasin	9593	9468	9562	9541	65,0922	**0,68224**	9593	9469	9514	9525,33	62,77207	**0,659**
Orbifloksasin	8103	8154	8145	8134	27,2213	**0,33466**	8103	8115	8125	8114,33	11,01514	**0,13575**
Sparfoksasin	5190	5296	5345	5277	79,2275	**1,50137**	5190	5146	5178	5171,33	22,74496	**0,43983**
Sarafloksasin	7053	7041	7145	7079,7	56,8976	**0,80368**	7053	6985	7125	7054,33	70,00952	**0,99243**
Fleroksasin	31728	31256	30689	31224	520,223	**1,66608**	31728	30952	31540	31406,7	404,8177	**1,28895**
Marbofloksasin	25086	25500	25624	25403	281,726	**1,10901**	25086	24956	25016	25019,3	65,06407	**0,26006**
Oflaksosin	15049	14965	15046	15020	47,655	**0,31728**	15049	14965	15145	15053	90,06664	**0,59833**

3.1.3.7. Sağlamlık (Robustness) sonuçları

Tablo 3. 20. Sağlamlık **(Robustness)** çalışması verileri

	Seyrelt ve Enjekte Et Metodu (% Geri Kazanım)		QUECHERS (%Geri Kazanım)	
	Kolon / Cihaz / Analist	Kolon / Cihaz / Analist	Kolon / Cihaz / Analist	Kolon / Cihaz / Analist
Analitler	**Kolon-1 / Cihaz-1 / Analist-1**	**Kolon-2 / Cihaz-2 / Analist-2**	**Kolon-1 / Cihaz-1 / Analist-1**	**Kolon-2 / Cihaz-2 / Analist-2**
Nadifloksasin	99,6	99,2	99,6	99,2
Enrofloksasin	99,5	99,8	99,4	99,5
Danofloksasin	99,2	99,7	99,5	99,7
Lomefloksasin	99,6	99,5	99,8	99,6
Pefloksasin	99,8	99,6	99,6	99,4
Siprofloksasin	99,4	99,7	99,5	99,5
Enoksasin	99,6	99,5	99,2	99,5
Difloksasin	99,2	99,6	99,8	99,6
Orbifloksasin	99,7	99,4	99,6	99,8
Sparfoksasin	99,5	99,7	99,7	99,2
Sarafloksasin	99,2	99,6	99,5	99,6
Fleroksasin	99,5	99,5	99,4	99,6
Marbofloksasin	99,2	99,4	99,6	99,1
Oflaksosin	99,6	99,5	99,8	99,4
Norfloksasin	99,4	99,6	99,2	99,6
Pazufloksasin	99,5	99,4	99,6	99,7
Pipemidik asit	99,8	99,7	99,7	99,5
Sinoksasin	99,6	99,6	99,8	99,8
Flumekuin	99,4	99,7	99,5	99,4
Oksolinik asit	99,6	99,5	99,2	99,6
Nalidiksik asit	99,7	99,8	99,6	99,2

3.1.4. Bal numunelerinin analiz sonuçları

Analiz sonuçları **EK-B**, **Tablo B.1.**'de belirtilmiştir.

3.2. Tartışma

3.2.1. Metot optimizasyonu

Herhangi bir analitik yöntemi optimize etmek için, analiz performansını etkileyen farklı deneysel koşullar, makul bir çalışma süresi içinde optimum ayırma ve tespit koşullarını elde etmek için test edilmelidir. Bu tezde, hareketli faz tipi ve kombinasyonu, mobil faz akış hızı, gradyan profili, analitik kolon tipi, numune hazırlık süreçleri, **Bölüm 2.3.1'de** verilen koşullar altında deneysel parametreler olarak test edildi.

3.2.2. Mobil faz içeriğinin belirlenmesi

3.2.2.1. Mobil faz modifiye edicilerinin etkileri

MeOH ve ACN, özellikle ters fazlı sıvı kromatografisinde, hareketli fazda organik modifiye edici olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır, bu nedenle her iki çözücü aynı koşullardaki floksasin elüsyonu için test edilmiştir. Çalışmada Asetonitrilin, zayıf çözücü olan su ile farklı kombinasyonları ve gradyan denemeleri, birbirine yakın polaritelerdeki ve kalabalık bir grupta yer alan 21 adet floksasin antibiyotik parametresinin kromatografik ayrımında yeterli başarıya ulaşamamıştır. Analiz süreinin kısalması düşük sistem basıncı gibi avantajları olmasına karşın, asetonitril pazufloksasin ve pipemidik asit gibi floksasinleri ayrımını ve pik alanlarını kötü yönde etkilemiş olup, ayrıca metotta belirlenmiş amonyum format içinde gradyan esnasında iyi bir çözücü olmamaktadır. Analiz süresini kısaltması avantaj gibi gözükse de MS sistemi üzerinde yer alan valfin atık konumunda analize başlatarak bal kaynaklı şeker, enzim, balmumu gibi girişime ve iyonizasyon baskılamaya sebep olacak maddelerin atığa gönderilmesi için gereken süreyi fazla geriye çekmektedir. Buda sistemin kirlenmesine sebep olmaktadır. Bu sebeplerden metanol, UPLC / Tandem MS'de kullanılan mobil faz için organik bir modifiye edici olarak seçilmiştir. Uygulanmasına karar verilen metanol su gradyanında kullanılacak zayıf (su) ve güçlü (MeOH) mobil fazlara, iyonlaşmayı ve pik simetrilerini arttıracak, rezolüsyonu bozmayacak ya da daha iyi hale getirecek bazı

modifiye edici ajanlar eklenerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Hidrojen donör olarak, uçucu özellikteki asitlerden asetik asit ve formik asit eşit konsantrasyonlarda mobil fazlara ilave edilmiş ve formik asidin kinolon analitlerinin iyonlaşma derecelerine olumlu katkısı gözlemlenmiştir. Zayıf çözücü olarak kullanılan suya %0,005 derişiminde ilave edilen formik asidin oluşturduğu pH değerinin sabitlenmesi ve sinyal gücünü arttırma özelliğinden ötürü uçucu özellikteki amonyum format tamponu 0,5 M derişiminde ilave edilmiş ve nihai mobil faz çiftine karar verilmiştir.

3.2.3. Gradyan profilinin seçimi

Floksasinler için metotta 4 farklı gradyan opsiyonu en ideal kromatografik ayrımı elde edebilmek için denenmiş olup, Başlangıç koşulu %10 metanol olarak sabitlenmiştir. Burada %90 metanole çıkılan gradyan adımının eğimi test edilmiş olup, en kısa analiz süresini en ideal ayrım ile sağlayan açı yakalanmaya çalışılmıştır. Alıkonma sürelerinin mümkün olduğu kadar az, fakat rezolüsyonun ve piklerdeki bant genişliğinin az olması gözetilmiş olup, maksimum alan her bir floksasin için elde edilmeye çalışılmıştır. Başlangıç mobil faz kombinasyonunun optimizasyonu, mobil fazdaki organik modifikatörün (%MeOH) oranının %5 ila %15 aralığında arttırılmasıyla gerçekleştirildi. Sonuçlar, metanolün artmasının mobil fazın polaritesini azalttığını, diğer bir deyişle hidrofobikliğini arttırdığını açıkça ortaya koymuştur.

MS metodunda yer alan floksasinlerin bir kısmı kuvvetli hidrofobik etki göstermekte iken (Nalidiksik asit) diğer bir grup polar özelliği baskın olarak değerlendirilebilmektedir (enrofloksasin, siprofloksasin gibi.) Bunun dışında kalan parametreler ise orta polaritede olup diğer floksasinlere göre daha problemsiz ve organik faz yüzdesinden nispeten daha az etkilenen bileşenlerdir. (pipemidik asit, sparfloksasin gibi.) Bu nedenle mobil faz hidrofobiklik derecesi, sistemde kullanılan MS valfin atık konumunda çalışmaya başlayıp, girişim yapacak maddelerin tamamı ile sistemden uzaklaştırıldığına emin olacak süre kadar açık kalmasına izin verecek yüzdede olmak durumundadır. Yani en erken elüe olan mobil fazın apolarlık derecesinden en fazla etkilenen maddenin mümkün olduğunca geç elue olmasını sağlayan bir gradyan başlangıç yüzdesi seçilmelidir. Burada yapılan çalışmalarda %10 metanol ile başlamak en erken elüe olan enrofloksasin pikinin sistemde 2 dakikayı aşkın süre kolonda tutunarak kalabildiğini göstermekte olup, bu süre valfin 2 dakika kadar

atık konumunda kalabilip, girişim yapacak maddelerden kurtulmamız için yeterli bir süre olduğunu göstermektedir.

3.2.4. Akış hızının seçimi

Gradyan sisteminin akış hızının arttırılması, analit ile kolon katı fazı arasındaki etkileşim süresini azaltacaktır. Sonuç olarak, floksasin alıkonma süresinin ve teorik plaka sayısının azaltılması akış hızının artmasıyla elde edilmiştir (Bkz.Tablo 3.2). Fakat yüksek miktardaki akış hızı analiz süresini azaltsada, normal koşullarda yüksek seyreden UPLC sistem basıncının dahada artmasına sebep olacaktır. Buda hem kolon ömrünü hemde metot tekrarlanabilirliğini olumsuz etkileyen bir durum olmaktadır. Aynı zamanda yüksek mobil faz akışı piklerin alanlarında da kısmen azalmalara sebep vermektedir. Bu sebepten analiz süresini fazla uzatmayan, yüksek teorik plakasa sayısı oluşturan ve makul bir sistem basıncı veren 0,4 mL/dak.'lık mobil faz akış hızı metot için seçilmiştir.

3.2.5. Analitik kolon seçimi

Metot geliştirme sırasında kolonların kararlılığı, yüksek teorik plaka sayısı vermesi, pik simetrisi, düşük metal kirliliği, polar maddeler ile minimum etkileşim vermesi ve kuyruklanma etkisinin az olması, tekrarlanabilirliği ve analiz edilecek bileşenler ile uyumlu bir kimyaya sahip olması başlıca değerlendirilen parametrelerdir. C18 fazlar, floksasinler için genelde tercih edilmekte olup 21 adet parametre için yeterli ayrımı ve diğer değerlendirme kriterlerini sağlayabilmektedir. Kolonun uzunluğu, iç çapı ve dolgu malzemesi parçacık boyutu, numune analitlerini ayırmak için yöntemin verimliliğini etkileyen diğer faktörlerdir. Van Deemter denklemine göre, daha küçük kolon dolgu malzemesi partikül boyutu (1,7 µm), HETP'yi önemli ölçüde azaltabilir ve mobil fazın daha düşük akış hızlarında daha yüksek ayırma verimliliğine neden olabilmektedir. UPLC enstrümanı ile kullanılan ilk kolon uzunluğu 50 mm olan ve iç çapı 2,1 mm olan ve 1,7 µm parçacık boyutlu AcQuity BEH C18 idi. BEH (köprülü etil hibrid) teknolojisinin 1,7 µm parçacıklarının kolonları, silis matriksindeki metil gruplarını birbirine bağlayarak güçlendirilmiş mekanik stabilitesini türetmektedir. Bu kolonlar aynı zamanda yüksek verimlilik (daha kısa sürede yeterli çözünürlük ile daha dar ve yüksek pikler) sağlamakta ve uzun bir pH aralığı boyunca çalışabilmektedir. Yöntem

optimizasyonu sırasında aynı kolon kimyasına sahip farklı uzunluklarda kolonlar test edildi fakat analiz süresini gereksiz uzatmasından ötürü yeterli rezolüsyonu ve stabiliteyi sağlamasına karşın tercih edilmedi. Bunun yanı sıra AcQuity HSS T3 ve Acquity C18 SB gibi farklı kimyaya sahip kolonlarda test edildi fakat BEH C18'de elde edilen pik alıkonma süreleri ve ayrım kolon uzunlukları yüksek olmasına rağmen elde edilemedi. Böylece, 50 mm uzunluğundaki Acquity BEH C18 kolon, yöntem geliştirme, doğrulama ve numune analizi sonraki adımlarında kullanıldı.

3.2.6. Farklı kolon fırını sıcaklıklarının etkisi

Çalışmalarda oda sıcaklığını temsilen 20°C, yüksek sıcaklık olarak 40°C ve orta derece olarak 30°C sıcaklıklar test edilmiş olup, UPLC sistemi olması dolayısı ile en kısa sürede en ideal pik şeklini kabul edilebilir basınçta sağlayan 40°C ideal kromatografik ayrımı sağlamıştır. Sıcaklık etkisinin sadece alıkonma süresine etki ettiği ve 40°C daha düşük işletim basınçlarında daha kısa süreli analiz imkânı sağladığı gözlemlenmiştir.

3.2.7. Enjeksiyon hacminin etkileri

Geliştirilen seyreltme ve enjekte etme ön hazırlık metodu için 15 µl, Quechers metodu için ise 20 µl olarak karar verilmiştir. Yüksek miktarda hacimler piklerde bant genişlemesine, asimetriye sebebiyet verebildiği gibi pik alanlarında da doğrusal bir artış gözlemlenmemiştir. Yüksek hacimde numuneyi sisteme göndermek, seyreltme metodunda herhangi bir temizleme işlemi uygulanmadığından ötürü, yüksek miktarda partikül veya girişim sebebi olan maddeleri kolona gönderebilme riskini taşımaktadır. Quechers metodunda daha düşük limitlere inebilme ve numunenin temiz olması durumundan ötürü 20 µl bu metot için tercih edilmiştir. Tüm bu sebeplerden LC-MS sistemleri için ideal olan 10-20 µl aralığında enjeksiyon hacimleri geliştirdiğimiz metotlar için de uygun gözükmektedir.

3.2.8. Tandem MS metot optimizasyonu sonuçları

Tarama çalışmasında öncelikli olarak Parent iyon (Ana iyon) tespit edilmiş olup tüm kinolon bileşikleri için yalancı moleküler iyon (pseudomoleculer ion) hidrojen atomu eklenmiş formda en yüksek iyonlaşma derecesini göstermektedir. Her bir florokinolon bileşeni için belirlenmiş olan ana iyonlar farklı cone voltaj ve çarpışma enerji

gradyanları uygulanarak maksimum sinyal verebildiği değerler tespit edilmiştir. Kantitasyon ve konfirmasyon amaçlı toplamda minimum 3 farklı parçalanma ürünü her bir kinolon ana iyonu için seçilmiş ve MRM metodu 21 farklı kinolon için oluşturulmuştur. Maksimum sinyal tüm florokinolonlar için 1 kV değerinde kapiler voltaj ile elde edilebilmiştir. 450 °C desolvatasyon sıcaklığına ve 850 L/saat azot gazı akış hızına, metotta en yüksek sinyal üretebilmek üzere tercih edilmiştir.

3.2.9. Kütle spektrometresi valf program optimizasyon sonuçları

Yapılan valf programı optimizasyonu sonucunda şeker ve diğer suda çözünebilen girişim kaynağı olabilecek maddeler 1,90 dakika süresince atığa gönderilirken, kinolon antibiyotikleri kolonda alıkonmuş şekilde valf programının 2. basamağı olan 1,30. dakikaya kadar analitik kolonda beklemektedir. Devamında 1,90. dakika sonrasında valfin MS'e enjekte etme pozisyonu alması ve eşzamanlı olarak gradyan profilinde metanol konsantrasyonunun artması ile birlikte kinolon bileşenleri MS'te sinyal verebilecek konumda kolondan elue edilmiştir. Bu uygulama sayesinde tekrarlanabilir sonuçlar herhangi bir cihaz ya da kolon kirliliğine sebep olmadan elde edilebilmiştir.

3.2.10. Numune hazırlık optimizasyon sonuçları

3.2.10.1. Seyrelt ve enjekte et metodu

Kullanılacak reaktifte EDTA'yı antişelatlaştırıcı olarak kullanmak, kinolon bileşenleri ile metallerin kompleks oluşumunu engellemesinden ötürü ekstraksiyon geri kazanım değerlerini arttırmaktadır. Bunun yanı sıra EDTA içeren reaktifin ekstraksiyonun pH değeri açısından da nötre yakın olması kinolonların stabilitesi ve çözelti içinde iyonlaşmasını baskılamak açısından avantaj yaratmaktadır. Yapılan denemelerde reaktifin pH değerinin 5,0, 6,0 değerlerinde fazla fark yaratmadığı, fakat pH 4,0, ve pH 7,0, değerlerinde nispeten düşük geri kazanımlar elde edildiği gözlemlenmiştir. %10 MeOH reaktifi herhangi bir pH ayarı olmadan ve antişelatlaştırıcı etkisi olmadan kullanıldığında yine düşük geri kazanımlar verdiği, okzalik asit ile düşük pH (1,8) değerinde ise geri kazanımların en kötü değerlerde seyrettiği gözlemlenmiş olup, tüm bu sebeplerden EDTA Mcilvaine Tamponu pH 6,0 değerinde tercih edilmiştir. Kullanılacak reaktif miktarı ise, reaktifin ekleneceği matriks olan balın vizkozitesini,

şırınga filtresinden fazla geri basınç yaratmadan geçebilecek ve otoörnekleyiciler tarafından rahatlıkla, tekrarlanabilir şekilde enjeksiyon yapılabilecek seviyeye getirebilecek miktarda olması gerekmektedir. Seyreltme miktarı dedeksiyon limitini de tolere edebilecek düzeyde olup, fazla miktarlar numuneyi çok seyreltik hale getirip istenilen miktarların dedeksiyonuna engel teşkil edebilmektedir. Yapılan denemeler sonucunda 7,9 mL reaktif hacmi vizkozite ve metot hassasiyeti açısından makul gözükmektedir.

3.2.10.2. Quechers metodu

Maksimum hassasiyet yakalayabilmek adına yüksek bir gramaj seçilmiş olup (5 g) sulandırma ve homojenize etme prosedürü 1'e 2 şeklinde 10 mL su ile optimize edilmiştir. Etil asetat ve asetonitril ekstraksiyonlarından, asetik asitli asetonitril ile 15 mL ile en yüksek geri kazanımı sağlamıştır. Salting out basamağında sıklıkla kullanılan magnezyum sülfat ve sodyum asetat tuz kombinasyonu tercih edilmiş olup karar verilen gramaj kit ile birlikte tedarik edilen 6 g $MgSO_4$ ve 1,5g NaOAc şeklindedir.

Ekstraksiyon sonrası oluşan üst fazı temizleme aşamasında ise PSA, C18, MgSO4 materyalleri ve karışımları denenmiş olup en ideal sonuç kit ile tedrik edilen, Bond Elut QuEChERS Dispersif Katı Faz Ekstraksiyon (**1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA, 15** mL) ile elde edilmiştir. Burada C18 içeriği numunede daha iyi bir temizlik sağlamış olsada kinolonlarda kısmı bir geri kazanım kaybı yaşatmıştır. Balın temel bileşeni olan şeker eliminasyonu için PSA (primer sekonder amin) elzem olmak ile birlikte kalıntı halinde son aşamaya kadar gelebilen ve uçurma prosedüründe zorluk yaşamaya sebep olabilecek suyun uzaklaştırılması için $MgSO_4$, temizleme aşamasında tercih edilmiştir. Uçurma basamağı herhangi bir numune kaybı yaşamamak adına maksimum 40°C'de azot akımı altında gerçekleştirilmiş olup, kurutulmuş numune mobil faz A ve saf su karışımı ile ultrasonik banyoda çözülmüş ve herhangi bir partikülün kolona ve sisteme gitmemesi için filtreleme işlemi yapılmıştır.

3.2.11. Metot validasyon sonuçları

3.2.11.1. Seçicilik

Bu çalışmada, Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyon-Tandem Kütle Spektrometresi (UPLC-ESI-MS/MS) kullanılarak 21 adet floksasinin ballarda tayini için geçerli bir yöntem geliştirilmiştir. Metotta, Floksasin bileşenleri için pozitif polarizasyonlu iyonizasyon modunda mobil faz ile elverişli bir ortam oluşturulan ve her bir bileşen için hidrojen adduct formunda iyonlaşmış +1 değerlikli floksasin yalancı moleküler iyonları meydana getirilmiştir. ($(M+H)^+$) Kullanılan çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu ile herbir moleküler iyon en az 3 parçalanma ürünü üzerinden takip edildi ve metodun seçiciliği arttırıldı. Argon gazı yardımı ile collisionaly activated dissociation (CAD) her bir floksasin için oluşturulan ana iyon üçer farklı fragment ürünü vermiş ve bu ürünler floksasinler için MRM tablosuna girilmiştir. Kantitatif analiz için her bir analit ait karakteristik olan teşhis edici ürün iyonlarını seçmek gerekmektedir. Oluşan fragment iyonlardan maksimum değere sahip olanı tespit edebilmek için argon dolu hücrede (collisionaly activated dissociation (CAD) çarpışma enerjisi optimize edildi. Elde edilen kromatogramlarda, ilgili analitlerin piklerinin iyi bir çözünürlüğe sahip olduğu ve herhangi bir matriks veya numune bileşenlerinin herhangi bir girişime sebep olmadığı görülmektedir. Bu sebepten metot yeterince spesifiktir denebilmektedir.

3.2.11.2. Hassasiyet (LOD & LOQ)

Floksasinlerde, LOD ve LOQ değerlerini belirlemek için Sinyal/Gürültüye oranı yöntemini kullanarak, yöntemin 2 ayrı numune hazırlığı için peşi sıra azaltılan bir konsantasyon aralığında enjeksiyon verilmiştir. Her bir bileşenin ve her fragment iyon için geçerli olan Sinyalin/gürültü oranının minimum 3 olduğu konsantrasyon belirlenmiş olup bu seviyede LOD ve sinyal/gürültü oranının minimum 10 olduğu konsantrasyonda ise LOQ çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen LOQ değerleri, Quechers için 0,5 ppb ve seyrelt ve enjekte et metodu için 1 ppb'dir. Balda herhangi bir MRL değeri bulunmayan kinolon kalıntılarının analizi için 0,5 ve 1 ppb değerleri laboratuvarlarca kullanılabilecek maksimum kalıntı performans limiti (MRPL) açısından oldukça hassas olarak adledilebilir.

3.2.11.3. Aralık ve doğrusallık

Metotta her iki yöntem için de yapılan aralık ve doğrusallık çalışmalarında matriks eşleşmiş yöntem ile çizdirilen kalibrasyon grafikleri değerlendirilmiştir. 21 Floksasin parametresi için yapılan 6 noktalı kalibrasyon çalışmalarında elde edilen kalibrasyon eğirisi verileri her iki yönem içinde değerlendirilmiş olup, her bir floksasin için 2 mettota da minumum R^2=0.99 regasyon katsayısı değeri elde edilebilmiştir. Yöntem konsantrasyonların test aralığında her iki hazırlık metodu için de doğrusaldır denilebilmektedir.

3.2.11.4. Doğruluk

Aynı gün içerisinde floksasinler için üç farklı konsantrasyon 2 farklı metot için doğruluk çalışması için değerlendirilmiştir. Sertifikalı referans madde temini mümkün olmadan içerisinde floksasin antibiyotiği barındırmayan bal numunelerine bilinen 3 farklı derişimde standart eklenmiş ve bunların saf standartlarla oluşturulmuş kalibrasyon grafiklerine karşı okunmuş değerlerinden elde edilen %RSD ve ortalama değerlerinin yüzdesel değeri, doğruluk çalışması için gözetilmiştir. Her bir seviye için 7 tekrarlı çalışma yapılmıştır. Floksasin bileşenlerinin Quechers yöntemi için geri kazanım (doğruluk) değerlerinin %82,86 ile %117,855 arasında olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde yapılan çalışmada seyrelt ve enjekte et metodu için floksasin doğruluk derecelerinin %85,705 ile %112,86 arasında olduğu gözlemlenmektedir.

3.2.11.5. Kesinlik

Hem gün içindeki hem de günler ve analistler arası kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik) çalışmaları, doğruluk çalışmalarında incelenen üç konsantrasyon üzerinde yapıldı ve metotların yüksek derecede tekrarlanabilir olduğu gözlemlendi. Değerlendirme kriteri olarak alınabilecek Relatif standart sapmanın değerleri (%RSD), Floksasin bileşenlerinin tümü için her iki metot ile gün içi tekrarlanabilirlikte %13,2 ile %0,7 arasında seyretmekte olup, tekrarüretilebilirlik çalışmalarının her iki metot için değerlendirilen %RSD değerleri %13,6 ile %0,39 aralığında seyretmektedir. Kesinlik çalışmalarının sağlıklı koşullarda yapılması ve doğru yorumlanabilmesi için, çalışma öncesinde yapılan sistem tekrarlanabilirliği çalışmalarında ise %RSD değerleri

beklendiği gibi %2,0 nin altında tespit edilebilmiştir. Maksimum değer %1,66 RSD ile Orbifloksasinde gözlemlenmiştir.

3.2.11.6. Sağlamlık (Ruggedness)

Gerçekleştirilen sağlamlık çalışmalarının birinci ayağında, 2 farklı analist 2 farklı cihazda aynı türden fakat farklı lot numaralı uygulamaları aynı metot ile gerçekleştirmiş ve geliştirilen her iki yönteminde bu değişikliklerden etkilenmediği ve stabil kaldığı %RSD değerlerindeki anlamlı olmayan farklılıkları dolayısı ile tespit edilmiştir. Maksimum değer %1,69, %RSD değeri ile pazufloksasinde elde edilmiştir.

3.2.11.7. Sağlamlık (Robustness)

Gerçekleştirilen sağlamlık çalışmalarının ikinci ayağında ise, metot parametreleri kasıtlı olarak değiştirilmiş olup, geliştirilen yöntemlerin güvenilirliği doğrulanmıştır. Yapılmış olan çalışmalarda, kolon fırını sıcaklık değerleri ± 10°C (30°C ve 50°C) ve akış oranında ±%10 (0.360 ve 0.440 mL/dak.) değişiklikler uygulandı ve sonuçların değişkenliği geri kazanım üzerinden değerlendirmeye alınmış ve metodun orjinal şartlar ile kasıtlı değişiklikler arasında stabil kalabildiği ve sağlam olduğu doğrulanmıştır. Elde edilen geri kazanım değerlerinin tümü %99 üzerindedir.

3.2.12. Analiz edilen bal numune sonuçları

Geliştirilen yöntem valide edildikten sonra, bal örneklerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Narenciye (4 adet), Kestane (4 adet), çam (13 adet) ve çiçek (29 adet) ballarından oluşan toplam 50 adet örnek analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar, EK B, Tablo B.1.'de belirtilmiştir. Numuneler, çalışma kapsamında geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmış olan seyreltme ve enjeksiyon yöntemi analiz edilmiş olup, kalıntı yönünden pozitif çıkan numuneler modifiye edilmiş ve validasyonu tamamlanmış olan Quechers yöntemi ile tekrar analiz edilerek doğrulaması yapılmıştır. Quechers metodu için belirlenmiş olan LOQ değeri (0,5 µg/kg) üzerinde çıkan numuneler, kalıntı açısından pozitif olarak belirtilmiştir. Çalışılan örneklerde ağırlıklı olarak enrofloksasin kalıntısına rastlanır iken, pipemidik asit, siprofloksasin, lomefloksasin, sinoksasin ve danofloksasin diğer ballarda kalıntılarına rastlanan kinolon türevi antibiyotik ilaçlardır. 354,5 ppb (µg/kg) enrofloksasin, 41,3 ppb (µg/kg) danofloksasin ve 18,7 ppb (µg/kg)

siprofloksasin en yüksek kalıntı seviyeleri olarak tespit edilmiştir. 50 adet numunenin 13 tanesinde floksasin kalıntısına rastlanmış olup, analiz edilen numunelerin %26'sına tekabül etmektedir. Analiz edilen örneklerden kestane-1 ve kestane-2 kodlu numunelerde 2 farklı kinolon türevinin eş zamanlı kalıntısına rastlanmıştır (kestane-1: siprofloksasin ve danofloksasin, kestane-2: lomefloksasin ve danofloksasin.) Elde edilen sonuçlar ballarda sıklıkla kalıntılarına rastlanan enrofloksasin ve siprofloksasin dışındaki kinolon grubu ilaçların da kalıntı olarak ballarda barınabileceğini ve kalite kontrol amaçlı kullanılacak metotlarda kinolon antibiyotiklerinin tüm üyelerinin yer alması gerekliliğini göstermektedir.

BÖLÜM 4. SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Genel Sonuç

Bu tez çalışmasında, Ultra-Performanslı Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektroskopisi (UPLC-MS) ile ballarda florokinolon antibiyotiklerin kalıntılarının saptanması için 2 farklı numune hazırlık ve bir kromatografik yöntem kütle spektrometresi dedeksiyonu ile, MRM modunda pozitif elektrosprey iyonizasyon (+ ESI) kullanılarak 7 dakika gibi kısa bir sürede sonuç alacak şekilde geliştirildi. Yöntem geliştirme sırasında, kromatografik ve spektrometrik koşullar, analitlerin daha kısa tutunma süreleri elde etmek için en iyi analiz etkinliği ve dedektör tepkisi ile optimize edildi.

Geliştirilen her iki yöntemde, özgüllük, kararlılık, doğrusallık, hassasiyet, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık açısından doğrulanmıştır. Geliştirilen ve doğrulanmış yöntemler, piyasada bulunabilecek balların analizinde başarıyla uygulanabilmektedir. Yapılan çalışmaları müteakip, elde edilen analiz sonuçlarında, ballarda ağırlıklı olarak enrofloksasin, danofloksasin, pipemidik asit ve siprofloksasin bileşenlerinin kalıntılarına rastlanmıştır. Literatürde yayınlanan metotlarda ağırlıklı olarak ekstraksiyonu takiben temizleme olarak SPE işlemi uygulanmıştır. UPLC / MS / MS sistemi kullanılarak seyrelt ve enjekte et formatında pratik ve 21 adet florokinolon parametresinin analizini kapsayan analiz metodu bulunmamaktadır.

4.2. Öneriler

Bal arılarında antibiyotik kalıntısını önlemek veya azaltmak için üreticinin ilaçlama takvimini iyi bilmesi, yakın çevrede yapılan ilaç uygulamaların yakından takip etmesi gerekmektedir. Arı hastalıklarına karşı yapılan kimyasal mücadele, sonbaharda balın hasatından sonra, ilkbaharda ise şubat ve mart aylarında yapılmalı, nektar sentezinin olduğu bal mevsiminde ilaç kullanılmamalıdır. Arıcılar uygun kovan seçmelidirler. Arı kolonileri mümkün olduğunca sağlıklı ve güçlü şekilde muhafaza edilebilmelidir. Petek ya da mum kullanılmayan, boş kovanlarda bırakılmamalıdır. Petekler, mümkün olduğunca soğuk koşullarda (7-8°C veya altında) muhafaza edilmeli ve her sene değiştirilmeli, yenilenmelidir. İlgili kurum tarafından insan sağlığını tehdit eden

kalıntıların analizleri ve ayrıca arı hastalıkları teşhisi en kısa sürede yapılarak sonuçların arıcılara ulaştırılması sağlanmalıdır.

Kalıntı tehlikesi ve önlenmesi konusunda özellikle üretici, tüketici ve satıcıların bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Kimyasal uygulamalar kadar toprak, hava ve su kirliliği de kalıntılara yol açmaktadır. Ayrıca arıcılığın trafiğin yoğun olduğu, sanayi ve yerleşim yerleri uzağında, zengin floral bölgelerinde, tercihen göçer ve profesyonel yapılmalı, destek ve teşvik edilmelidir. Bu alanda yapılan çalışmaların artması, zararlıların bulaşmasının engellenmesi, ilaçlamanın uygun dönemlerde yapılması, baldaki kalıntı miktarlarının azaltılması açısından önemlidir. Konu ile ilgili araştırma sayısı arttıkça, arıcılık kültür düzeyi artacak, insanlar daha çok bilinçlenecektir. Böylece daha kaliteli ve güvenilir ürün üretilmesine katkı sağlanmış olacaktır.

KAYNAKLAR

Agüí, M.L., García-Campana, A.M., Gacia, L.G., Blanco, C.C. (2012), Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatogaphy–tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure, *Talanta*, 93, 193– 199.

Ahuja, S. (2003), *Chromatogaphy and Separation Science* (V.4), USA: Elsevier Science

Akalın, H.E. (1994), Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal ilaçlar.

Akkan, H.A., Karaca, M. (2003), Veteriner İç Hastalıklarında Antibiyotiklerin Kullanımı, Yüzüncü Yıl üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 14, (2), 72-77

Albero, B., Sanchez-Brunete, C., Tadeo, J. (2003), Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatogaphy/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, Vol: 86, 572–576.

Anklam, E. (1998), A review of the analytical methods to determine the geogaphical and botanical origin of honey. *Journal of Food Chemistry*, 549-562.

Anonim. (2010), Residue monitoring, Food and Drug Administration Pesticide Program, FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition. www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/default.htm. Erişim Tarihi: 2010.

Anonim. (2006), Special Eurobarometer 238, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Anonim. (2009), Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliği, Erişim Tarihi: 2009.

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., Silveira, M.I.N. (2007), Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatogaphy–UV photodiode array detection and liquid chromatogaphy–ionspray tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, vol. 586, 359-365.

Batt, A. L. (2006), Investigating the occurrence and fate of human and veterinary antibiotics in environmental water systems. Ph.D. Thesis, The State University of New York at Buffalo.

Başoğlu, A. (2000), Veteriner İç Hastalıklarında Genel Tedavi. Selçuk Üniversitesi. Basımevi, Konya, 109-160.

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

Beyoğlu, D. (2006), Türkiye'nin Çeşitli Bölgelerinden Temin Edilen Bal Örneklerinde Naftalin Aranması ve Miktar Tayini. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 83, İstanbul.

Biotage Aplikasyon Notu. (2010), Affınılutetm Mıp–Fluoroquinolones, Erişim: www.biotage.com., Erişim Tarihi: 2011.

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.

Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J. (2001), Drug Residues in Foods, Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Marcel Dekker, New York.

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.

Brady, C. (1994), Analytical Chemistry (5). UK: John Wiley & sons.

Brighty, K.E., Gootz, T.D. (2000), Chemistry and Mechanism of Action of the Quinolone Antibacterials (2), The Quinolones, V.T. Andriole, Elsevier, Connecticut, U.S.A.

Celli, G., Maccagnani, B. (2003), Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology*, Vol: 56, 137–139.

Chabottaux, V., Bonhomme, C., Stead, S., Huet, A-C., Wolodko-Cierniak, K., Andrianne, D., Nivarlet, N., Pinacho, D.G., Diserens, J-M., Marco, M-P., Delahaut, P., Sharman, M., Ganier, B. (2012), The Development Of A New Multiplex Dipstick For The Simultaneous Detection Of Sulfonamıdes, Fluoroquınolones, Tylosin And Chloramphenıcol In Honey, Conffıdence.

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. ve Huang, X. (2016), Sensitive Monitoring of Fluoroquinolones in Milk and Honey Using Multiple Monolithic Fiber Solid-Phase Microextraction Coupled to Liquid Chromatogaphy Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 64, 8684−8693.

Codex Alimentarius Commission. (2001), Revised Codex Standard for Honey, Codex STAN 12-1981, Rev.1 (1987), Revision 2, FAO/WHO, 215.

Commission Decision 2002/657/EC. (2002), implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Union*, L221, 8–36.

Commission Regulation (EU) 37/2010. (2010), pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, *Official Journal of the European Union*, L15, 1-72.

Dasenaki, M.E., Bletsou, A.A., Thomaidis, N.S. (2014), Antibacterials (38), Handbook of Food Analysis, Third Edition by Leo M.L. Nollet and Fidel Toldra, CRC Press, Boca Raton, FL.

Debackere, M., Tijdskr, S. (1989), Use of anabolics in beef production. *Journal of the South African Veterinary Association*; 60, 71-75.

Demir, C. (2004), Hayvansal gıdalardaki antibiyotik ve hormon kalıntılarının insan sağlığı üzerine olası etkileri ve yasal düzenlemeler. Dünya Gıda Dergisi, sayı: 5, 52.

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.

Dökmeci, İ. , Akçasu, A., Banoğlu, N., Berkarda, Ş., ve ark. (1992), Farmakoloji. İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar, Nobel Tıp Kitabevleri, 705-785.

Durden, D. A. Ve Fernandes, G. (2010), Quantitation Of Fluoroquinolones İn Honey Using Tandem Mass Spectrometry (Lc-Ms/Ms): Nested Validation With Two Mass Spectrometers, *Journal of Aoac International*, Vol.93, (5), 1633.

Duru, M., Şahin, A., (2004), Türkiye'de sağlıklı ve güvenli hayvansal üretimin gerekliliği. Hayvansal Üretim, 45 (1), 36-41.

Du, W., Yao, J.G., Li, Y.Q., Hashi, Y. (2011), Rapid Determination of Residual Quinolones in Honey Samples by Fast HPLC with an On-Line Sample Pretreatment System, *American Journal of Analytical Chemistry*,2, 200-205.

Edder, P., Cominoli, A., Corvi, C. (1999), Determination of streptomycin residues in food by solid phase extraction and liquid with post-column derivation and fluorometric detection. *Journal of Chromatography A*, 830, 345-351.

Font, G., Juan-García, A., Picó, Y. (2007), Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis–mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat, *Journal of Chromatogaphy A*, vol. 1159, 233–241.

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

Gao, M., Wanga, H., Maa, M., Zhang, Y., Yin, X., Dahlgen, R. A., Du, D., Wanga, X. (2014), Optimization of a phase separation based magnetic-stirring salt-induced liquid–liquid microextraction method for determination of fluoroquinolones in food, *Food Chemistry*, 175, 181–188.

Gao, Q., Zhenga, H., Luoc, D., Dinga, J., Qi Feng, Y. (2011), Facile synthesis of magnetic one-dimensional polyaniline and its application in magnetic solid phase extraction for fluoroquinolones in honey samples, *Analytica Chimica Acta*, 720, 57– 62.

Gentili, A., Perret, D., Marchese, S. (2005), Liquid chromatogaphy-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products, *Trend Analytical Chemistry*, 24(7), 704-733.

Hammel, Y.A., Schoutsen, F., Martins, C. P. B. (2009), Analysis of (Fluoro)quinolones in Honey with Online Sample Extraction and LC-MS/MS, Thermo Scientific LC/MS application notes, www.thermo.com/appnotes, Application Notes: 465, Erişim: 2010

Herranz, S., Moreno-Bondi, M. C., Marazuela, M. D. (2007), Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs, *Journal of Chromatogaphy A*, 1140, 63–70.

Hoof, N. V., Wasch, K. D., Okerman, L., Reybroeck, W., Poelmans, S., Noppe, H., Brabander, H. D. (2005), Validation of a liquid chromatogaphy tandem mass

spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Analytica Chimica Acta*, 529, 265-272.

Hughes, P., Heritage, J. (2004), Antibiotic gowth promoters in food animals. *FAO Animal Production*; 160, 129-52.

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.

Jerkovich, A.D., LoBrutto, R., Vivilecchia, R. (2005), The use of ACQUITY UPLC in Pharmaceutical Development. Separation Science Redefined, 215-217.

Jones, F.T., Ricke, S.C. (1998), Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds, *Poultry Science*; 4, 613-617.

Juan-García, A., Font, G., Picó, Y. (2007), Simultaneous determination of different classes of antibiotics in fish and livestock by CE-MS, *Electrophoresis*, vol. 28, 4180-4191.

Kanda M., Kusano, T., Kanaı, S., Hayashı, H., Tushıma, Y., Nakajıma, T., Takeba, K., Sasamoto, T. Ve Nagayma, T. (2010), Rapid Determination Of Fluoroquinolone Residues İn Honey By A Microbiological Screening Method And Liquid Chromatogaphy, *Journal of Aoac International*, Vol. 93, No. 4, 1331-1333.

Kanfer, I., Skinner, M., Walker, R.B. Analysis of macrolide antibiotics. *Journal of Chromatogaphy A*, 812, 255-286.

Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., Widmer, M. (2011), Development of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices, *Analytica Chimica Acta*,700, 86–9.

Kaya, S., Ünsal, A. (2000), Besinlerdeki ilaç kalıntıları ve denetimi. Veteriner uygulamalı farmakoloji Cilt 2. Baskı 2. Ed. Kaya, S., Pirinçci, Bilgili, A. Medisan yayınevi, Ankara, 713-730

Kazakrvich, Y., Lobrutto, R. (2007), HPLC for Pharmaceutical Scientists. New Jersey: John Wiley & sons.

Kemper, N. (2008), Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecological Indicators, 8, 1-13.

Kiangkitiwan, B., Doppalapudi, A., Fonder, M., Solberg, K. ve Bohner, B. (2008), Levofloxacin induced delirium with psychotic features. General hospital psychiatry, 381-383.

Kleespies, R.G., Radtke, J., Bienefeld, K. (2000), Virus -like particles found in the ectoparasitic bee mite Varroa jacobsoni Oudemans. *Journal of invertebrate pathology*, 15, 87-90.

Lara, F.J., García-Campaña, A.M., Alés-Barrero, F., Bosque-Sendra, J.M. (2008), In-line solid-phase extraction preconcentration in capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for the multiresidue detection of quinolones in meat by pressurized liquid extraction, *Electrophoresis*, vol. 29, 2117-2125.

Legg, D.R., Baumgartner, A., Salter, R., Wheeler, A. (2003), ROSA (Rapid One Step Assay) for antibiotics in honey. *Apiacta*, 38, 207-217.

Lehotay, S. J., Anastassiades, M. (2007), Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study, *Journal of AOAC*, Vol: 90, 485-520.

Lindsey, M.E., Meyer, M., Thurman, E. M. (2001), Analysis of trace levels of sulfonamide tetracycline antimicrobials in goundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatogaphy/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73, 4640-4646.

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.

Luo, Y.B., Qiao M., Qi Feng, Y. (2010), Stir rod sorptive extraction with monolithic polymer as coating and its application to the analysis of fluoroquinolones in honey sample, *Journal of Chromatogaphy A*, 1217, 3583–3589.

Madurga, S., Sánchez-Céspedes, J. (2008), Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA gyrase, Chembiochem, 2081–2086.

Mastovska, K., Lightfield, A.R. (2008), Streamlining methodology for the multiresidue analysis of β-lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatogaphy–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatogaphy A*, vol. 1202, 118–123.

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

Moffat, A.C. (1986), Clarke's Isolation and Identification of Drugs: In Pharmaceuticals, Body Fluids and Post Mortem Material. (2nd Ed.) London: The Pharmaceutical Press.

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.

Mottier, P., Hammel, Y.A., Gemaud, E. ve Guy, P. A. (2008), Quantitative High-Throughput Analysis of 16 (Fluoro)quinolones in Honey Using Automated Extraction by Turbulent Flow Chromatogaphy Coupled to Liquid Chromatogaphy-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, 35–43.

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.

O'Keeffe, M., Conneely, A., Cooper, K.M., Kennedy, D.G., Kovacsics, L., Fodor, A., Mulder, P.P.J., van Rhijn, J.A., Trigueros, G. (2004), Nitrofuran antibiotic residues in pork: The Food BRAND retail survey. *Analytical Chimica Acta*; 520, 125-131.

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.

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

Perroud S.M.C., Le Breton, M.H., Gaveleau, L., Diserens, J.M. (2009), Validation of an ELISA Kit for the detection of fluoroquinolones in honey, Apimondia, Montpellier, 15-19.09.2009.

Picó, Y., Andreu, V. (2007), Fluoroquinolones in soil-risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1287-1299.

Pohl, P. (2009), Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(1), 117-128.

Porrını, C., Sabatını, A., Gırottı, S., Fını, F., Monaco, L., Cellı, G., Bortolottı, L., Ghını, S. (2003), The death of honey bees and environmental pollution by pesticides: the honey bees as biological indicator. *Bulletin of Insectology*, Vol: 56(1), 147-152.

Prescott, J.F. (2008), Antimicrobial use in food and companion animals. Animal Health Research Reviews; 9, 127-133.

Quintana-Rizzo, J., Salter, R.S., Saul, S.J. (2005), Solid phase extraction procedures for validation of Charm II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection of tylosin in honey. *Apiacta*, 40, 55-62.

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

Rissato, S. R., Galhiane, M. S., Knoll, F. R. N., ve Apon, B. M. (2004), Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: Determination by gaschromatogaphy with electron-capture and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatogaphy A*, Vol: 1048, 153-159.

Ritter, W. (2000), Bolile albinelor, Bucureşti: Ed. M.A.S.T.,117- 145.

Robledo, R.V., Smyth, W.F. (2009), The application of CE–MS in the trace analysis of environmental pollutants and food contaminants, *Electrophoresis*, vol. 30, 1647–1660.

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

Rooklidge, S. J. (2004), Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways. *Science of the Total Environment*, 325, 1-13.

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

Riviere, J. E. ve Papich, M. G. (2009), *Veterinary pharmacology and therapeutics*, (9), 993-994.

Sackey, B.A., Mensah, P., Collison, E., Sakyi-Dawson, E. (2001), Campylobacter, Salmonella, Shigella and Escherichia coli in live and dressed poultry from metropolitan, *International Journal of Food Microbiology*; 71, 21-28.

Schittko, S. (2008), Determination of 22 Quinolones and Macrolides in Honey, Eurofins Laboratuvarları / Aplikasyon Notu, www.eurofins.de., Erişim: 2010

Scot, R.P.W. (1996), Chromatogaphic Detectors Design, Function, and Operation. Chromatographic science series v.73, Marcel Dekker, Inc, New York.

Skoog, D., West, D., Holler, F. J. (1998), Principles of Instrumental Analysis (5th Ed.) Brooks Cole.

Sorkun, K., Dogan, N., Gümüs, Y., Ergün, K., Bulakeri, N. ve Işık, N. (2002), Türkiye'de üretilen doğal ve yapay balların ayırt edilmesinde fiziksel, kimyasal ve mikroskobik analizleri. Mellifera, Cilt: 2(4), 13–21.

Su, S. C., Chang, M. H., Chang, C. L., Chang, P.C. (2008), Simultaneous determination of quinolones in livestock and marine products by high performance liquid chromatogaphy. *Journal of Food and Drug Analysis*. 11, 114-127.

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

Swartz, M. E. (2005), UPLC: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 1253-1263.

Şanlı, Y., Sarıgöl, C. (1981), Hayvansal hesinlerdeki çeşitli artık maddelerin insan sağlığına etkileri. Ege Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 6(1.2),85-101.

Tenover, F. C. (2006), Mechanism of antimicrobial resistance in bacteria, *American Journal of medicine*, 119, (6A), 3-10.

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

Toldra, F., Reıg, M. (2006), Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science & Technology*; 17, 482-489.

Toussaint, B., Chedin, M., Bordin, G. (2005), Determination of (fluoro)quinolones antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatogaphy-tandem mass

spectrometry. PartII. Intercomparison exercise. *Journal of Chromatography A* 1088, 40-48.

Turiel, E., Martín-Esteban, A., Tadeo, J. L. (2006), Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. *Analytica Chimica Acta*, 562, 30-35.

Van Den, B.A., STOBBERINGH, E. (2000), Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327–335.

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.

Villar–Pulido, M., Gilbert–López, B., García–Reyes, J.F., Ramos–Martos, N., Molina–Díaz, A. (2011), Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatogaphy time–of–flight mass spectrometry, *Talanta*, vol. 85, 1419–1427.

Vinas, P., Balsalobre, N., Lopez-Erroz, C., Hernandez-Cordoba, M. (2004), Liquid chromatogaphy with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. *Journal of Chromatograpy A*; 1022, 125-129.

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.

White, J. W. (1975), Composition of honey. In Crane, E (ed) honey: a comperhensive survey.

White, J. W. (1978), Honey. Advances in Food Research, Vol: 4, 287-374.

White, J. W. (1980), Detection of honey adulteration by carbohydrate analysis. *Journal of the Association of Analytical Chemists*, Vol: 63, 11-18.

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

Wutz, K., Niessner, R., Seidel, M. (2011), Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays, *Microchimica Acta*, DOI 10.1007/s00604-011-0548-9.

Xu, S., Jiang, C., Lin, Y., Jia, L. (2012), Magnetic nanoparticles modified with polydimethylsiloxane and multi-walled carbon nanotubes for solid-phase extraction of fluoroquinolones, *Microchimica Acta*, 179, 257–264.

Yang, G., Lin, B., Zeng, Z., Chen, Z., Huang, X. (2005), Multiresidue determination of eleven quinolones in milk by liquid chromatogaphy with fluorescence detection, *Journal of AOA C International*. 88, 1688-1694.

Yatsukawa, Y.İ., Ito, H., Matsuda, T., Nakamura, M., Watai, M., Fujita K. (2011), Determination of Residual Fluoroquinolones in Honey by Liquid Chromatogaphy Using Metal Chelate Affinity Chromatogaphy, *Journal of AOA C International*, Vol. 94, (4), 1319-1327.

Yavuz, H. (2007), Konya'da Satılan Ballardaki Bazı Pestisid Residülerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 46, Konya.

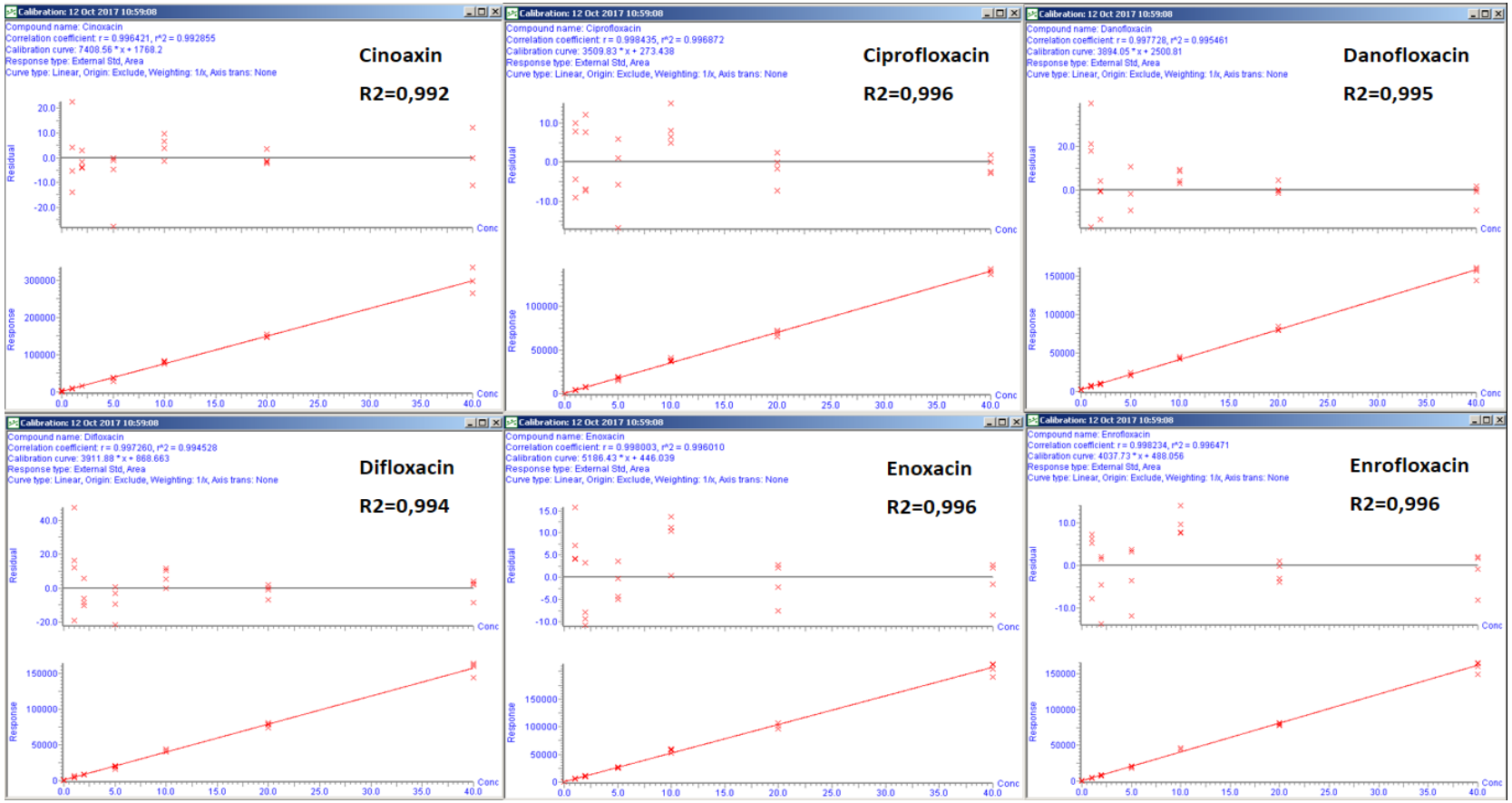
Yeter, O. (2007), Bal Örneklerinde Asetamiprid Kalıntısının ve Bozunma Ürünün Tayini için Yöntem Geliştirilmesi. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi FenBilimleri Enstitüsü, 146, İstanbul.

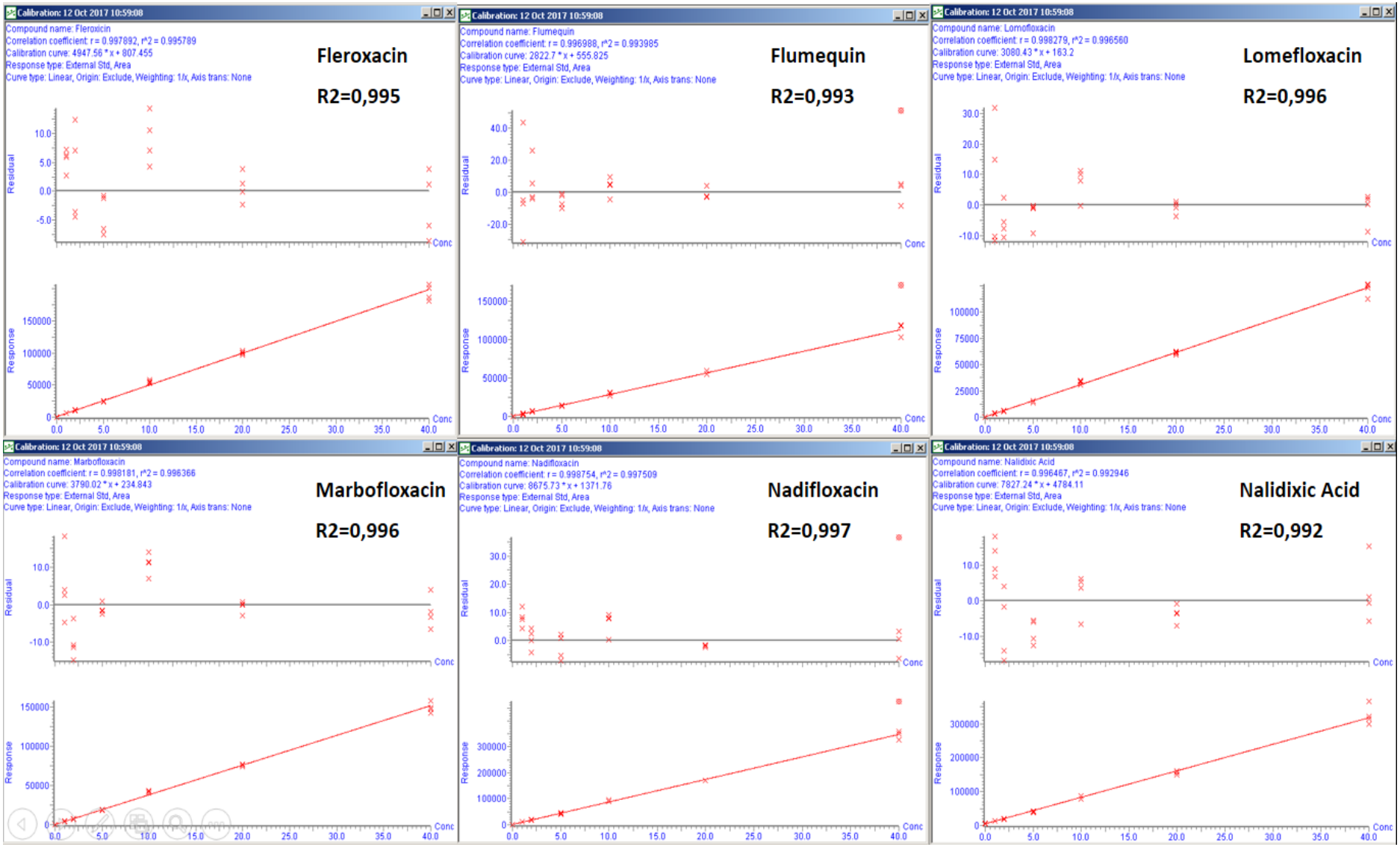
Yu, F., Yu, S., Yu, L., Li, Y., Wua, Y., Zhang, H., Qu, L., Harrington, P. B. (2013), Determination of residual Enrofloksasin in food samples by a sensitive method of chemiluminescence enzyme immunoassay, *Food Chemistry*, 149, 71–75.

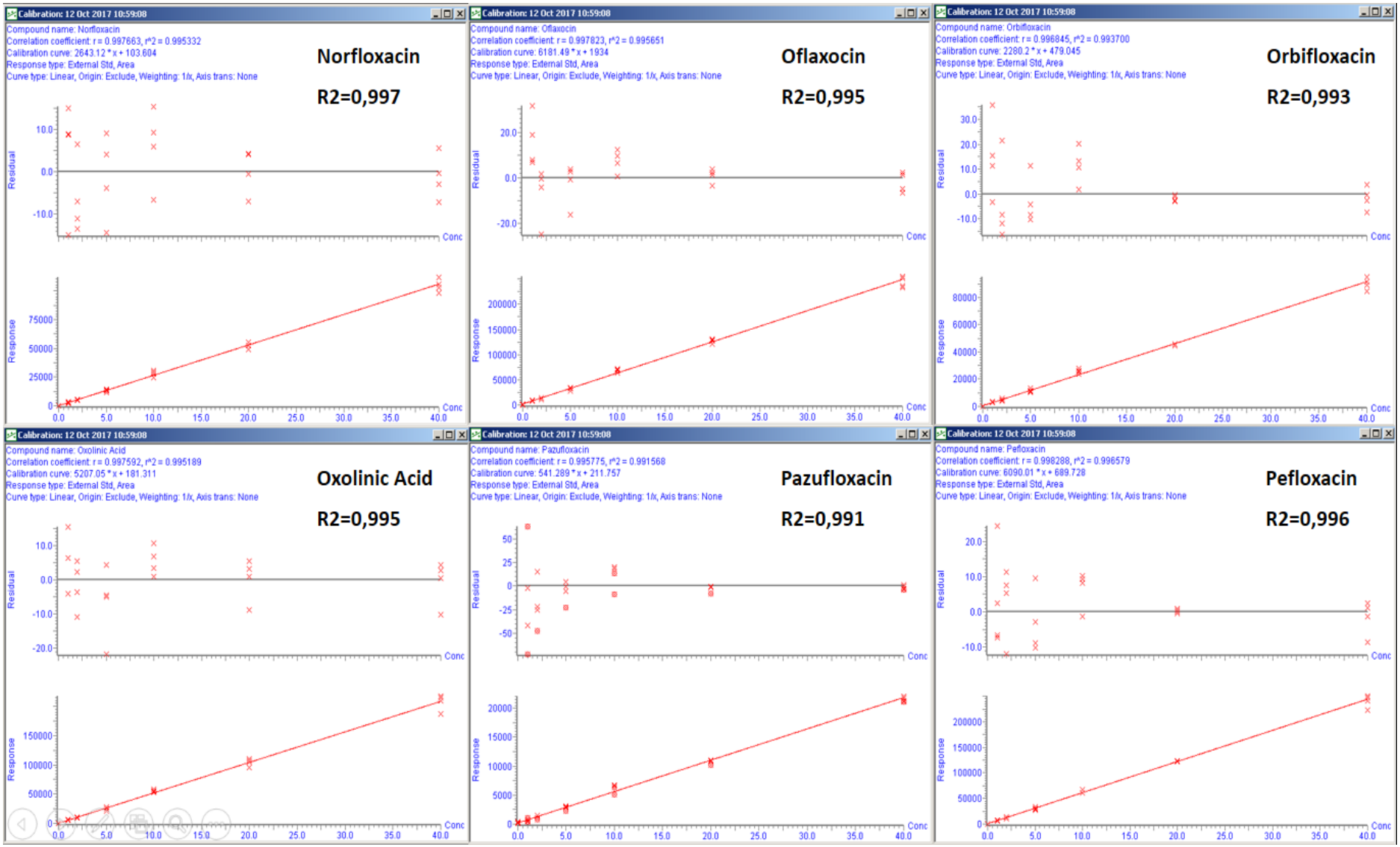
EKLER

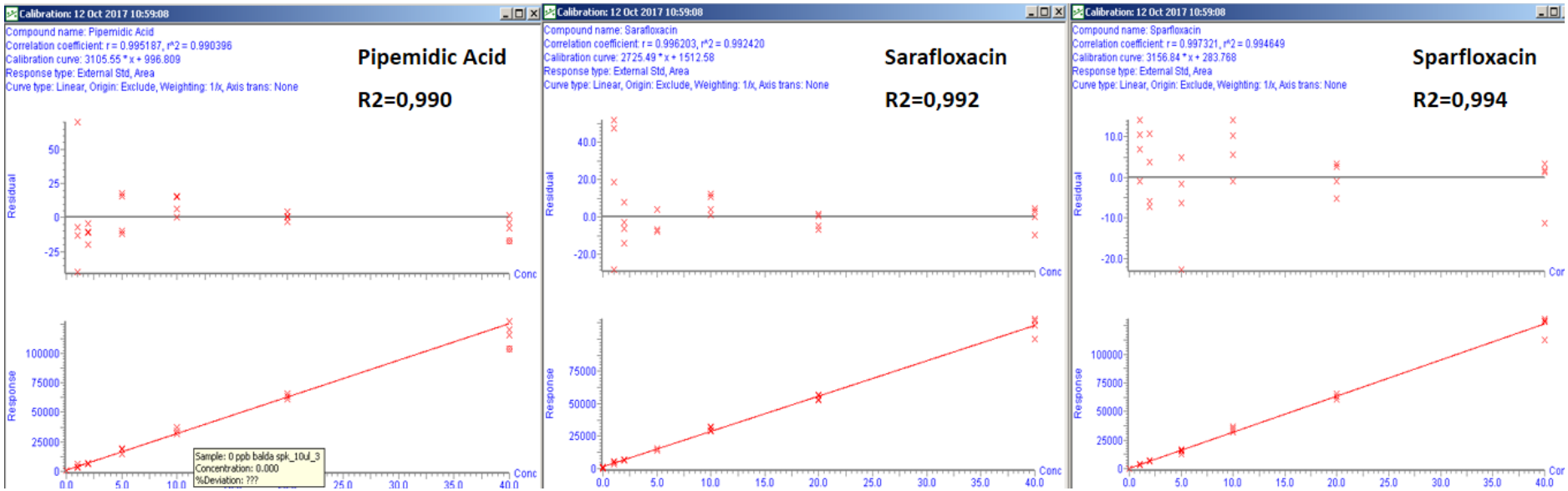
EK A: Kalibrasyon grafikleri

Şekil A.1. Seyrelt ve Enjekte et metodu için kalibrasyon grafikleri

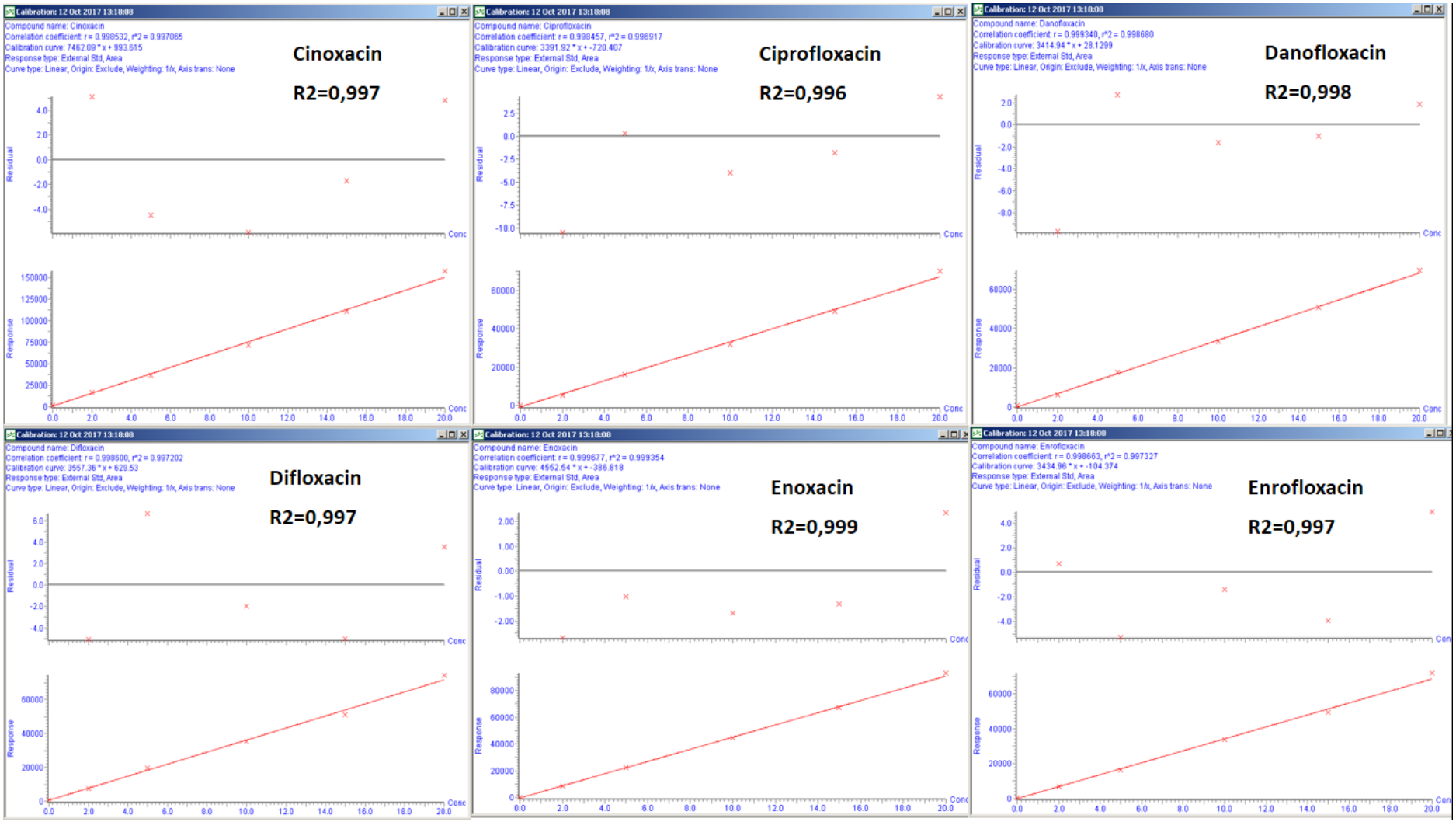


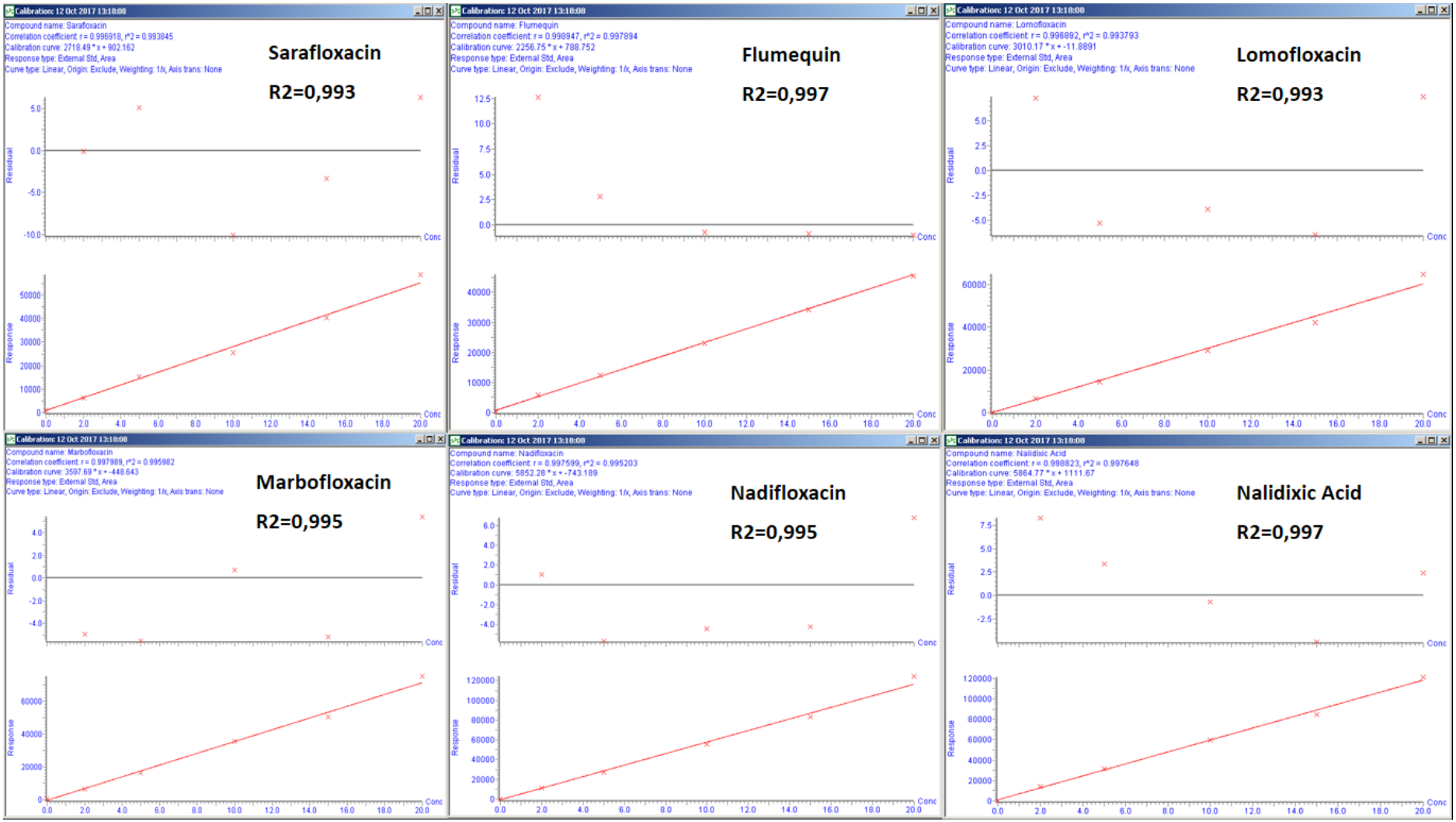

Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Fleroxicin
Correlation coefficient: r = 0.997892, r^2 = 0.995789
Calibration curve: 4947.56 * x + 807.455
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Fleroxacin
R2=0,995
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Flumequin
Correlation coefficient: r = 0.996988, r^2 = 0.993985
Calibration curve: 2822.7 * x + 555.825
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Flumequin
R2=0,993
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Lomofloxacin
Correlation coefficient: r = 0.998279, r^2 = 0.996560
Calibration curve: 3080.43 * x + 163.2
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Lomefloxacin
R2=0,996
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Marbofloxacin
Correlation coefficient: r = 0.998181, r^2 = 0.996366
Calibration curve: 3790.02 * x + 234.843
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Marbofloxacin
R2=0,996
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Nadifloxacin
Correlation coefficient: r = 0.998754, r^2 = 0.997509
Calibration curve: 8675.73 * x + 1371.76
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Nadifloxacin
R2=0,997
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Nalidixic Acid
Correlation coefficient: r = 0.996467, r^2 = 0.992946
Calibration curve: 7827.24 * x + 4784.11
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Nalidixic Acid
R2=0,992
Residual
Response
Conc

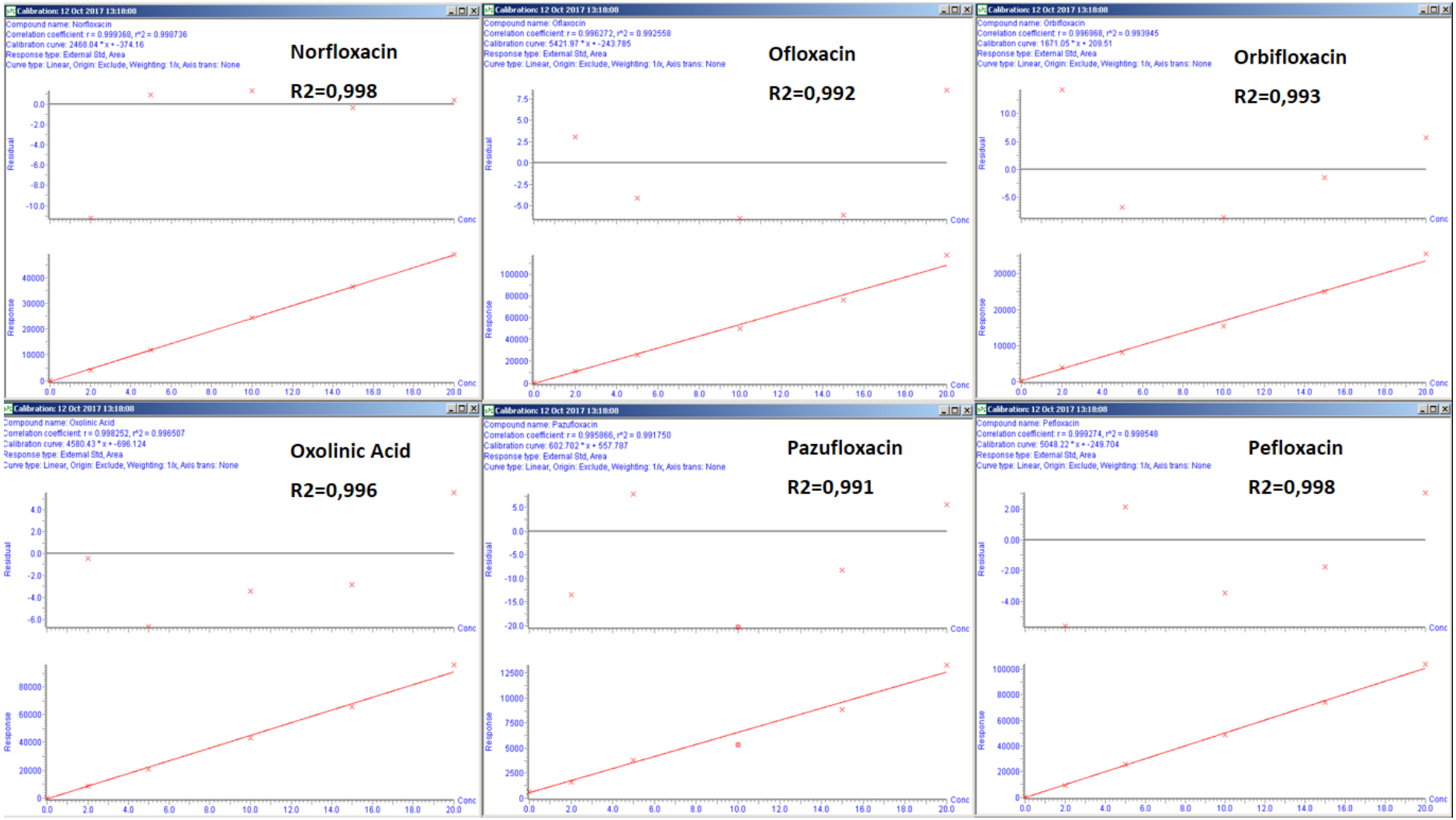

Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Norfloxacin
Correlation coefficient: r = 0.997663, r^2 = 0.995332
Calibration curve: 2643.12 * x + 103.604
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Norfloxacin
R2=0,997
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Ofloxocin
Correlation coefficient: r = 0.997823, r^2 = 0.995651
Calibration curve: 6181.49 * x + 1934
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Oflaxocin
R2=0,995
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Orbifloxacin
Correlation coefficient: r = 0.996845, r^2 = 0.993700
Calibration curve: 2280.2 * x + 479.045
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Orbifloxacin
R2=0,993
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Oxolinic Acid
Correlation coefficient: r = 0.997592, r^2 = 0.995189
Calibration curve: 5207.05 * x + 181.311
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Oxolinic Acid
R2=0,995
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Pazufloxacin
Correlation coefficient: r = 0.995775, r^2 = 0.991568
Calibration curve: 541.289 * x + 211.757
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Pazufloxacin
R2=0,991
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Pefloxacin
Correlation coefficient: r = 0.998288, r^2 = 0.996579
Calibration curve: 6090.01 * x + 689.728
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Pefloxacin
R2=0,996
Residual
Response
Conc

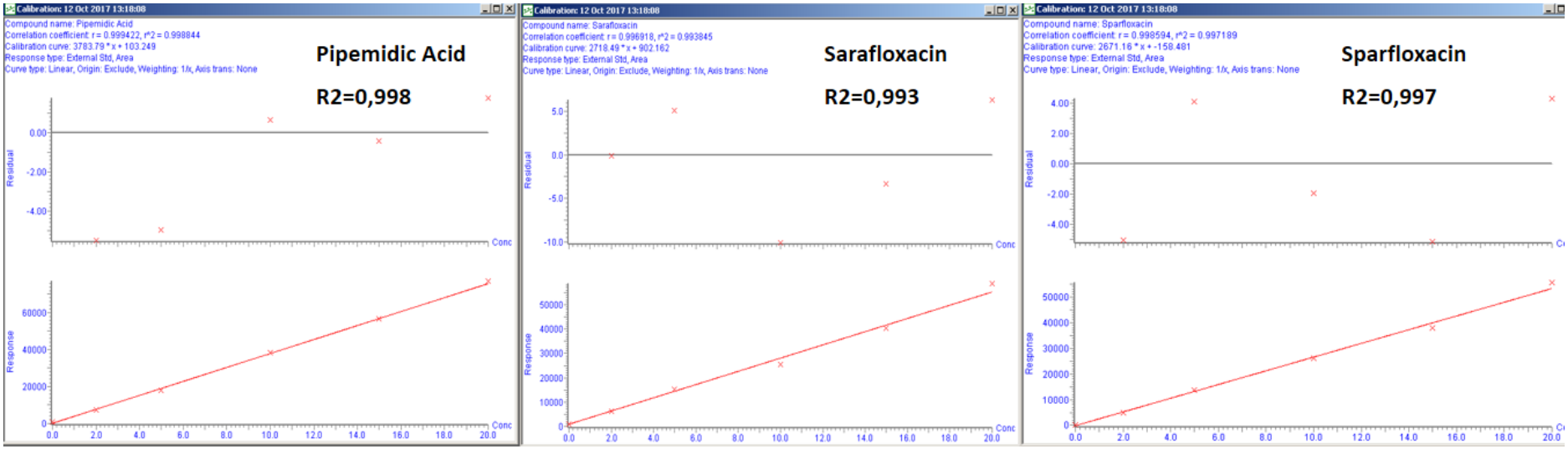

Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Pipemidic Acid
Correlation coefficient: r = 0.995187, r^2 = 0.990396
Calibration curve: 3105.55 * x + 996.809
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Pipemidic Acid
R2=0,990
Residual
Response
Conc
Sample: 0 ppb balda spk_10ul_3
Concentration: 0.000
%Deviation: ???
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Sarafloxacin
Correlation coefficient: r = 0.996203, r^2 = 0.992420
Calibration curve: 2725.49 * x + 1512.58
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Sarafloxacin
R2=0,992
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 10:59:08
Compound name: Sparfloxacin
Correlation coefficient: r = 0.997321, r^2 = 0.994649
Calibration curve: 3156.84 * x + 283.768
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Sparfloxacin
R2=0,994
Residual
Response
Cor

Şekil A.2. Quechers metodu için kalibrasyon grafikleri




Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Sarafloxacin
Correlation coefficient: r = 0.996918, r^2 = 0.993845
Calibration curve: 2718.49 * x + 902.162
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Sarafloxacin
R2=0,993
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Flumequin
Correlation coefficient: r = 0.998947, r^2 = 0.997894
Calibration curve: 2256.75 * x + 788.752
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Flumequin
R2=0,997
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Lomofloxacin
Correlation coefficient: r = 0.996892, r^2 = 0.993793
Calibration curve: 3010.17 * x + -11.8891
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Lomofloxacin
R2=0,993
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Marbofloxacin
Correlation coefficient: r = 0.997989, r^2 = 0.995982
Calibration curve: 3597.69 * x + -448.643
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Marbofloxacin
R2=0,995
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Nadifloxacin
Correlation coefficient: r = 0.997599, r^2 = 0.995203
Calibration curve: 5852.28 * x + -743.189
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Nadifloxacin
R2=0,995
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Nalidixic Acid
Correlation coefficient: r = 0.998823, r^2 = 0.997648
Calibration curve: 5864.77 * x + 1111.67
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Nalidixic Acid
R2=0,997
Residual
Response
Conc


Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Norfloxacin
Correlation coefficient: r = 0.999368, r^2 = 0.998736
Calibration curve: 2468.04 * x + -374.16
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Norfloxacin
R2=0,998
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Ofloxacin
Correlation coefficient: r = 0.996272, r^2 = 0.992558
Calibration curve: 5421.97 * x + -243.785
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Ofloxacin
R2=0,992
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Orbifloxacin
Correlation coefficient: r = 0.996968, r^2 = 0.993945
Calibration curve: 1671.05 * x + 209.51
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Orbifloxacin
R2=0,993
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Oxolinic Acid
Correlation coefficient: r = 0.998252, r^2 = 0.996507
Calibration curve: 4580.43 * x + -696.124
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Oxolinic Acid
R2=0,996
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Pazufloxacin
Correlation coefficient: r = 0.995866, r^2 = 0.991750
Calibration curve: 602.702 * x + 557.787
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Pazufloxacin
R2=0,991
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Pefloxacin
Correlation coefficient: r = 0.999274, r^2 = 0.998548
Calibration curve: 5048.22 * x + -249.704
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Pefloxacin
R2=0,998
Residual
Response
Conc


Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Pipemidic Acid
Correlation coefficient: r = 0.999422, r^2 = 0.998844
Calibration curve: 3783.79 * x + 103.249
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Pipemidic Acid
R2=0,998
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Sarafloxacin
Correlation coefficient: r = 0.996918, r^2 = 0.993845
Calibration curve: 2718.49 * x + 902.162
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Sarafloxacin
R2=0,993
Residual
Response
Conc
Calibration: 12 Oct 2017 13:18:08
Compound name: Sparfloxacin
Correlation coefficient: r = 0.998594, r^2 = 0.997189
Calibration curve: 2671.16 * x + -158.481
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None
Sparfloxacin
R2=0,997
Residual
Response

EK B: Numune analiz sonuçları

Tablo B.1. Numune analiz sonuçları

#	Numuneler	Lomeflok sasin	Nalidiksi k asit	Oflaksosin	Flumekuin	Sinoksasin	Sarafloksasin	Enoksasin	Danofloksasin	Marbofloksasin	Norfloksasin	Orbiflo ksasin
1	**Çiçek-1**	0	0,3	0	0,1	0	0	0	0	0,2	0	0
2	**Çiçek-2**	0	0,2	0	0,2	0,3	0	0	0	0,1	0	0
3	**Çiçek-3**	0	0,3	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0	0
4	**Çiçek-4**	0	0,2	0	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0
5	**Çiçek-5**	0	0,3	0	0,4	0,2	0	0	0	0,1	0	0
6	**Çiçek-6**	0	0,4	0	0	0,3	0	0	0	0,1	0	0
7	**Çiçek-7**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	**Çiçek-8**	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0
9	**Çiçek-9**	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0	0	0	0
10	**Çiçek-10**	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0,1	0,1
11	**Çiçek-11**	0	0	0	0,2	0,3	0	0	0	0	0	0
12	**Çiçek-12**	0	0,1	0	0,3	0,1	0	0	0	0,2	0	0
13	**Çiçek-13**	0	0	0	0	0,1	0	0	0,2	0	0	0
14	**Çiçek-14**	0	0,3	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0
15	**Çiçek-15**	0	0,3	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0
16	**Çiçek-16**	0	0,2	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0
17	**Çiçek-17**	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0
18	**Çiçek-18**	0	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0
19	**Çiçek-19**	0	0,3	0	0,3	***0,6**	0	0	0	0	0	0
20	**Çiçek-20**	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0
21	**Çiçek-21**	0	0	0	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0,1
22	**Çiçek-22**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	**Çiçek-23**	0	0,1	0	0,3	0,4	0	0	0	0,2	0,2	0,1
24	**Çiçek-24**	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0,1	0	0
25	**Çiçek-25**	0	0,2	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0
26	**Çiçek-26**	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0,2	0	0
27	**Çiçek-27**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	**Çiçek-28**	0	0,4	0	0,1	0,1	0,1	0	0	0,4	0	0
29	**Çiçek-29**	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0,1	0	0
30	**Çam-1**	0	0,4	0	0,4	0,4	0	0	0	0	0	0

31	**Çam-2**	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	**Çam-3**	0	0	0	0,1	0,3	0	0	0,1	0,1	0	0
33	**Çam-4**	0	0,1	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0
34	**Çam-5**	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0
35	**Çam-6**	0	0,2	0	0	0,1	0,3	0	0,1	0	0	0
36	**Çam-7**	0	0,3	0	0,3	0,2	0,2	0	0	0,1	0	0
37	**Çam-8**	0	0,4	0	0,3	0	0	0	0	0,1	0	0,1
38	**Çam-9**	0	0	0	0,3	0	0	0	0,3	0,1	0	0
39	**Çam-10**	0	0,1	0	0,3	0,3	0	0	***2,8**	0,1	0	0
40	**Çam-11**	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	**Çam-12**	0	0	0	0,3	0	0,1	0	0	0	0	0
42	**Çam-13**	0	0,1	0	0	0,1	0,1	0	0	0,1	0	0
43	**Kestane-1**	2	0,4	0,1	0	0,1	0,1	0,2	***41,3**	0,3	0,2	0,1
44	**Kestane-2**	***1,8**	0,3	0	0,2	0,2	0	0,1	***34**	0,4	0,1	0
45	**Kestane-3**	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	**Kestane-4**	0	0	0	0	0,3	0,2	0	0	0,1	0	0
47	**Narenciye-1**	0	0,1	0	0	0,2	0	0	0	0,2	0	0
48	**Narenciye-2**	0	0,2	0	0,1	0,2	0	0	0	0,2	0	0
49	**Narenciye-3**	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0
50	**Narenciye-4**	0	0	0	0,3	0,4	0	0	0	0	0	0,1

*** LOQ Değerinin üstünde tespit edilmiştir. (≥ 0,5 µg/kg)**

Tablo B.1 : (Devam)

#	Numuneler	Oksolinik asit	Pipemidik asit	Pefloksasin	Nadifloksasin	Fleroksasin	Enrofloksasin	Siprofloksasin	Sparfoksasin	Difloksasin	Pazufloksasin
1	**Çiçek-1**	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0,3	0,2
2	**Çiçek-2**	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0,3
3	**Çiçek-3**	0	0	0	0,3	0,1	0	0	0	0,4	0
4	**Çiçek-4**	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0,1
5	**Çiçek-5**	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0,1	0,4
6	**Çiçek-6**	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0,1
7	**Çiçek-7**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	**Çiçek-8**	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0
9	**Çiçek-9**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	**Çiçek-10**	0	0	0,1	0	0	***354,5**	**1,4**	0	0,1	0
11	**Çiçek-11**	0	0	0	0,1	0,1	0,2	0	0	0,2	0
12	**Çiçek-12**	0	0	0	0,1	0,2	0,2	0	0	0,3	0
13	**Çiçek-13**	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0,3
14	**Çiçek-14**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3
15	**Çiçek-15**	0	***3,2**	0	0,1	0	0	0	0	0,2	0,4
16	**Çiçek-16**	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0,1
17	**Çiçek-17**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	**Çiçek-18**	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0
19	**Çiçek-19**	0	0	0	0,3	0	0,4	0	0	0,3	0,4
20	**Çiçek-20**	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,3
21	**Çiçek-21**	0	0,1	0	0	0,1	1	0	0	0,2	0,2
22	**Çiçek-22**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	**Çiçek-23**	0	0	0	0,2	0	0,1	0	0	0	0,1
24	**Çiçek-24**	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0,2
25	**Çiçek-25**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	**Çiçek-26**	0	0	0	0,2	0,1	0	0	0	0,2	0
27	**Çiçek-27**	0	0,2	0	0,2	0	0	0	0	0	0,2
28	**Çiçek-28**	0	0,2	0	0,2	0	0	0	0	0	0
29	**Çiçek-29**	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0,2	0,1
30	**Çam-1**	0	0	0	0	0	***5,3**	0	0	0	0
31	**Çam-2**	0	0,3	0	0	0	***9,7**	0	0	0,2	0,1
32	**Çam-3**	0	3	0	0	0	***5,4**	0,2	0	0,1	1

33	**Çam-4**	0	0	0	0	0	0,2	0,1	0	0	0
34	**Çam-5**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	**Çam-6**	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0
36	**Çam-7**	0	0	0	0	0,1	***5,9**	0	0	0	0
37	**Çam-8**	0	0	0	0,2	0,1	0,2	0,1	0	0	0
38	**Çam-9**	0	0	0	0,2	0	0,4	0,2	0	0	0
39	**Çam-10**	0	0,2	0	0	0,1	0.1	0,3	0	0,3	0
40	**Çam-11**	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0,2
41	**Çam-12**	0	0	0	0,1	0,1	***4,5**	0	0	0	0,3
42	**Çam-13**	0	0	0	0,1	0	0,2	0	0	0,3	0
43	**Kestane-1**	0,1	0	0	0	0,3	0	***18,7**	0	0,3	0,1
44	**Kestane-2**	0	0	0	0	0,4	0	0,1	0	0	0
45	**Kestane-3**	0	0	0	0,2	0,1	0	0	0	0,1	0
46	**Kestane-4**	0	0,1	0	0,2	0	0	0	0	0	0,3
47	**Narenciye-1**	0	***5,1**	0	0,2	0	0,2	0	0	0,1	0,2
48	**Narenciye-2**	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0,2	0,2
49	**Narenciye-3**	0	0	0	0	0	**4,9**	0	0	0	0,4
50	**Narenciye-4**	0,2	0	0	0,2	0	0	0,1	0	0	0

*** LOQ Değerinin üstünde tespit edilmiştir. (≥ 0,5 µg/kg)**

EK C: Balda kinolon analizi için geliştirilmiş yöntemler

Tablo C.1. Balda kinolon analizi için geliştirilmiş yöntemler

Referans	Kinolon Sayısı	Matriks	Numune Hazırlık Süreci (Ekstraksiyon ve Saflaştırma)	Ölçüm Tekniği	CCβ yada LOD Değerleri (µg/kg)
Yan-Bo Luo, Qiao Ma, Yu-Qi Feng / **(2010)**	4 FQ	Bal	Monolitik Stir-bar ekstraksiyon-Aseton ile desorpsiyon- Azot Uçurma-filtreleme	LC-MS/MS	0,21 - 0,48
Qiang Gaoa, Hao-Bo Zhenga, Dan Luoc, Jun Dinga, Yu-Qi Feng**, (2011)**	4 FQ	Bal	Manyetik Katı faz ile ekstraksiyon, aseton ile desorpsiyon, azot uçurma	HPLC-UV	0,3 - 1,4
Roberta Galarini, Giorgio Saluti, Danilo Giusepponi, Rosanna Rossi, Simone Moretti, **(2014)**	8 FQ	Bal	Asidik Hidroliz, çift Katyon Değişim SPE uygulaması, Uçurma, filtreleme	LC-MS/MS	0,16 - 2,0
Fei Yu , Songcheng Yu , Lanlan Yu , Yanqiang Li , Yongjun Wua,, Hongquan Zhang , Lingbo Qu , Peter De B. Harrington, **(2013)**	1 FQ (Enrofloksasin)	Süt, Bal, Yumurta	Dilüsyon, diklorometan ile ultrasonik ekstraksiyon, santrifüj, uçurma, filtreleme	chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA)	0,35
Sonja Schittko, Eurofins Laboratuvarları / Aplikasyon Notu	14 FQ	Bal	Dilüsyon, Filtrasyon ve On-line-SPE	LC-MS/MS	5
Lei Chen And Xiaojia Huang, (**2016)**	7 FQ	Süt, Bal	Dilüsyon, pH ayarlaması, monolitik-SPME ekstraksiyonu, metanol ile desorpsiyon, uçurma ve filtreleme	LC-MS/MS	0,0010 – 0,0037
Biotage Aplikasyon Notu	4 FQ	Bal	Dilüsyon, pH Ayarlama, santrifüj, Moleküler İmprinted Polimerik SPE, Uçurma, filtrasyon	LC-MS/MS	NA

Wei Du, Jian Guo Yao, Yue Qi Li, Yuki Hashi, (**2011)**	9 FQ	Bal	Seyreltme ve filtrasyon devamında Online-SPE	HPLC-FL	0,41 - 2,10
Yves-Alexis Hammel, Frans Schoutsen, Cláudia P. B. Martins / Thermo Fischer Scientific Aplikasyon Notu, **(2009)**	16 FQ	Bal	Homojenizasyon, filtrasyon devamında Online-SPE	LC-MS/MS	0,5 - 2,6
Davıd A. Durden And Gwen Fernandes, **(2010)**	14 FQ	Bal	Tampon ile ekstaksiyon, santrifüj, SPE, Azot uçurma, filtrasyon	LC-MS/MS	0,05 - 4,0
Makı Kanda, Tomoto Kusano, Setsuko Kanaı, Hıroshı Hayashı, Yokomatushıma, Takayukınakajıma, Kazue Takeba, Takeo Sasamoto, And Toshıjıro Nagayma, **(2010)**	7 FQ	Bal	Tampon ile ekstaksiyon, Dual (ikili-Seri)-SPE, Azot uçurma, filtrasyon	HPLC-FL	2,0-9,0
Yoh-İchi Yatsukawa, Hironobu Ito, And Takahiro Matsuda, Munetomo Nakamura And Masatoshi Watai, Kazuhiro Fujita**, (2011)**	8 FQ	Bal	Tampon ile ekstaksiyon, Santrifüj, SPE, filtrasyon	HPLC-FL	2,9 - 4,4
Ming Gao, Huili Wanga, Meiping Maa, Yuna Zhang, Xiaohan Yin, Randy A. Dahlgen , Dongli Du , Xuedong Wanga, **(2014)**	5 FQ	Süt, Bal, Yumurta	Homojenizasyon, likit-likit ekstraksiyon, santrifüj, Manyetik SPE, Santrifüj, azot uçurma	HPLC-FL	0,07–0,53
Pascal Mottıer, Yves-Alexıs Hammel, Erıc Gemaud, And Phılıppe A. Guy, **(2008)**	16 FQ	Bal	Dilüsyon, Filtrasyon ve On-line-SPE /Turbulent Flow Chromatogaphy	LC-MS/MS	5,0
Mayda I. Lopez ,Jeffery S. Pettıs, I. Barton Smıth, Pak-Sın Chu, **(2008)**	5 FQ	Bal	Homojenizasyon, filtrasyon, Santrifüj, SPE, Azot uçurma	LC-MS/MS	NA
Jose Luıs Martınez Vıdal, Marıa Del Mar Aguılera-Luız, Roberto Romero-Gonzalez, And Antonıa Garrıdo Frenıch, **(2009)**	5 FQ	Bal	Tampon ile ekstraksiyon, santrifüj, SPE, Azot uçurma	LC-MS/MS	0,3 - 2,0
Klaus Wutz & Reinhard Niessner Ve Michael Seidel**, (2011)**	1 FQ (Enrofloksasin)	Bal	Tampon ile dilüsyon, pH ayarlama, Filtrasyon	Chemiluminescence-Microarray-Immunoassay (CLMIA)	4,2
Chabottaux V, Bonhomme C., Stead S, Huet	8 FQ	Bal	Tampon dilüsyon, etil asetat	Tarama metodu-	25 - 500

A-, Wolodko-Cierniak K, Andrianne D, Nivarlet N, Pinacho D.G, Diserens J-M, Marco M-P, Delahaut P, Sharman M, Ganier B, **(2012)**			ekstraksiyon, Santrifüj, Azot uçurma.	immunochromatogaphic separation	
Manuel Lombardo-Agüí, Ana M. García-Campa˜na∗, Laura Gámiz-Gacia, Carmen Cruces-Blanco, **(2012)**	8 FQ	Arı Ürünleri	Homojenizasyon, Asetonitril ekstraksiyon, Quechers ekstraksiyon ve Dispersif SPE, santrifüj, azot uçurma	UPLC-MS/MS	0,5 - 1,7
M-C Savoy Perroud, M-H Le Breton, L. Gaveleau, J-M Diserens, **(2009)**	8 FQ	Bal	Tampon ile Homojenizasyon, santrifüj, üst faz ELİSA kiti uygulaması	ELİSA	3,13
Jian Wang, Daniel Leung, **(2012)**	15 FQ	Süt, Bal	Homojenizasyon, Asetonitril ekstraksiyon, Quechers ekstraksiyon santrifüj, azot uçurma	UPLC-ESI-QTOF-MS	1
Shen Xucheng, Jiangyuexin Linli Jia, **(2012)**	4 FQ	Bal	Manyetik Katı faz ile ekstraksiyon, desorpsiyon	Capillary LC-UV	0,24–0,48
Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M., **(2011)**	16 FQ	Bal, Doku	Asetonitril ekstraksiyon, SPE, Azot uçurma, filtrasyon	UPLC-ESI-QTOF-MS	1
***Akyıldız, İ.E., Yetimoğlu, E.K.**	**21 FQ**	**Bal**	**Seyreltme**	**UPLC-ESI-MS-MS**	**1**
*** Akyıldız, İ.E., Yetimoğlu, E.K.**	**21 FQ**	**Bal**	**Quechers**	**UPLC-ESI-MS-MS**	**0,5**

***Gerçekleştirilen tez çalışmasına ait verilerdir.**

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul'da doğdu. 2004 yılında Kadıköy, Kenan Evren Anadolu Lisesinden mezun oldu. Aynı yıl girdiği Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünü 2008 yılında bitirdi. 2015 yılında Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Analitik Kimya bölümünde yüksek lisans öğrenimine başladı.

Tezden Türetilen Sunumlar

1. **Ece Kök Yetimoğlu**, İsmail Emir Akyıldız, "Development of UPLC-ESI-MS/MS Analytical Method For Quinolone Antibiotics Analysis in Honey'', **ICNTC Konferans 2017 – 3rd. International Conference on New Trends in Chemistry,** 28-30 Nisan 2017, Helsinki / Finlandiya, Poster Sunumu.

2. **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök Yetimoğlu, "Kinolon Antibiyotiklerinin UPLC-ESI-MS/MS ile Ballarda Tespitine Yönelik Analitik Yöntem Geliştirilmesi", **USK / 2017- XV. Ulusal Spektroskopi Kongesi**, 17-19 Mayıs 2017, Yalova, Poster Sunumu.