



**ANKARA İLİ ÇEVRESİNDE TÜKETİME  
SUNULAN ÇİĞ SÜTLERDE NİTROİMİDAZOL  
GRUBU İLAÇ KALINTI VARLIĞININ  
LC/MS/MS İLE ARAŞTIRILMASI**

Ebru DURAL

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sinan İNCE

Tez No: 2024-029

Afyonkarahisar

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA İLİ ÇEVRESİNDE TÜKETİME SUNULAN ÇİĞ  
SÜTLERDE NİTROİMİDAZOL GRUBU İLAÇ KALINTI  
VARLIĞININ LC/MS/MS İLE ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan  
Ebru DURAL**

**Danışman  
Prof. Dr. Sinan İNCE**

**Tez No: 2024-029**

**AFYONKARAHİSAR**

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: "23.SAĞ.BİL.21"**

**T.C.**  
**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**  
**ENSTİTÜ ONAYI**

|                                 |                       |                                                                                                                            |
|---------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Öğrencinin</b>               | <b>Adı- Soyadı</b>    | Ebru DURAL                                                                                                                 |
|                                 | <b>Numarası</b>       | 223309001                                                                                                                  |
|                                 | <b>Anabilim Dalı</b>  | Farmakoloji ve Toksikoloji                                                                                                 |
|                                 | <b>Programı</b>       | Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi                                                                                  |
|                                 | <b>Program Düzeyi</b> | <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora                                         |
| <b>Tezin Başlığı</b>            |                       | Ankara ili çevresinde tüketime sunulan çiğ sütlerde nitroimidazol grubu ilaç kalıntı varlığının LC/MS/MS ile araştırılması |
| <b>Tez Savunma Sınav Tarihi</b> |                       | 25.07.2024                                                                                                                 |
| <b>Tez Savunma Sınav Saati</b>  |                       | 11.00                                                                                                                      |

Yukarıda bilgileri verilen öğrenciye ait tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... / ..... / ..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

***e-imzalıdır***

**Prof. Dr. Esmâ KOZAN**  
**Enstitü Müdürü**

## BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

...../...../2024

İmza

Ebru DURAL

## ÖZET

### ANKARA İLİ ÇEVRESİNDE TÜKETİME SUNULAN ÇİĞ SÜTLERDE NİTROİMİDAZOL GRUBU İLAÇ KALINTI VARLIĞININ LC/MS/MS İLE ARAŞTIRILMASI

Nitroimidazoller anaerobik bakterilere ve ayrıca protozoal enfeksiyonların patojenlerine karşı oldukça aktif olan bir ilaç grubudur. Bunların hayvansal ürünlerindeki kalıntıları insanlar üzerinde mutajenik ve kanserojenik etkiler sergiler. Bu çalışmada, nitroimidazol ve metabolitlerinin sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) ile belirlenmesine yönelik metot validasyonu ile birlikte Ankara ilinde tüketime sunulan çiğ inek sütü örneklerinde nitroimidazol grubu ilaçların kalıntı varlığının analiz edilmesi ve elde edilen bulgular ile gerek hayvan sağlığı ve gerekse tüketiciler için olası kalıntı risk durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Analiz öncesi süt örneklerinden bileşiklerin eldesi için etilasetat ve n-hekzan ile ön işlemler gerçekleştirildi ve son kısımda örnekler metanol-su karışımı ile muamale edilerek LC/MS/MS'ye enjeksiyon işlemi yapıldı. Analitlerin ayrılmasında C18 kolon ve asetonitril ve suda formik asitli mobil faz işlemi yapıldı. Çalışmada, nitroimidazol bileşiklerinin geri kazanımlarının 100,5-101,7 arasında, tespit ve ölçüm limitlerinin sırasıyla 2,22-2,37 µg/l ve 2,66-3,12 µg/l, CCα ve CCβ değerlerinin sırasıyla 2,21-2,34 µg/l ve 2,35-2,58 µg/l arasında olduğu tespit edildi. Ayrıca, çalışma kapsamında Ankara ilinden toplanan 60 adet çiğ inek süt örneği LC/MS/MS ile nitroimidazol kalıntı varlığı yönünden analiz edildi ve elde edilen veriler neticesinde örneklerin nitroimidazol kalıntısı içermediği belirlendi. Sonuç olarak, nitroimidazollerin belirlenmesi için kullanılan yöntemin hassas ve doğru sonuç verdiği, tüketime sunulan çiğ sütlerin nitroimidazoller açısından tüketici sağlığı için bir risk oluşturmadığı görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Kalıntı, LC/MS/MS, nitroimidazol, süt

## **SUMMARY**

### **INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF NITROIMIDAZOLE GROUP DRUG RESIDUES USING LC/MS/MS IN RAW MILK CONSUMED AROUND ANKARA**

Nitroimidazoles are a group of drugs that are highly active against anaerobic bacteria and also against pathogens of protozoal infections. Their residues in animal products exhibit mutagenic and carcinogenic effects on humans. In this study, it was aimed to analyze the presence of residues of nitroimidazole group drugs in raw cow milk samples consumed in Ankara province with method validation for the determination of nitroimidazole and its metabolites by liquid-chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) and to determine the possible residue risk status for both animal health and consumers with the findings obtained. Pretreatments with ethyl acetate and n-hexane were carried out to obtain the compounds from the milk samples before the analysis, and in the last part, the samples were treated with methanol-water mixture and injected into LC/MS/MS. Analytes were separated on a C18 column and mobile phase treatment with acetonitrile and formic acid in water. In the study, it was determined that the recoveries of nitroimidazole compounds were between 100.5-101.7, detection and measurement limits were between 2.22-2.37 µg/l and 2.66-3.12 µg/l, respectively, and CC $\alpha$  and CC $\beta$  values were between 2.21-2.34 µg/l and 2.35-2.58 µg/l, respectively. In addition, 60 raw cow milk samples collected from Ankara province were analyzed for the presence of nitroimidazole residues by LC/MS/MS and it was determined that the samples did not contain nitroimidazole residues as a result of the data obtained. As a result, it was observed that the method used for the determination of nitroimidazoles gave sensitive and accurate results, and that the raw milk offered for consumption did not pose a risk to consumer health in terms of nitroimidazoles.

**Keywords:** Residue, LC/MS/MS, nitroimidazole, milk

## ÖNSÖZ

Tüm Dünya Ülkelerinde olduğu gibi Ülkemizde de hayvansal gıdalarda bulunabilecek veteriner ilaç kalıntılarının tespiti halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Bu ilaç kalıntılarının bazılarının çeşitli birincil hayvansal ürünlerde maksimum kalıntı limitlerinin (MRL) altında olmasına müsaade edilirken nitroimidazol gibi yasaklı maddelerde MRL değeri bulunmamaktadır. Fakat bu maddelerin yasa dışı kullanılması, yine bu maddelerin kazara ya da çevrede birikerek yem ve sular ile hayvanlara bulaşma durumları söz konusu olabilmektedir. Bu çalışmada, nitroimidazol ve metabolitlerinin sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) ile belirlenmesine yönelik metot validasyonu ile birlikte Ankara ilinde tüketime sunulan çiğ inek sütü örneklerinde nitroimidazol grubu ilaçların kalıntı varlığının analiz edilmesi ve elde edilen bulgular ile gerek hayvan sağlığı ve gerekse tüketiciler için olası kalıntı risk durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmamın seçilmesi ve yürütülmesi esnasında yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sinan İNCE, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Yavuz Osman BİRDANE, değerli hocalarım Prof. Dr. Hidayet YAVUZ, Doç. Dr. Ruhi TÜRKMEN ve Dr. Öğr. Üyesi Orkun ATİK'e, ayrıca laboratuvar analizleri aşamasında emeğini ve desteğini esirgemeyen Veteriner Hekim Dr. Özgen ÖZDEMİR'e, bu çalışmamın gerçekleşmesinde rol alan Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: 23.SAĞ.BİL.21) teşekkür ederim. Bunun yanında sevgili aileme de teşekkürü borç bilirim.

Ebru DURAL

Afyonkarahisar

2024

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

### KABUL VE ONAY

### BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

### ÖZET

i

### SUMMARY

ii

### ÖNSÖZ

iii

### İÇİNDEKİLER

iv

### SİMGELER VE KISALTMALAR

vi

### ŞEKİLLER

vii

### ÇİZELGELER

viii

### 1. GİRİŞ

1

#### 1.1. Süt

1

#### 1.2. Sütün fiziksel ve kimyasal özellikleri

1

#### 1.3. Antibiyotikler

2

#### 1.4. Nitroimidazol grubu antibiyotikler

3

#### 1.5. Nitroimidazollerin etki mekanizması

4

#### 1.6. Nitroimidazollerin toksisitesi, kanserojenliği ve mutajenitesi

5

#### 1.7. Sütlerde antibiyotik kalıntısı

6

#### 1.8. Çalışmanın önemi ve amacı

7

### 2. MATERYAL ve METOT

8

#### 2.1. Materyal

8

##### 2.1.1. Araç ve Gereçler

8

##### 2.1.2. Kimyasallar ve standartlar

8

#### 2.2. Metot

9

##### 2.2.1. Örneklerin analize hazırlanması

9

##### 2.2.2. Cihaz koşulları

10

##### 2.2.3. Validasyon metotları ve metot performans kriterleri

13

### 3. BULGULAR

17

#### 3.1. Validasyon analiz bulguları

17

##### 3.1.1. Lineer ölçüm aralığı

17

##### 3.1.2. Tespit limiti ve ölçüm limiti

21



|           |                                         |           |
|-----------|-----------------------------------------|-----------|
| 3.1.3.    | Kesinlik                                | 21        |
| 3.1.4.    | Geri kazanım, CC $\alpha$ ve CC $\beta$ | 23        |
| 3.2.      | Numunelerdeki analiz bulguları          | 24        |
| <b>4.</b> | <b>TARTIŞMA</b>                         | <b>28</b> |
| <b>5.</b> | <b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                | <b>32</b> |
| <b>6.</b> | <b>KAYNAKLAR</b>                        | <b>33</b> |
| <b>7.</b> | <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                         | <b>37</b> |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                  |                                                    |
|------------------|----------------------------------------------------|
| °C               | Santigrad derece                                   |
| μ                | Mikron                                             |
| cm <sup>2</sup>  | Santimetrekare                                     |
| CRL              | AB Topluluk Referans Laboratuvarı                  |
| CV               | Varyasyon katsayısı                                |
| dk               | Dakika                                             |
| DMZ              | Dimetridazol                                       |
| FDA              | Gıda İlaç Dairesi                                  |
| g                | Gram                                               |
| HMMNI            | 2-hidroksimetil-1-metil-5-nitroimidazol            |
| IPZ              | İpronidazol                                        |
| IPZOH            | 1-metil-2-(2-hidroksiizopropil)-5-nitroimidazol    |
| LC/MS/MS         | Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi      |
| LD <sub>50</sub> | Öldürücü doz 50                                    |
| LOD              | Tespit Limiti                                      |
| LOQ              | Ölçüm limiti                                       |
| MNZ              | Metronidazol                                       |
| MNZOH            | 1-(2-hidroksietil)-2-hidroksimetil-5-nitroimidazol |
| MRL              | Maksimum kalıntı limitleri                         |
| MRPL             | Minimum gerekli performans limiti                  |
| RG               | Resmi gazete                                       |
| RNZ              | Ronidazol                                          |
| SNZ              | Seknidazol                                         |
| TNZ              | Tinidazol                                          |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                        | SAYFA |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Şekil 1.1:</b> En yaygın nitroimidazol bileşiklerinin ve bunların metabolitlerinin kimyasal yapıları ve özellikleri | 4     |
| <b>Şekil 2.1:</b> Çalışma alanında toplanan çiğ süt örneklerinin konum haritası                                        | 10    |
| <b>Şekil 3.1:</b> DMZ standartının kalibrasyon eğrisi                                                                  | 17    |
| <b>Şekil 3.2:</b> HMMNI standartının kalibrasyon eğrisi                                                                | 18    |
| <b>Şekil 3.3:</b> IPZ standartının kalibrasyon eğrisi                                                                  | 18    |
| <b>Şekil 3.4:</b> IPZ-OH standartının kalibrasyon eğrisi                                                               | 19    |
| <b>Şekil 3.5:</b> MNZ standartının kalibrasyon eğrisi                                                                  | 19    |
| <b>Şekil 3.6:</b> MNZ-OH standartının kalibrasyon eğrisi                                                               | 20    |
| <b>Şekil 3.7:</b> RNZ standartının kalibrasyon eğrisi                                                                  | 20    |

## ÇİZELGELER

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 2.1:</b> LC/MS/MS ile yapılan kantitatif analizler için belirlenen MS/MS parametreleri                                             | 11 |
| <b>Çizelge 2.2:</b> LC/MS/MS ile yapılan kantitatif analizler için belirlenen çalışma koşulları                                               | 12 |
| <b>Çizelge 2.3:</b> Kütle spektrometrik tekniklerde göreceli iyon yoğunlukları için izin verilen maksimum toleranslar                         | 13 |
| <b>Çizelge 2.4:</b> CV değeri için kütle bölümü ve üretkenlik CV'si                                                                           | 14 |
| <b>Çizelge 2.5:</b> Geri kazanım değerinin belirlenme parametreleri                                                                           | 15 |
| <b>Çizelge 3.1:</b> DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait tespit ve ölçüm limitleri                                              | 21 |
| <b>Çizelge 3.2:</b> DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait tekrarlanabilirlik parametreleri                                       | 22 |
| <b>Çizelge 3.3:</b> DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait tekrar üretilebilirlik parametreleri                                   | 23 |
| <b>Çizelge 3.4:</b> DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait geri kazanım, CC $\alpha$ ve CC $\beta$ parametreleri                  | 24 |
| <b>Çizelge 3.5:</b> DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait kalibrasyon eğrileri, standart ve numune kromotogram analiz grafikleri | 25 |

## **1. GİRİŞ**

Hayvan ve insan sağlığı açısından önemli bir yere sahip olan sütün üretimi yanında kalitesinin de iyi olması istenir. Sütün kalitesini içeriğindeki besinsel öğeler ile birlikte yabancı maddelerden arındırılmış olması belirlemektedir. Sütün organik ve/veya inorganik maddelerle kontaminasyonu onun kalitesini bozduğu gibi tüketiciler açısından da tehlike oluşturabilir. Bu nedenle süt üreten hayvanların yetiştiriciliğinin iyi yapılması ve hayvanların hastalıklardan uzak tutulması önem arz etmektedir. Bu amaçla da birçok ilaç ve benzeri madde kullanımı söz konusu olmakta ve bu maddeler tüketici sağlığı açısından hayvan yetiştiriciliğinde sütün üretim sürecinde önemli yer tutmaktadır. Bu kapsamda yapılan bu tez çalışmasında, nitroimidazol ve metabolitlerinin sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) ile belirlenmesine yönelik metod validasyonu ile birlikte Ankara ilinde tüketime sunulan çiğ inek sütü örneklerinde nitroimidazol grubu ilaçların kalıntı varlığının analiz edilmesi ve elde edilen bulgular ile gerek hayvan sağlığı ve gerekse tüketiciler için olası kalıntı risk durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

### **1.1. Süt**

Süt memelilerin meme bezleri tarafından üretilen beyaz bir sıvıdır (Bateman vd., 2006). Süt, her yaştan insanın tüm beslenme ihtiyaçlarını karşılayan, oldukça besleyici bir gıdadır. Sütün tek başına süt veya süt ürünleri olarak tüketimi geleneğe, bulunabilirliğe, fiyata ve diğer nedenlere bağlı olarak bölgeler arasında önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Birçok ölkede dünya süt üretimi nüfus artışı, kentleşme, kişi başına düşen gelirin artması ve gıda tüketim tercihlerinin değişmesi nedeniyle artmaktadır (Pandya ve Ghodke, 2007). Süt kalitesi hayvanın türü ve diyetin içeriği gibi birçok faktöre bağlıdır ve kimyasal bileşiminin yanı sıra aroması ve rengiyle de değerlendirilir. Sütün besin içeriği ne kadar yüksek olursa sütün kalitesi de o kadar iyi olur (Chandan, 2008).

### **1.2. Sütün fiziksel ve kimyasal özellikleri**

Süt beyaz veya sarı-beyaz opak bir sıvıdır. Süt, proteinlerin, karbonhidratların, yağların, minerallerin, vitaminlerin ve diğer bileşenlerin karmaşık bir birleşimidir (Komorowski ve Early, 1992). Bu durum sütü dünyanın çeşitli yerlerinde tam bir gıda takviyesi olarak insan tüketimi için gerekli kılmaktadır. Süt keçi, koyun, inek ve deve gibi farklı hayvan

türlerinden elde edilebilir. Ancak inek sütü halen en çok tercih edilen süt türüdür (Musallam vd., 2017). Genel olarak tüm süt türleri aynı türden fakat farklı konsantrasyonlarda bileşenlerden oluşur. Sütte genellikle bulunan bazı element ve minerallerin kimyasal durumu, bunların bağırsakta emilmesi ve biyolojik olarak kullanılması yani taşınması, hücrelerde asimilasyonu ve biyolojik sistem formlarına dönüşmesi nedeniyle çok önemlidir. İnek, keçi ve koyun sütündeki bazı mineral elementlerin çözünebilir ve koloidal fazları arasındaki tuzlarının anlık dengesi, besin değeri özelliklerinin tanımlanması açısından önemlidir. Sütte bulunan tüm temel mineral elementler, tanımı gereği gençlerin büyümesi için gerekli olan besin gereksinimlerini içermektedir. Genellikle inek sütünde toplam kalsiyum içeriği yağsız bölümde kalsiyum fosfat olarak bulunur. İnek sütünde magnezyumun büyük bölümü yağsız süt fraksiyonunda % 40'ı magnezyum sitrat, % 7'si magnezyum-fosfat ve % 16'sı serbest iyon olarak bulunur (Bates ve Prentic, 1996). Fosfor insan vücudunda birçok önemli biyolojik bileşime sahip önemli bir elementtir. Çoğu vücut dokusunda ve sıvısında genellikle organik veya inorganik fosfat olarak bulunur ve lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler dahil olmak üzere birçok biyolojik bileşiğin ana bileşenidir. Keçi ve koyun sütündeki ana elementlerin genel konsantrasyonu inek sütüne göre nispeten daha yüksektir (sodyum hariç) ve insan sütüne göre birkaç kat daha yüksektir. Ana elementlerin konsantrasyonu büyük olasılıkla türe, hayvanın bireyselliğine, beslenme yöntemine, laktasyon aşamasına ve memelerin sağlık durumuna bağlı olmaktadır (Park ve Chukwu, 1988; Cashman, 2006). Sütteki bazı elementlerin içeriği kandakinden oldukça farklıdır. Kanla karşılaştırıldığında süt daha fazla potasyum, kalsiyum ve fosfor, daha az sodyum ve klorür içerir. Bununla birlikte, koyun, keçi ve inek sütü gibi bireysel hayvanlar arasında inek sütündeki demir ve çinkonun biyoyararlılığı oldukça yüksektir fakat insan sütünden önemli ölçüde daha düşüktür (Musallam vd., 2017).

### **1.3. Antibiyotikler**

Antibiyotikler mikroorganizmaları öldüren veya büyümesini durduran biyolojik veya çoğunlukla sentetik olarak elde edilen etkin biyoaktif maddelerdir. Antibiyotikler insan ve hayvan sağlığında hastalıkların tedavisi amacıyla, bunun yanı sıra besinlerin korunması amacıyla gıda sektöründe ve bilimsel araştırma faaliyetleri için de

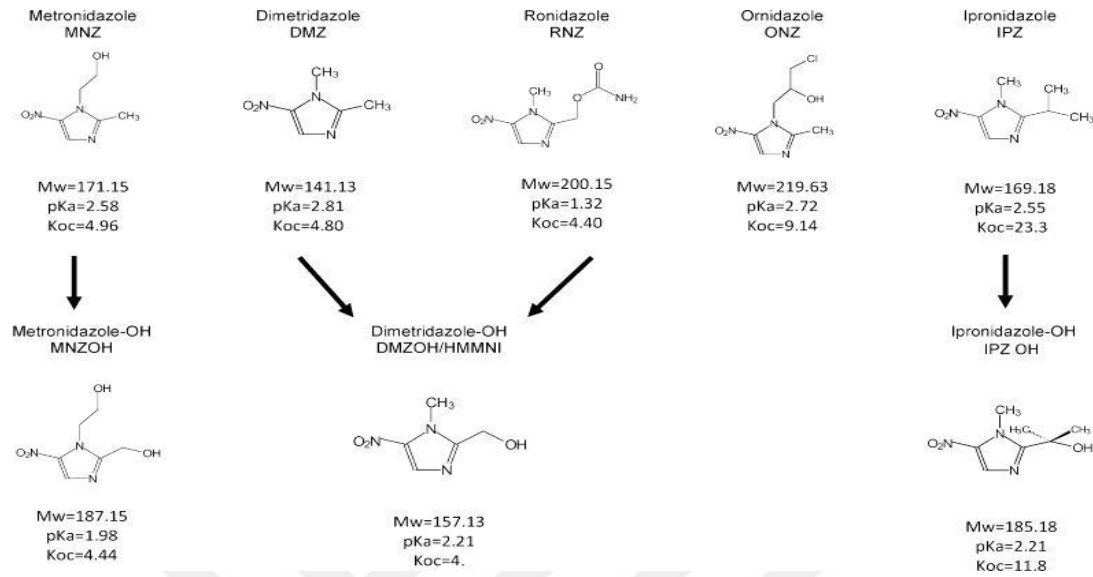
kullanılmaktadır. Bunların yanlış ve/veya aşırı kullanılmaları ve ayrıca reçetesiz olarak temin edilmeleri birçok zararları da beraberinde getirmektedir (Topal vd., 2015; Getahun vd., 2023). Antibakteriyel ilaçların yüksek konsantrasyonda çevrede yer alması mikroorganizmalar üzerinde toksik etkiye neden olurken, düşük konsantrasyonlarda mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç kazanmasına neden olmaktadır (Yalap ve Balcıoğlu, 2008).

#### **1.4. Nitroimidazol grubu antibiyotikler**

Nitroimidazoller, çoğu Gram-negatif ve birçok Gram-pozitif anaerobik bakteriye karşı etkili antibakteriyel ve antiprotozoal ilaç grubudur. Ancak aerobik bakterilere karşı sınırlı aktiviteleri vardır. Bunlar, insan ve veteriner hekimliğinde protozoonların (örn. *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolicia*) ve bakteriyel enfeksiyonların (koksidiyoz, hemorajik enterit) neden olduğu hastalıkları tedavi etmek için kullanılır. Ayrıca, büyümenin desteklenmesi ve yem verimliliğinin artırılması amacıyla da kullanımları olmaktadır (Lindsay ve Blagburn, 2001; Rabea vd., 2024). Nitroimidazoller beşeri hekimlikte anaerob bakteri enfeksiyonlarının tedavisi ve profilaksisi için ağızdan veya intravenöz olarak kullanılırlar. MNZ erişkinlerde, ağızdan genellikle günde 1-2 g dozunda kullanılır; bu doz 6 veya 12 saat ara ile 500 mg şeklinde verilir (Kayaalp, 2012).

Nitroimidazoller yapılarında bir nitrojen grubuna sahip imidazol heterosiklik bileşiklerdir. Bu bileşiklerin örnekleri arasında, metronidazol (MNZ, 1-(2-hidroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole), dimetridazol (DMZ, 1,2-dimethyl-5-nitroimidazole), ipronidazol (IPZ, 2-isopropyl-1-methyl-5-nitroimidazole), ronidazol (RNZ, 1-methyl-2-(carbamoylemethyl)-5-nitroimidazole), seknidazol (SNZ, 1-(hidroxypropyl)-2-methyl-5-nitroimidazole) ve tinidazol (TNZ, 1-(2-ethylsulfonyl-ethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole) yer almaktadır. Halkasında beşinci pozisyonda NO<sub>2</sub> grubu bulundurdıklarından 5-nitroimidazoller olarak bilinirler. Nitroimidazoller hızla metabolize edilir. DMZ, IPZ ve MNZ, sırasıyla HMMNI (2-hidroksimetil-1-metil-5-nitroimidazol) (HMMNI aynı zamanda DMZOH olarak da anılır), IPZOH (1-metil-2-(2-hidroksiizopropil)-5-nitroimidazol) ve MNZOH (1-(2-hidroksietil)-2-hidroksimetil-5-nitroimidazol) şeklinde metabolize edilir. RNZ farklı bir metabolik yola sahiptir ve DMZ metabolitinde bulunanla aynı olan imidazol halkasını içeren yalnızca küçük bir metabolit gösterir (Mahugo-

Santana vd., 2010; Rabea vd., 2024). En sık çalışılan nitroimidazollerin ve bunların ortak metabolitlerinin moleküler yapıları ve bazı özellikleri Şekil 1.1’de gösterilmektedir.



**Şekil 1.1:** En yaygın nitroimidazol bileşiklerinin ve bunların metabolitlerinin kimyasal yapıları ve özellikleri (Mahugo-Santana vd., 2010).

### 1.5. Nitroimidazollerin etki mekanizması

MNZ ve diğer nitroimidazoller ancak indirgendiklerinde toksiktir ve biyoredüksiyon düşük redoks potansiyelli elektron transfer sistemleri gerektirir. Genel olarak, nitroimidazollerin tek elektronlu indirgenme potansiyeli memeli redoks sistemlerinin normal aralığının dışında yer alır. Nitroimidazollerin tek elektronlu indirgenmesi, ya bir nitrit anyonuna ve bir imidazol radikaline ayrışabilen ya da ikinci bir elektron kabul ederek daha da indirgenebilen kararsız bir nitro radikal anyonuna yol açar (Edwards, 1993). Nitroimidazolün sürekli indirgenmesi uygun bir konsantrasyon gradyanı yaratarak ilacın hücre membranı boyunca sürekli akışına neden olur. Oksijen varlığında, nitro radikal anyonundan elektron oksijen tarafından soyutlanabilir, böylece ana bileşik yeniden üretilir ve nafile döngü olarak bilinen bir süreçle süperoksit oluşturulur. Nitroimidazollerin iki elektronlu indirgenmesi biraz daha kararlı nitrozo ara ürünlerine yol açar. Bu ara ürünler nitroimidazollerin biyolojik olarak aktif formu olabilir. Ne yazık ki, nitrozo bileşikler aynı zamanda memeli hücreleri için 1000 kat daha toksiktir ve bakteriyel sistemlerde ana nitro bileşiklerine göre 1000 kat daha fazla mutajeniktir; bu durum, memeli hücrelerinin öncelikle bu tür molekülleri azaltma yeteneğinin olmaması



nedeniyle nitroimidazollere duyarlı olmadığı kavramını desteklemektedir (Ehlhardt vd., 1988). Metronidazol ve diğer 5-nitroimidazollerin trikomonisidal aktivitesinin mekanizması, nitro gruplarının ferredoksin aracılı indirgenmesine bağlı olarak oluşan reaktif bir metabolit veya metabolitlerin DNA ile etkileşime girmesi ve daha sonra nükleik asit ve protein sentezinin inhibisyonuna yol açmasıdır. Öte yandan, nitroimidazollerin veya daha pozitif indirgeme potansiyeline sahip diğer bileşiklerin redoks döngüsü, toksikolojik öneme sahip olabilecek oksijen türevi metabolitlerin yüksek kararlı durum konsantrasyonlarının oluşmasıyla sonuçlanır. Nitroimidazollerin azaltılmış metabolitlerinin doku makromoleküllerine kovalent bağlanma ve/veya tiyollerin tükenmesi yoluyla hayvan dokuları üzerindeki toksik etkilerinde ve bunların mutajenik ve karsinojenik etkilerinde de yer alması muhtemel görünmektedir (Mital, 2009).

#### **1.6. Nitroimidazollerin toksisitesi, kanserojenliği ve mutajenitesi**

MNZ hayvanlarda ve insanlarda nispeten iyi tolere edilir; akut çalışmalarda sıçanlarda LD<sub>50</sub> değeri 1-5 g/kg'dır ve sıçanlarda 80 haftaya kadar 150 mg/kg'a varan dozlarda kronik toksisite sorunlarına ilişkin herhangi bir belirti görülmez. Maymunlar daha az duyarlı görünmektedir ve 225 mg/kg'a kadar olan dozlarda bile hiçbir olumsuz durum görülmemiştir (Roe, 1983).

Nitroimidazoller çeşitli deneysel modellerde mutajenik ve kanserojen olma özelliği sergilemektedir (Voogd, 1981). Mutajenite açısından MNZ, nitroimidazollerin en iyi araştırılan bileşiklerinden biridir. MNZ ve diğer 5-nitroimidazollerin mutajenitesi, fakültatif anaerobik bakterilerde, özellikle *S. typhimurium* ve *E. coli*'de incelenmiştir. MNZ, özellikle baz çifti test cihazı suşları kullanılıyorsa ve bakteriyel nitroredüktazlar mevcutsa bakteriler üzerinde mutajeniktir. Bunun alınmasından sonra insandan elde edilen serum seviyeleri bakterilerde mutasyona neden olacak düzeydedir. Ayrıca DNA ile etkileşim ve bağlanma anaerobik koşullar altında gerçekleşmekte ve bazen DNA kırılmaları gözlemlenmektedir. Ancak MNZ, memeli hücrelerinde *in vitro* mutajenik aktivite göstermez; mikronükleus testi negatiftir ve kromozom kırılmaları yalnızca anaerobik koşullar altında oluşur (Mital, 2009).

MNZ'nin kanseri tetikleme potansiyelini gösteren bir çalışmada, Rustia ve Shubik (1979) sıçanlarda MNZ ile tümörlerin indüklendiğini, dişilerde hepatom ve meme tümörleri

geliştiği ve erkeklerde hipofiz ve testis tümörlerinin sayısının arttığını bildirmiştir. Cavaliere vd. (1983) BALB/c farelerini kullanarak erkeklerde akciğer tümörlerinin ve dişilerde lenfomaların indüklendiğini rapor ederek MNZ'nin hayvanlarda kanserojen olduğunu ifade etmiştir. Benzer şekilde bir diğer çalışmalarında da MNZ ile Sprague-Dawley sıçanlarda meme tümörlerinin indüklendiğini gözlemlemişlerdir (Cavaliere vd., 1984).

### **1.7. Sütlerde antibiyotik kalıntısı**

Dünya çapında hayvancılıkta her yıl 63 bin tondan fazla antibiyotik kullanılmaktadır (Van Boeckel vd., 2015). Hayvancılıkta antibiyotikler hem tedavi edici hem de profilaktik amaçlarla kullanılmaktadır (Kümmerer, 2001). Bazı olumlu etkilerden dolayı, son zamanlarda çiftlik hayvanlarının büyümesini ve tedavisini teşvik etmek için dünya çapında çok sayıda antibiyotik kullanılmaktadır (Arikan, 2008). Hayvanlarda antimikrobiyallerin küresel kullanımı insanlara kıyasla iki kat daha fazladır ve birçok çalışma antibiyotiklerin önemli bölümlerinin (%30-70) evreye değişmeden, yani potansiyel antimikrobiyal aktiviteyle salındığını göstermiştir (Sarmah vd., 2006; Aarestrup, 2012). Süt, dünyada çok tüketilen ve insan sağlığı açısından da değeri büyük olan bir gıda maddesidir (Ventola, 2015). Hayvanların bulaşıcı hastalıklarının tedavisinde bilinçsiz kullanımları nedeniyle antibiyotik kalıntıları çoğunlukla sütte bulunur (Zhang vd., 2009). Ayrıca bazı antibiyotikler ayırım gözetmeksizin yem katkı maddesi olarak kullanılmakta; bu da sütteki antibiyotik kalıntılarının başka bir kaynağı olup sonuçta potansiyel halk sağlığı öneminden sorumlu olmaktadır (Na lampang vd., 2007).

Kalıntı terimi veteriner tıbbi ürünlerin uygulandığı hayvanlardan elde edilen gıda maddelerinde kalan farmakolojik olarak aktif maddeler ve bunların metabolitleri olarak tanımlanmaktadır. İlaçların çoğu hayvan vücuduna uygulandıktan sonra detoksifikasyon ve atılım amacıyla metabolize edilir. Genel olarak ana ürünün ve metabolitlerinin çoğu idrarla, daha az bir kısmı da dişkıyla atılır. Ancak atılımdan sonra ilaçların bir kısmı süt, yumurta ve ette belirli bir süre kalıntı olarak kalabilir (Sachi vd., 2019). Uygulanan antibiyotikler veya bunların metabolitleri konsantrasyonun belirli bir süre boyunca izin verilen seviyenin üzerinde olduğu hayvan dokularında ve matrislerinde birikmektedir (Nisha, 2008). Sütte antibiyotik kalıntılarının bulunmasının hayati nedenleri arasında kuru dönem inek tedavisi ve mastitis tedavisinde kullanımı büyük önem taşımaktadır

(Rossi vd., 2018). Gelişmekte olan ülkeler, sütteki kalıntılar nedeniyle gelişmiş ülkelere göre daha fazla risk altındadır. Maksimum kalıntı limitleri (MRL'ler) göz önüne alındığında, yetersiz tespit olanakları ve gıdalarda kalıntılara ilişkin uygun izleme sisteminin bulunmaması, süttten türetilmiş antibiyotik kalıntıları riskinin artmasının hayati nedenleri olarak gösterilebilir (Kebede vd., 2014).

Besinlerde bulunan antibiyotik kalıntılarını kontrol altında tutabilmek için ulusal ve uluslararası kuruluşlar tarafından yasal düzenlemeler yapılmaktadır. Sütlerde bulunabilecek farmakolojik aktif maddelerin sınıflandırılması ve MRL'leri Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde belirlenmiştir (RG, 2017). Bu yönetmeliğe göre, gıda kodeksi veteriner ilaçları MRL'leri mevzuatında yer alan maddelerin herhangi biri açısından, mevzuatta verilen MRL'leri aşan miktarda antibiyotik kalıntısı içeriyorsa çiğ süt piyasaya sunulamaz. Ayrıca, toplam antibiyotik kalıntılarının toplamı herhangi izin verilen değeri aşıyorsa çiğ süt piyasaya sunulamaz. Bu yönetmeliğe göre de metronidazol ve diğer nitroimidazol grubu antibiyotiklerde MRL bulunmamaktadır (RG, 2017).

#### **1.8. Çalışmanın önemi ve amacı**

Besinlerde bulunabilecek antibiyotik kalıntıların mevzuat ile belirlenmesi halk sağlığının korunmasına önemli ölçüde katkı sunabilecek uygulamalardan birisidir. Ancak son tüketime sunulan besinlerde MRL'lere yüzde yüz uyulduğunun garantisi maalesef yoktur. Nitroimidazollerin genotoksik, kanserojen ve mutajenik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Mital, 2009). Orijinal nitroimidazol halkası korunduğu için metabolitleri bazı hayvan türlerinde de kanserojen ve mutajenik etkilidir (Voogd, 1981). Bu durum, kalıntı kontrolleri sırasında sadece ana ilaçların değil metabolitlerinin de dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Yöntemin duyarlılığına bağlı olarak, ana ilacın veya onun metabolitinin örneklerde eş zamanlı tespiti pozitif numuneler görüldüğünde sağlık üzerindeki etkilerini ve risk durumunun değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarır. Bu nedenle yapılan bu tez çalışmasında, süt örneklerinde nitroimidazol ve metabolitlerinin LC/MS/MS ile belirlenmesine yönelik metot validasyonu ile birlikte Ankara ilinde tüketime sunulan çiğ süt örneklerinde nitroimidazol grubu ilaçların kalıntı varlığının LC/MS/MS ile analiz edilmesi ve elde edilen bulgular ile gerek hayvan sağlığı ve gerekse tüketiciler için olası kalıntı risk durumunun belirlenmesi sağlandı.

## **2. MATERYAL ve METOT**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Araç ve Gereçler**

Santrifüj tüpü 50 ml'lik,

Cam tüp 15 ml'lik,

Enjektör 2 ml'lik,

0.2 mikron RC filtre (Filtre çapı en fazla 15 mm olmalıdır)

Pipet ucu (200–1000–5000 µl'lik),

Ayarlanabilir pipet 20–200 µl

Ayarlanabilir pipet 100–1000 µl

Ayarlanabilir pipet 1000–5000 µl

Hassas terazi (GB 10288),

Multireaks vorteks (253030604010507000009),

Soğutmalı santrifüj (GB 10159 ve 253030603190212000002 )

Numune yoğunlaştırıcı (GB 10323 ve 2530306070812000001)

Agilent 6460 Triple Quadrapole LC/MS/MS

#### **2.1.2. Kimyasallar ve standartlar**

Metronidazol (MNZ, 1-(2-hydroxyethyl)-2- methyl-5-nitroimidazole), dimetridazol (DMZ, 1,2-dimethyl- 5-nitroimidazole), ipronidazol (IPZ, 2-isopropyl-1-methyl-5-nitroimidazole), ronidazol (RNZ, 1-methyl-2-(carbamoylmethyl)- 5-nitroimidazole), HMMNI (2-hidroksimetil-1-metil-5-nitroimidazol), IPZOH (1-metil-2-(2-hidroksiizopropil)-5-nitroimidazol), MNZOH (1-(2-hidroksietil)-2-hidroksimetil-5-nitroimidazol), dimetridazol-d3 (DMZ-d3), dimetridazol-2-hidroksi-d3 (HMMNI-d3), ipronidazol-d3 (IPZ-d3), Metronidazole-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub> (MNZ-<sup>13</sup>C<sub>2</sub><sup>15</sup>N<sub>2</sub>), hidroksi ipronidazol

(IPZ-OH-d3), hidroksi metronidazol (MNZ-OH-d2), ronidazol d3 (RNZ-d3), asetonitril, etilasetat, formik asit ve n-hekzan yüksek saflıkta olacak şekilde Merck'den (Istanbul, Turkey) temin edildi. Her bir bileşik asetonitrilde çözdürüldü ve 200 µg/l içeren miks solüsyon hazırlandı.

## **2.2. Metot**

### **2.2.1. Örneklerin analize hazırlanması**

Validasyon parametrelerinin belirlenmesi için kalıntı içermeyen süt örnekleri 3500 g, +4°C'de 15 dk süreyle santrifüj edildi ve üstteki yağ tabakası çıkarıldı. 50 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine 4 ml süt örneği alındı. Üzerine standart çözelti karışımı (40, 80 ve 200 µl), internal standart çözelti karışımı (100 µl) 1 dk boyunca 2000 rpm'de vorteks ile çalkalandı. Üzerine etilasetat (100 ml) ilave edildi ve karışım vorteksle 5 dk boyunca çalkalandı. Sonrasında 4000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında oluşan organik faz (7 ml miktarında) 15 ml'lik cam tüpe alındı ve 40 °C sıcaklıkta ve 5.0 psi azot akımı altında uçurma işlemi gerçekleştirildi. Kuru kalıntı 1,5 ml n-hekzan ile sulandırıldı ve 5 dk süreyle vorteksle karıştırıldı. Üzerine 1 ml asetonitril (20) / su (80) ilave edildi ve 5 dk süreyle vorteksle karıştırıldı. Şırınga ile alt fazdan 0,5 ml numuneler alındı ve 0,2 µm şırınga filtresi kullanılarak vial içerisine süzüldü. LC-MS/MS sistemine 10 µl enjeksiyon yapıldı.

Ağustos ve Ekim 2023 tarihleri arasında Ankara ilinin 5 farklı ilçesinden (Haymana, Ayaş, Akyurt, Bala ve Gölbaşı) toplamda 60 adet çiğ inek süt örneği rastgele toplandı (Şekil 2.1). Süt numuneleri ineklerin memelerinden steril şişeye en az 15 ml alındı. Numuneler buz paketleri içerisinde buz kutusunda laboratuvara nakledildi ve analizlere kadar -20 °C'de saklandı. Süt numunesi ekstraksiyonları (standart ekleme hariç) standartlar için belirlenen işlemlere göre gerçekleştirildi.



**Şekil 2.1:** Çalışma alanında toplanan çiğ süt örneklerinin konum haritası.

### 2.2.2. Cihaz koşulları

Kromatografik analizler, LC/MS/MS ekipmanı ve MassHunter yazılımı (B.07.00) ile gerçekleştirildi. Kromatografik ayırmalar, bir C18 kolonu (Agilent Proshell 120 SB:C18 2,7µm 100x3,0 mm / PN= 685975-302) üzerinde gerçekleştirildi. Mobil faz olarak sırasıyla su/asetonitril (95/5) ve suda % 0,1 formik asit kullanıldı.

Gradient koşulları; 0-5 dk %100, 5-6 dk %10 ve 6-15 dk %100 ve akış hızı 0,20 ml/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µl olarak belirlendi. Numunelerin analizi pozitif ESI-MS-MS iyon modunda gerçekleştirildi. Her bileşiğin MS/MS parametreleri ve öncü ürün iyonları, SRM modunda doğrudan infüzyon şeklinde gerçekleşti. Cihazın MS/MS parametreleri Çizelge 2.1’de belirtilen şekilde ayarlandı. Kantitatif analiz, iyonizasyon (ESI) modu kullanılarak Çizelge 2.2’de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. Ayrıca göreceli iyon yoğunlukları için izin verilen maksimum toleranslar Çizelge 2.3’de ifade edildi.

**Çizelge 2.1:** LC/MS/MS ile yapılan kantitatif analizler için belirlenen MS/MS parametreleri

|                                   |            |        |
|-----------------------------------|------------|--------|
| İyonizasyon Modu                  | ESI +      |        |
| API Nebülizatör gaz basıncı       | 45 psi     |        |
| Kurutma gazı sıcaklığı            | 325 °C     |        |
| Kurutma gazı basıncı              | 10 psi     |        |
| Tarama Süresi                     | 0.700 sec  |        |
| SIM Genişliği                     | 0.7 amu    |        |
| İğne                              | + 35V      |        |
| Kalkan                            | + 500V     |        |
| Kılcal                            | + 3500V    |        |
| Detektör                          | + 1750 V   |        |
| CID Gaz Basıncı                   | 2.00 mTorr |        |
| Amu cinsinden kütle pik genişliği | Q1=1.0     | Q3=1.0 |

**Çizelge 2.2:** LC/MS/MS ile yapılan kantitatif analizler için belirlenen çalışma koşulları

| <b>Analit</b>                                                  | <b>MS MH+</b><br><b>(m/z)</b> | <b>MS-MS</b><br><b>(m/z)</b> | <b>Fregmento</b> | <b>Collision</b><br><b>Enerjisi</b> | <b>Bekleme</b><br><b>Süresi</b><br><b>(dk)</b> |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------|
| DMZ                                                            | 142                           | 96,1                         | 90V              | 12                                  | 30                                             |
| DMZ                                                            | 142                           | 95                           | 90V              | 22                                  | 30                                             |
| DMZ-d3                                                         | 145,1                         | 99                           | 90V              | 14                                  | 30                                             |
| HMMNI                                                          | 158,1                         | 140                          | 90V              | 6                                   | 30                                             |
| HMMNI                                                          | 158,1                         | 55,1                         | 90V              | 16                                  | 30                                             |
| HMMNI-d3                                                       | 161,1                         | 143,1                        | 90V              | 8                                   | 30                                             |
| IPZ                                                            | 170,1                         | 124,2                        | 100V             | 14                                  | 30                                             |
| IPZ                                                            | 170,1                         | 109,2                        | 100V             | 24                                  | 30                                             |
| IPZ-d3                                                         | 173,1                         | 127,2                        | 110V             | 16                                  | 30                                             |
| MNZ                                                            | 172,1                         | 128,1                        | 90V              | 10                                  | 30                                             |
| MNZ                                                            | 172,1                         | 82,1                         | 90V              | 24                                  | 30                                             |
| MNZ- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> | 176,1                         | 132,1                        | 90V              | 10                                  | 30                                             |
| IPZ-OH                                                         | 186,1                         | 168,1                        | 90V              | 8                                   | 30                                             |
| IPZ-OH                                                         | 186,1                         | 122,1                        | 90V              | 18                                  | 30                                             |
| IPZ-OH-d3                                                      | 189,1                         | 126,1                        | 90V              | 18                                  | 30                                             |
| MNZ-OH                                                         | 188,1                         | 123,1                        | 90V              | 8                                   | 30                                             |
| MNZ-OH                                                         | 188,1                         | 126,1                        | 90V              | 12                                  | 30                                             |
| MNZ-OH-d2                                                      | 190,1                         | 125,1                        | 90V              | 8                                   | 30                                             |
| RNZ                                                            | 201,1                         | 140,1                        | 70V              | 4                                   | 30                                             |
| RNZ                                                            | 201,1                         | 55,2                         | 70V              | 18                                  | 30                                             |
| RNZ-d3                                                         | 204,1                         | 143,1                        | 70V              | 4                                   | 30                                             |



**Çizelge 2.3:** Kütle spektrometrik tekniklerde göreceli iyon yoğunlukları için izin verilen maksimum toleranslar

| Göreceli yoğunluk (baz pik %'si) | EL-GC-MS (göreceli) | CI-GC-MS, GC-MS <sup>n</sup> , LC-MS, LC-MS <sup>n</sup> (göreceli) |
|----------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------|
| > %50                            | ± % 10              | ± % 20                                                              |
| > %20 - %50                      | ± % 15              | ± % 25                                                              |
| > %10 - %20                      | ± % 20              | ± % 30                                                              |
| ≤ %10                            | ± % 50              | ± % 50                                                              |

### 2.2.3. Validasyon metotları ve metot performans kriterleri

Validasyon metodu, proteinlerin çöktürülmesi ve uzaklaştırılması, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması ve LC/MS/MS ile analizin yapılması şeklinde gerçekleştirildi.

Bu metodun validasyon çalışması, 2002/657/EC Avrupa Komisyonu Topluluklarının kararına göre, aşağıdaki parametreler göz önüne alınarak yapıldı;

#### *I. Lineer Ölçüm Aralığı (Matrix matched linearity and range)*

Lineer ölçüm aralığını belirlemek için 4 farklı konsantrasyonda 1 tekrarlı zenginleştirilmiş örnek hazırlandı ve 3'er enjeksiyon yapıldı.

#### *II. Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti (limit of detection and limit of quantitation)*

Lineer ölçüm aralığında oluşturulan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak tespit ve ölçüm limitleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Tespit Limiti (LOD)} = 3 \cdot \text{SD} + C_{\text{ort}}$$

$$\text{Ölçüm Limiti (LOQ)} = 10 \cdot \text{SD} + C_{\text{ort}}$$

SD: 1. zenginleştirme seviyesindeki standart sapma

C<sub>ort</sub>: 1. zenginleştirme seviyesindeki ölçüm sonuçlarının ortalaması

#### *III. Kesinlik (precision)*

-Tekrarlanabilirlik (repeatability);

I. Örnek numuneye zenginleştirme ekstraksiyona başlamadan yapıldı,

II. Yasaklı maddeler için saptanabilen en alt limitte ve bu limitin 2 katı konsantrasyonda, MRL'si olan maddelerde 0,5 MRL ve MRL seviyesinde 5'er zenginleştirilmiş örnek üç farklı günde hazırlandı ve bunların birer enjeksiyonu yapıldı,

III. Her iki analizci için ortalama ölçüm sonuçları, standart sapmaları ve CV değerleri ayrı ayrı hesaplandı.

$$CV = (SD/C_{ort}) \times 100$$

SD: Ölçüm sonuçlarının standart sapması

C<sub>ort</sub>: Ölçüm sonuçlarının ortalaması

CV değerinin uygunluğu 2002/657/EC Avrupa Komisyonu Topluluklarının kararında yer alan Çizelge 2.4'e göre değerlendirildi (\*100 µg/l'den düşük kitle bölümleri için Hortwitz Denklemi, kabul edilemeyecek yüksek değerler verir. Bu nedenle, 100 µg/l'den daha düşük konsantrasyonlar için CV'ler mümkün olduğu kadar düşük olmalıdır)

Hortwitz Denklemi;  $CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$

**Çizelge 2.4:** CV değeri için kütle bölümü ve üretkenlik CV'si

| Kütle bölümü | Üretkenlik CV'si (%) |
|--------------|----------------------|
| 1 µg/l       | (*)                  |
| 10 µg/l      | (*)                  |
| 100 µg/l     | 23                   |
| 1000 µg/l    | 16                   |

-Tekrar üretilebilirlik (reproducibility)

Tekrar üretilebilirlik çalışması aşağıdaki şekilde yapıldı,

- I. Örnek numuneye zenginleştirme ekstraksiyona başlamadan yapıldı,
- II. Yasaklı maddeler için saptanabilen en alt limitte ve bu limitin 2 katı konsantrasyonda, MRL'si olan maddelerde 0,5 MRL ve MRL seviyesinde 5'er zenginleştirilmiş örnek üç farklı günde ve iki farklı analizci tarafından hazırlandı ve bunların birer enjeksiyonu yapıldı,
- III. Her iki analizci için ölçüm sonuçlarının genel ortalaması, genel standart sapmaları ve genel CV değerleri ayrı ayrı hesaplandı.
- IV. Tekrar üretilebilirlik standart sapması ( $SD_{wIR}$ ) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$SD_{wIR} = (SD_W^2 + SD_B^2)^{1/2}$$

$SD_W$ : 1. Analizci ölçüm sonuçlarının standart sapması

$SD_B$ : 1. ve 2. Analizci ölçüm sonuçlarının genel standart sapması

#### IV. Geri kazanım (recovery)

Geri kazanım çalışması 2 farklı seviyede zenginleştirilmiş örneklerle 5 paralel olacak şekilde, 2 ayrı kişi tarafından 3 farklı günde gerçekleştirildi. Geri kazanım zenginleştirme seviyesi ve ölçüm sonuçlarına göre aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Geri kazanım (\%)} = (\text{Ölçüm sonucu} / \text{zenginleştirme seviyesi}) \times 100$$

Geri kazanım değerinin uygunluğu 2002/657/EC Avrupa Komisyonu Topluluklarının kararında yer alan Çizelge 2.5'e göre değerlendirildi.

**Çizelge 2.5:** Geri kazanım değerinin belirlenme parametreleri

| Kütle parçası                               | Aralık          |
|---------------------------------------------|-----------------|
| $\leq 1 \mu\text{g/l}$                      | - %50 ile + %20 |
| $> 1 \mu\text{g/kg}$ ile $10 \mu\text{g/l}$ | - %30 ile + %10 |
| $\geq 10 \mu\text{g/l}$                     | - %20 ile + %10 |

#### V. Karar sınırları ( $CC\alpha$ ) ve Tespit yetenekleri ( $CC\beta$ )

1. ve 2. analizci tarafından hazırlanan zenginleştirilmiş toplam 30 örneğin analiz sonuçlarından (MRL'si olan maddeler için MRL düzeyinde, yasaklı maddeler için 1. zenginleştirme seviyesinden) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Yasaklı maddeler için;

$$CC\alpha = C_1 + 2,33 \times SD_{wIR}$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times SD_{wIR,CC\alpha}$$

$C_1$  : 1. zenginleştirme seviyesi

$SD_{wIR}$  : Tekrarüretilebilirlik standart sapması (1. zenginleştirme seviyesi)

MRL'si olan maddeler için;

$$CC\alpha = C_2 + 1,64 \times SD_{wIR,MKL}$$

$$CC\beta = MKL + 3,28 \times SD_{wIR,MKL}$$

$C_2$  : 2. zenginleştirme seviyesi (MRL)

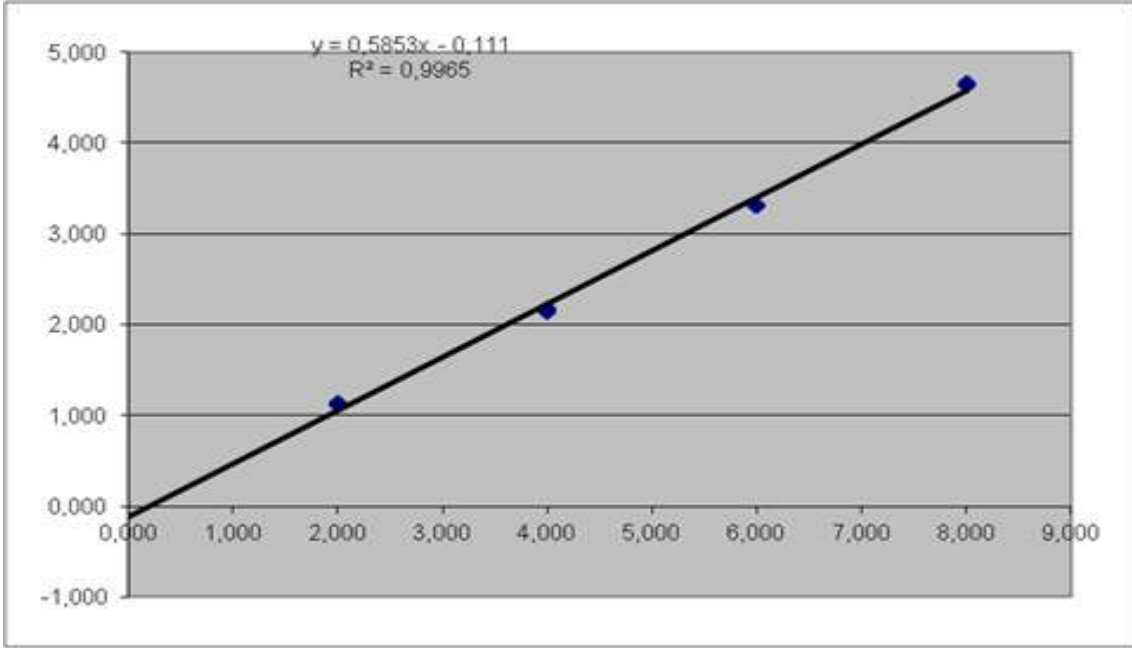
$SD_{wIR,MKL}$  : Tekrarüretilebilirlik standart sapması (MRL seviyesi)

### 3. BULGULAR

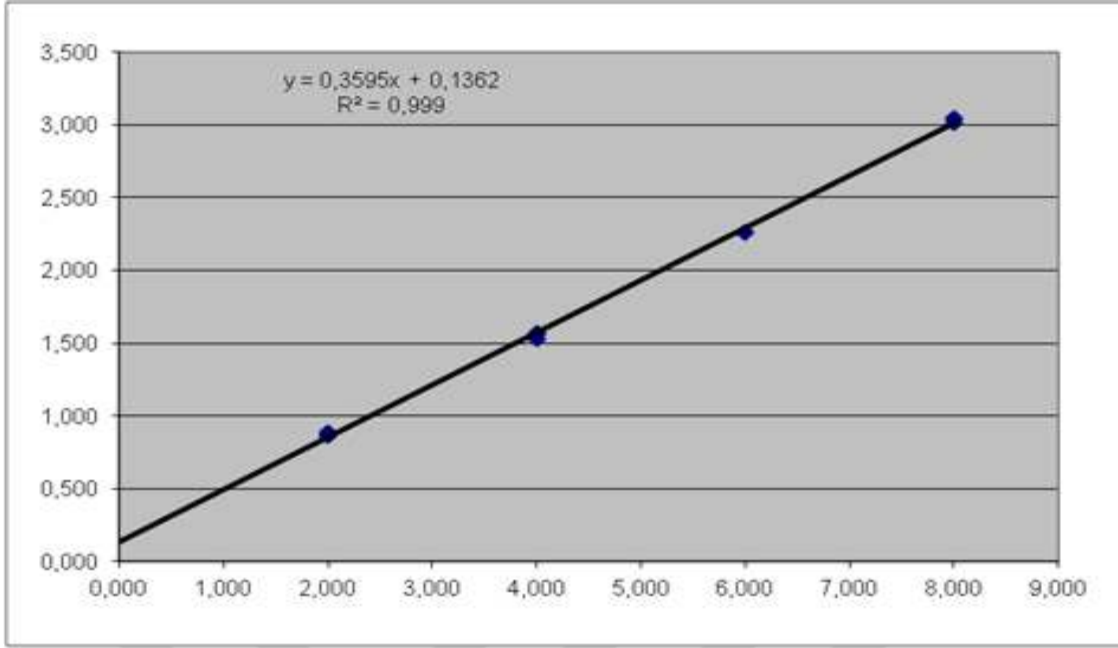
#### 3.1. Validasyon analiz bulguları

##### 3.1.1. Lineer ölçüm aralığı

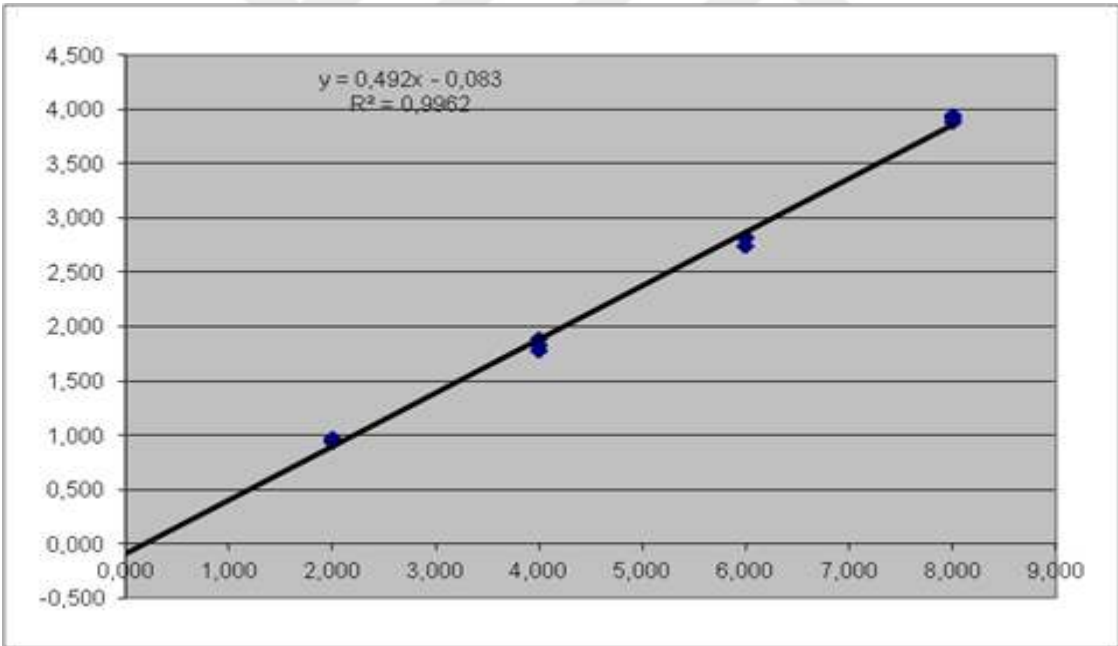
DMZ (Şekil 3.1), HMMNI (Şekil 3.2), IPZ (Şekil 3.3), IPZ-OH (Şekil 3.4), MNZ (Şekil 3.5), MNZ-OH (Şekil 3.6) ve RNZ (Şekil 3.7) standartlarının miktarının belirlenmesine yönelik kalibrasyon eğrileri ESI modu tarafından incelenen aralık üzerinde korelasyon katsayıları ( $R^2 > 0.99$ ) ile iyi bir doğrusallık gösterdi.



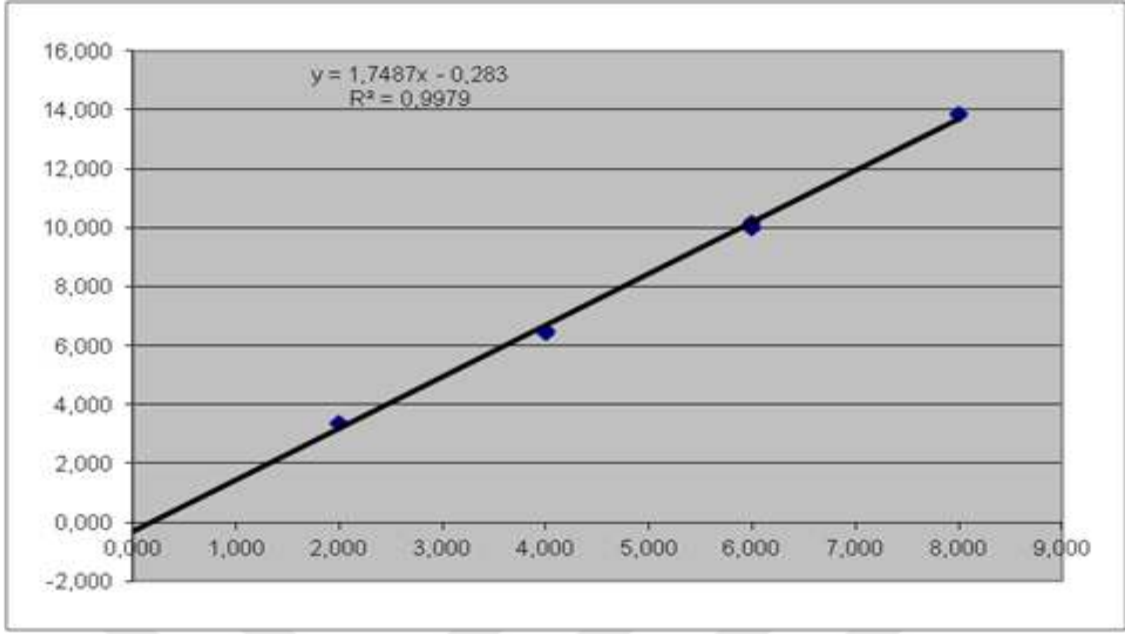
Şekil 3.1: DMZ standartının kalibrasyon eğrisi



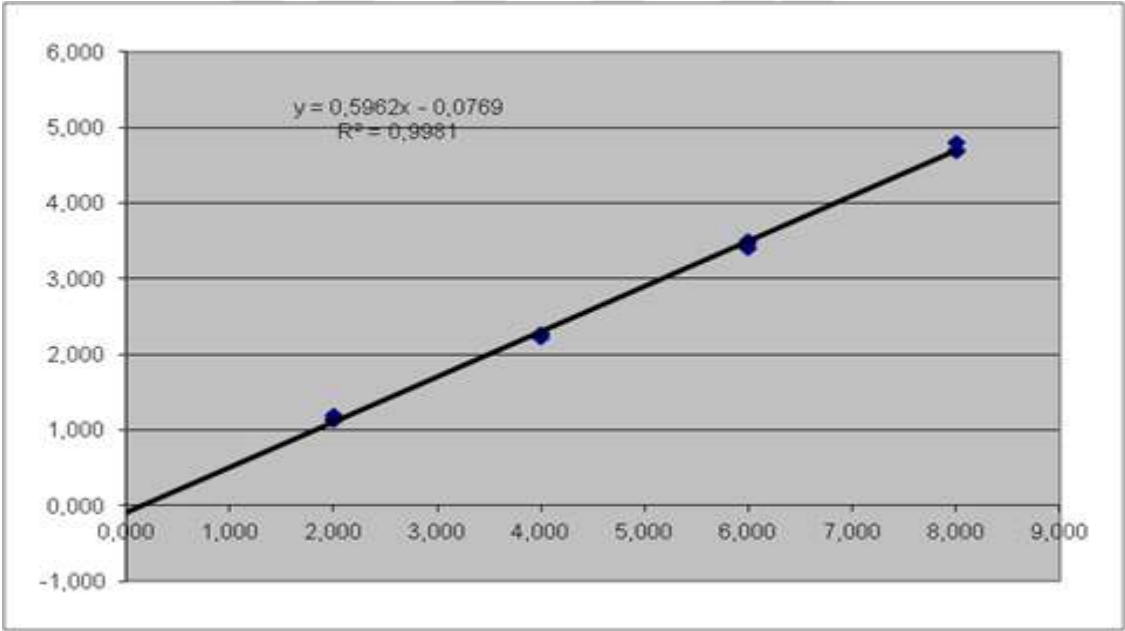
Şekil 3.2: HMMNI standartının kalibrasyon eğrisi



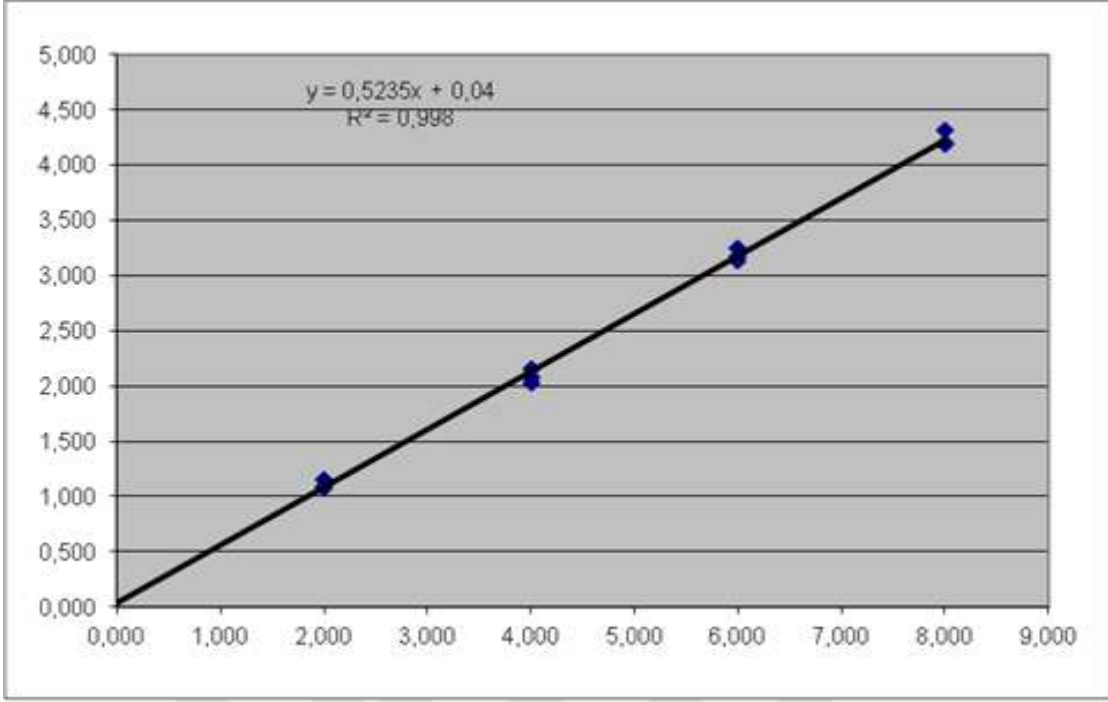
Şekil 3.3: IPZ standartının kalibrasyon eğrisi



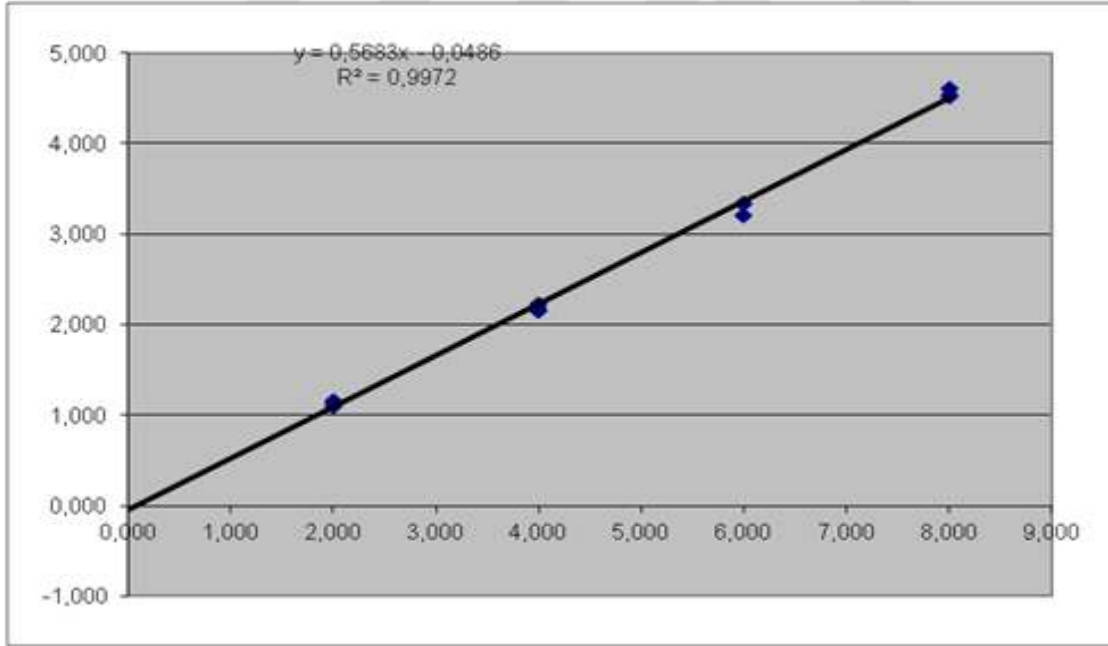
Şekil 3.4: IPZ-OH standartının kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.5: MNZ standartının kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.6: MNZ-OH standartının kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.7: RNZ standartının kalibrasyon eğrisi



### 3.1.2. Tespit limiti ve ölçüm limiti

Her bir standartta ait LOD ve LOQ limitleri Çizelge 3.1’da verildi. Analitlerin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2,23-2,37 µg/l ve 2,66-3,12 µg/l arasında belirlendi.

**Çizelge 3.1:** DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ’ye ait tespit (LOD) ve ölçüm (LOQ) limitleri.

| Analit | LOD (µg/l) | LOQ (µg/l) |
|--------|------------|------------|
| DMZ    | 2,23       | 2,67       |
| HMMNI  | 2,30       | 2,97       |
| IPZ    | 2,37       | 3,12       |
| IPZ-OH | 2,22       | 2,66       |
| MNZ    | 2,31       | 2,96       |
| MNZ-OH | 2,30       | 3,02       |
| RNZ    | 2,23       | 2,75       |

### 3.1.3. Kesinlik

DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ’ye ait tekrarlanabilirlik Çizelge 3.2’de ve tekrar üretilebilirlik parametreleri Çizelge 3.3’de verildi. Analitlerin tekrarlanabilirlik değerleri 2 µg/l konsantrasyonda 1,994-2,064 ve 4 µg/l konsantrasyonda 3,991-4,053 arasında tespit edildi. Tekrar üretilebilirlik değerlerinin ise 2 µg/l konsantrasyonda 2,005-2,049 ve 4 µg/l konsantrasyonda 3,989-4,038 arasında olduğu belirlendi.

**Çizelge 3.2:** DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait tekrarlanabilirlik parametreleri.

| Analit        | Zenginleştirme<br>seviyesi (µg/l) | Ortalama |       | SD    |       | CV  |     |
|---------------|-----------------------------------|----------|-------|-------|-------|-----|-----|
|               |                                   | 1        | 2     | 1     | 2     | 1   | 2   |
| <b>DMZ</b>    | 2                                 | 2,044    | 2,054 | 0,063 | 0,072 | 3,1 | 3,5 |
| <b>DMZ</b>    | 4                                 | 4,053    | 4,022 | 0,081 | 0,099 | 2,0 | 2,5 |
| <b>HMMNI</b>  | 2                                 | 2,015    | 1,994 | 0,095 | 0,126 | 4,7 | 6,3 |
| <b>HMMNI</b>  | 4                                 | 4,043    | 4,009 | 0,119 | 0,121 | 2,9 | 3,0 |
| <b>IPZ</b>    | 2                                 | 2,054    | 2,036 | 0,107 | 0,074 | 5,2 | 3,6 |
| <b>IPZ</b>    | 4                                 | 4,004    | 3,973 | 0,102 | 0,085 | 2,6 | 2,1 |
| <b>IPZ-OH</b> | 2                                 | 2,032    | 2,019 | 0,062 | 0,066 | 3,1 | 3,3 |
| <b>IPZ-OH</b> | 4                                 | 3,991    | 3,987 | 0,085 | 0,064 | 2,1 | 1,6 |
| <b>MNZ</b>    | 2                                 | 2,025    | 2,064 | 0,093 | 0,069 | 4,6 | 3,4 |
| <b>MNZ</b>    | 4                                 | 4,003    | 4,009 | 0,109 | 0,080 | 2,7 | 2,0 |
| <b>MNZ-OH</b> | 2                                 | 1,997    | 2,021 | 0,102 | 0,078 | 5,1 | 3,8 |
| <b>MNZ-OH</b> | 4                                 | 4,021    | 4,051 | 0,216 | 0,123 | 5,4 | 3,0 |
| <b>RNZ</b>    | 2                                 | 2,005    | 2,039 | 0,075 | 0,092 | 3,7 | 4,5 |
| <b>RNZ</b>    | 4                                 | 4,019    | 3,959 | 0,108 | 0,081 | 2,7 | 2,1 |

**Çizelge 3.3:** DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait tekrar üretilebilirlik parametreleri.

| <b>Analit</b> | <b>Zenginleştirme</b>  | <b>Ortalama</b> | <b>SD</b> | <b>CV</b> | <b>SDwIR</b> |
|---------------|------------------------|-----------------|-----------|-----------|--------------|
|               | <b>seviyesi (µg/l)</b> |                 |           |           |              |
| <b>DMZ</b>    | 2                      | 2,049           | 0,067     | 3,249     | 0,092        |
| <b>DMZ</b>    | 4                      | 4,038           | 0,090     | 2,232     | 0,121        |
| <b>HMMNI</b>  | 2                      | 2,005           | 0,110     | 5,487     | 0,145        |
| <b>HMMNI</b>  | 4                      | 4,026           | 0,119     | 2,955     | 0,168        |
| <b>IPZ</b>    | 2                      | 2,045           | 0,091     | 4,437     | 0,140        |
| <b>IPZ</b>    | 4                      | 3,989           | 0,093     | 2,342     | 0,138        |
| <b>IPZ-OH</b> | 2                      | 2,025           | 0,064     | 3,141     | 0,089        |
| <b>IPZ-OH</b> | 4                      | 3,989           | 0,074     | 1,853     | 0,112        |
| <b>MNZ</b>    | 2                      | 2,045           | 0,083     | 4,072     | 0,125        |
| <b>MNZ</b>    | 4                      | 4,006           | 0,094     | 2,344     | 0,144        |
| <b>MNZ-OH</b> | 2                      | 2,009           | 0,090     | 4,481     | 0,136        |
| <b>MNZ-OH</b> | 4                      | 4,036           | 0,174     | 4,300     | 0,277        |
| <b>RNZ</b>    | 2                      | 2,022           | 0,084     | 4,153     | 0,112        |
| <b>RNZ</b>    | 4                      | 3,989           | 0,099     | 2,477     | 0,146        |

#### 3.1.4. Geri kazanım, CC $\alpha$ ve CC $\beta$

DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait geri kazanım, CC $\alpha$  ve CC $\beta$  parametreleri Çizelge 3.4'da verildi. Analitlerin geri kazanım değerlerinin 100,5-101,7, CC $\alpha$  ve CC $\beta$  değerlerinin ise 2,21-2,34 ve 2,35-2,58 µg/l aralıklarında olduğu tespit edildi.

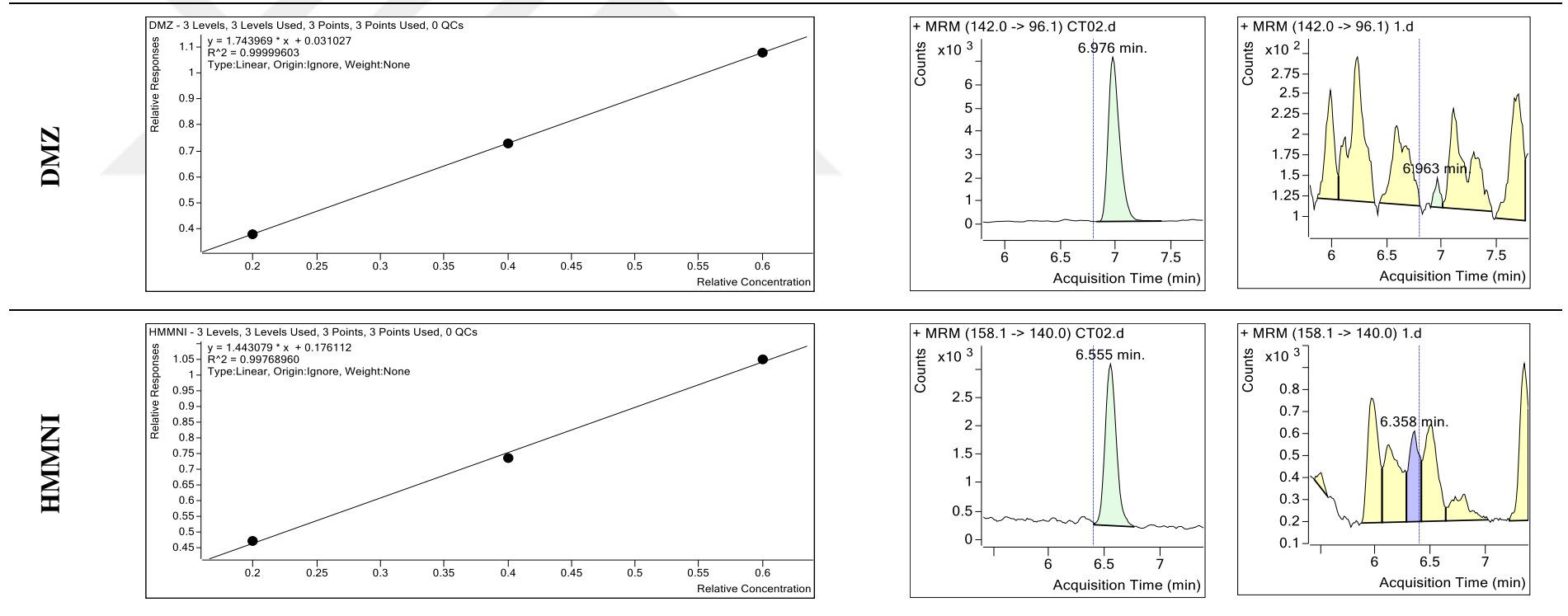
**Çizelge 3.4:** DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait geri kazanım, CC $\alpha$  ve CC $\beta$  parametreleri

| <b>Analit</b> | <b>Geri kazanım<br/>(%)</b> | <b>CC<math>\alpha</math><br/>(<math>\mu</math>g/l)</b> | <b>CC<math>\beta</math><br/>(<math>\mu</math>g/l)</b> |
|---------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>DMZ</b>    | 101,7                       | 2,21                                                   | 2,36                                                  |
| <b>HMMNI</b>  | 100,5                       | 2,34                                                   | 2,58                                                  |
| <b>IPZ</b>    | 101,0                       | 2,33                                                   | 2,56                                                  |
| <b>IPZ-OH</b> | 100,5                       | 2,21                                                   | 2,35                                                  |
| <b>MNZ</b>    | 101,2                       | 2,29                                                   | 2,50                                                  |
| <b>MNZ-OH</b> | 100,7                       | 2,32                                                   | 2,54                                                  |
| <b>RNZ</b>    | 100,5                       | 2,26                                                   | 2,45                                                  |

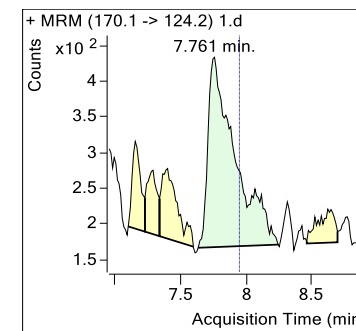
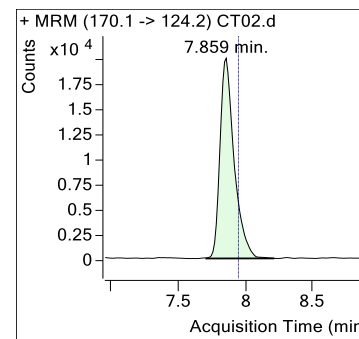
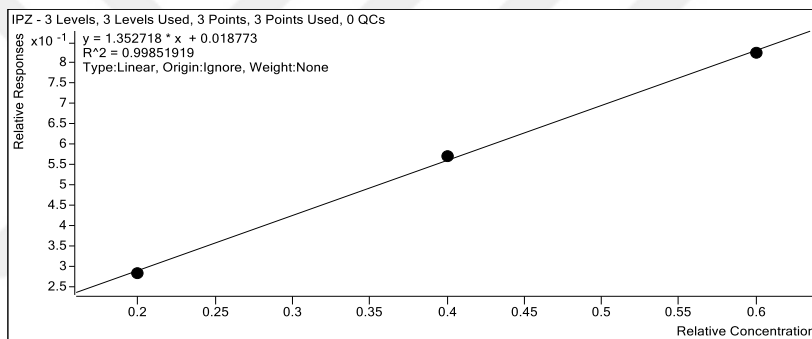
### 3.2. Numunelerdeki analiz bulguları

Valide edilmiş metod ile çalışmada kullanılan standartlar olan DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığı  $> 0,99$  olarak belirlendi (Çizelge 3.5). Ayrıca analizi yapılan tüm süt örneklerinde bu maddelerin miktarlarının tespit limitlerinin altında kaldığı ve dolayısıyla örneklerin nitroimidazol ilaç kalıntısı ihtiva etmediği belirlendi.

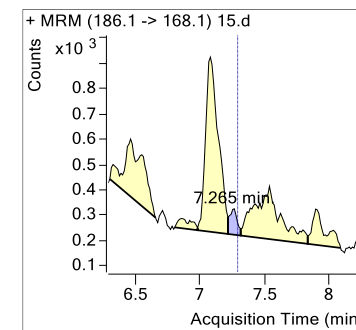
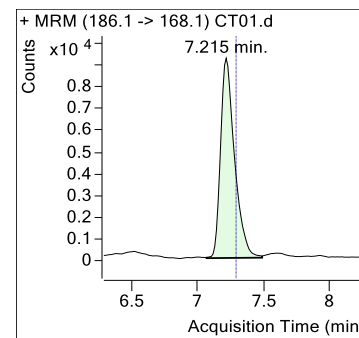
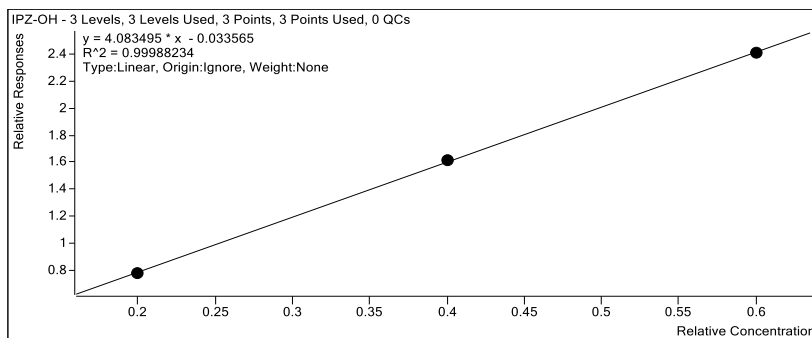
Çizelge 3.5: DMZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, MNZ-OH ve RNZ'ye ait kalibrasyon eğrileri, standart ve numune kromotogram analiz grafikleri.



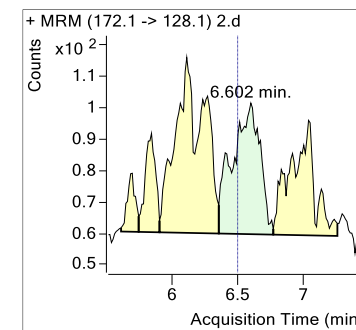
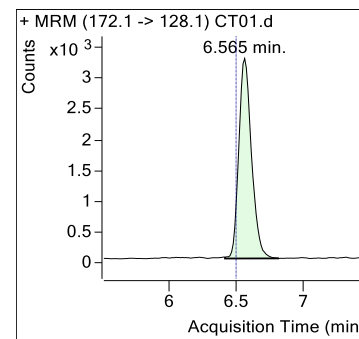
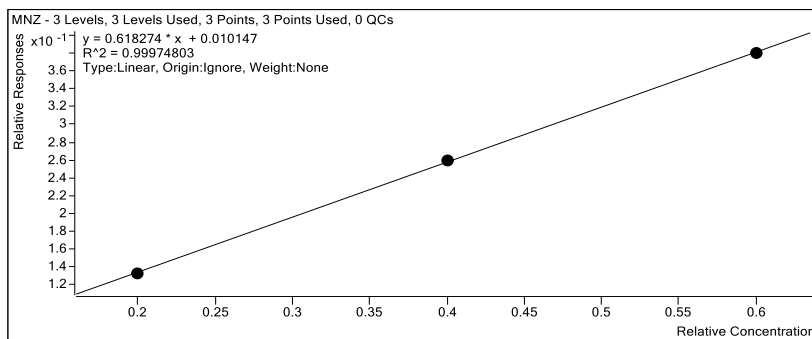
IPZ



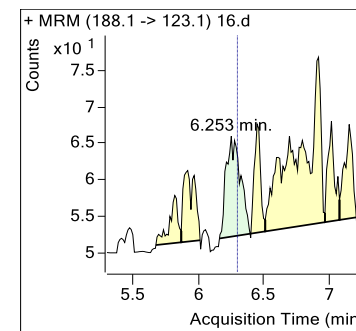
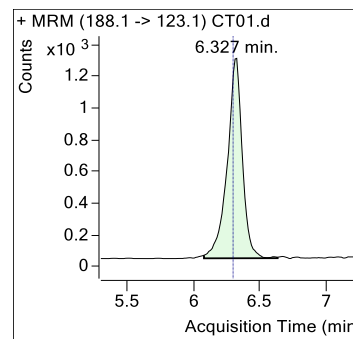
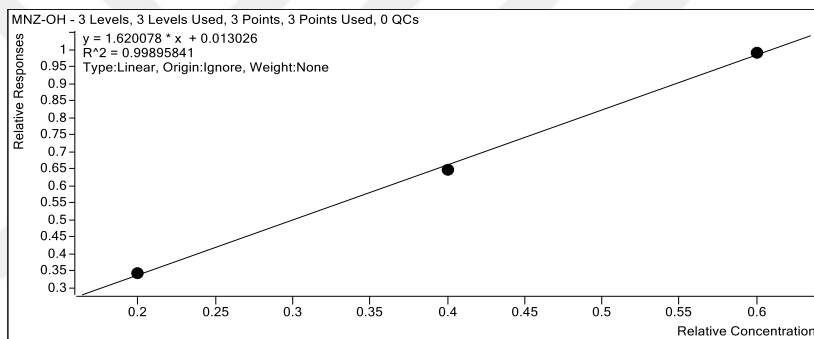
IPZ-OH



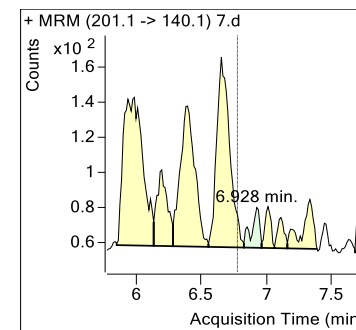
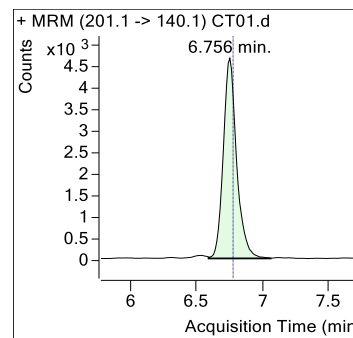
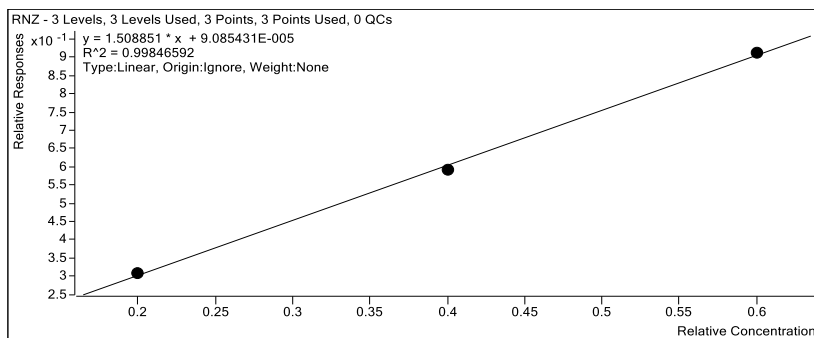
MNZ



MNZ-OH



RNZ



#### 4. TARTIŞMA

Avrupa Birliği, Amerika Birleşik Devleti ve Çin dahil diğer ülkelerde nitroimidazollerin olumsuz sağlık etkilerine ilişkin raporlara istinaden gıda üreten hayvanlar için kullanımı yasaklanmıştır (Mahugo-Santana vd., 2010). Buna karşın ihracat yapan birçok ülkede bu ilaçların yasa dışı kullanımına dair kanıtlar da tespit edilmiştir (FDA, 1994). Bu nedenle, ülkelere yasadışı kullanımı izlemek için nitroimidazol kalıntılarının düşük düzeyde tespitini yapabilen sağlam ve güvenilir tarama ve doğrulama testlerine sahip olma gerekliliği getirilmiştir. Nitroimidazoller için belirlenmiş bir minimum gerekli performans limiti (MRPL) veya eylem için referans noktasının bulunmaması durumunda, AB'nin Topluluk Referans Laboratuvarları, tüm topluluk laboratuvarlarının nitroimidazollerini tespit edebilmesi ve doğrulayabilmesi için önerilen konsantrasyonlara ilişkin kılavuzlar yayınlamıştır. Bu önerilen konsantrasyonlar yasal olarak zorunlu değildir, ancak bir analitik yöntemden beklenen minimum standardı tanımlamaya yarar. Nitroimidazoller için önerilen konsantrasyon, henüz önerilen konsantrasyonun tanımlanmadığı IPZ ve IPZ-OH dışındaki tüm matrislerde 3 µg/kg (veya µg/l) olarak belirlenmiştir (CRL, 2007).

Nitroimidazollerini analitik olarak belirlemeden önce örnekler için organik bir çözücü (Fraselle vd., 2007) ve ardından katı faz ekstraksiyonu içeren ekstraksiyon protokolleri kullanılır (Mohamed vd., 2008; Tripathi vd., 2023). Biyolojik ve gıda numunelerinde nitroimidazollerin tespiti için gaz kromatografisi kütle spektrometrisi (GC/MS) (Wang, 2001), ultraviyole tespitli sıvı kromatografisi (HPLC/UV) (Zhou vd., 2007), likit kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (LC/MS) (Mahugo-Santana vd., 2010; Melekhin vd., 2024) ve ultrayüksek performans likit kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (UHPLC-MS/MS) (Yu vd., 2023) gibi kromatografik cihazlar kullanılmaktadır. Son yapılan araştırmalarda, nitroimidazol analizi için bir türevlendirme adımının gerekli olduğu GC/MS cihazına göre daha avantajlı olan LC/MS yöntemlerine yönelik bir eğilimin olduğu gözlemlenmiştir (Polzer ve Gowik, 2001).

Yapılan çalışmada, nitroimidazol ve metabolitlerinin süt örneklerinde tespiti için LC/MS/MS cihazı kullanıldı. Öncelikle süt örneklerinden bileşiklerin eldesi için etilasetat



ve n-hekzan ile ön işlemler gerçekleştirildi ve son kısımda örneklerin asetonitril-su karışımı ile muamale edilmesi ile cihaza enjeksiyon işlemi yapıldı. Analitlerin ayrılmasında C18 kolon ve asetonitril ve suda formik asitli mobil faz işlemi yapıldı. Çalışmada, nitroimidazol bileşiklerinin geri kazanımlarının % 100,5 ile % 101,7 arasında olduğu, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 2,22-2,37 µg/l ve 2,66-3,12 µg/l, CCα ve CCβ değerlerinin de sırasıyla 2,21-2,34 µg/l ve 2,35-2,58 µg/l arasında olduğu tespit edildi. Çalışmada kullanılan yöntemin, tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği ile geri kazanımı, CCα ve CCβ değerleri açısından iyi bir performans gösterdiği ve tüm değerlerin 2002/675/EC sayılı Komisyon Kararında tanımlanan kabul edilebilir aralıklar içerisinde olduğu, ayrıca yöntemin AB tarafından belirlenen 3 µg/kg'lık gerekli performansı karşıladığı belirlendi. Bununla birlikte, çalışma kapsamında Ankara ilinden toplanan 60 adet çiğ inek süt örneği LC/MS/MS cihazı ile nitroimidazol kalıntı varlığı yönünden analiz edildi ve elde edilen veriler neticesinde örneklerin nitroimidazol kalıntısı içermediği belirlendi.

Benzer şekilde yapılan bir çalışmada; nitroimidazol ve bunların hidroksi metabolitlerinin belirlenmesi için geliştirilen bir yöntemde, süt numuneleri asetonitril ile ekstrakte edilmiş ve güçlü katyon değişimli katı faz ekstraksiyon kartuşlarında temizlenmiştir. Elde edilen ekstraktlar daha sonra % 0,1 formik asit içerisinde yeniden oluşturulmuş ve LC/MS/MS'ye enjekte edilmiştir. Analitlerin ayrılması işlemi bir C18 kolonu ve asetonitril içinde % 0,1 formik asit ve su içinde %0,1 formik asitten oluşan bir mobil faz kullanılarak gradyan modunda gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem AB Komisyonu Kararı 2002/657/EC'ye uygun olarak değerlendirilmiş ve tüm doğrulama kriterleri gerekli aralıklarda belirlenmiş olup önerilen konsantrasyon seviyesi olan 3 µg/kg'ın altındaki MNZ, DMZ, RNZ, IPZ ve bunların hidroksi metabolitlerini kolayca tespit edebilir ve doğrulayabilir nitelikte bulunmuştur. LOD ve LOQ limitleri sırasıyla 0,11 µg/kg ile 0,22 µg/kg ve 0,19 µg/kg ile 0,37 µg/kg arasında belirlenmiştir. Genel geri kazanımlar % 96,6 ile % 105,2 arasında ve laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik koşulları % 8,7'den az olarak tespit edilmiştir (Mitrowska vd., 2014).

Bir diğer çalışmada, büyükbaş hayvan sütündeki 23 veteriner ilacını ve metabolitini (nitroimidazoller, benzimidazoller ve kloramfenikol bileşenleri) tespit etmek için bir

UHPLC/MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. İlgili bileşikler, sodyum klorür kullanılarak asetonitril ve bazlaştırılmış asetonitril ile süttten sırayla ekstrakte edilerek, karışık modlu bir katı faz ekstraksiyon kartuşunda saflaştırılmıştır. Elektrosprey iyonizasyonunda hızlı polarite değişimi kullanılmış, tek bir enjeksiyon ve 9 dk'lık bir kromatografi çalışma süresinde hem pozitif hem de negatif yüklü analitleri tespit edebilmişlerdir. Süt için matris uyumlu kalibrasyonlara ve izotop etiketli dahili standartlara dayalı geri kazanımları % 51,7 ile % 101,8 arasında belirlemişlerdir. Analitik yöntemin LOD ve LOQ limitlerini sırasıyla 2-20 ng/kg ve 5-50 ng/kg aralığında bulmuşlardır. Araştırmacılar bu yöntemi sığır sütü örneklerinde nitroimidazoller, benzimidazoller ve kloramfenikol bileşenlerinin rutin olarak izlenmesi için basit, spesifik ve güvenilir bir yöntem olarak önermişlerdir (Wang vd., 2016).

Süt ve bal örneklerinde yapılan bir çalışmada ise on bir nitroimidazolün ve ayrıca kloramfenikolün analizine izin veren doğrulayıcı bir yöntem geliştirilmiştir. Süt numuneleri, NaCl ilavesiyle asetonitril ile ekstrakte edilmiş, bal numuneleri ekstraksiyondan önce ilk olarak suda çözündürülmüştür. Ayrıca, bal ekstraktlarından yabancı maddeleri uzaklaştırmak için hekzanla yıkama işlemi uygulanmıştır. Bunlar daha sonra LC/MS/MS sistemine enjekte edilmiş ve 9 dk'dan kısa bir sürede analiz işlemi uygulanmıştır. MS/MS, pozitif ve negatif elektrosprey iyonizasyonuyla çoklu reaksiyon izleme modunda çalıştırılmıştır. Nitroimidazoller için CC $\alpha$  ve CC $\beta$ 'nin sütte sırasıyla 0,41 ile 1,55  $\mu$ g/l ve 0,70 ile 2,64  $\mu$ g/l arasında değiştiği, balda ise sırasıyla 0,38 ile 1,16  $\mu$ g/kg ve 0,66 ile 1,98  $\mu$ g/kg arasında olduğu belirtilmiştir. Kloramfenikol için değerlerin sütte 0,07 ve 0,11  $\mu$ g/l, balda ise 0,08 ve 0,13  $\mu$ g/kg olduğu tespit edilmiştir. Doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik doğrulama kriterlerinin yanı sıra ölçüm belirsizliği de her iki matristeki tüm analitler için hesaplanmıştır. Sonuçta kullanılan yöntemin hem bal için hem de sütlerde bu bileşiklerin tespitinin belirlenmesinde kullanılabileceği vurgulanmıştır (Cronly vd., 2010).

Avermektinlerin, benzimidazollerin ve nitroimidazollerin varlığını UHPLC/MS/MS ile belirlemek için niceliksel ve doğrulayıcı bir kalıntı yöntemi sığır kas dokusunda bir QuEChERS ekstraksiyonu kullanılarak geliştirilmiştir. Çalışmada yöntemin doğrusal çalışma aralığı 50 ile 200  $\mu$ g/kg olarak tanımlanan klosantel hariç, çalışılan analitler için

MRL veya MRPL 0,5 ile 2,0 katı çalışma aralığında 0,90'dan yüksek belirleme katsayısı ( $R^2$ ) ile doğrusallık sergilediği belirlenmiştir. Yöntem, çalışılan tüm analitler için makrolidler ve linkozamidlerin varlığında seçici olmuştur. LOD değerleri 0,007 ile 66,715 µg/kg arasında değişirken, LOQ değerleri 0,011 ile 113,674 µg/kg arasında bulunmuştur. Çalışmada elde edilen performans parametrelerinin sığır kas dokularında avermektinler, benzimidazoller ve nitroimidazol kalıntılarının tespiti ve miktar tayini için toplam yöntem yeterliliğini gösterdiği belirtilmiştir (da Silva vd., 2017).

Nitroimidazollerin domuz eti kas dokusu örneklerinde belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, HPLC-MS/MS cihazı ile DMZ, RNZ, IPZ, IPZOH, MNZ ve HMMNI kalıntı miktarları araştırılmıştır. Çalışmada suda formik asit ve metanolden oluşan mobil faz kullanılmış olup, analiz sonucunda nitroimidazoller için doğrusallığın >0,999 olduğu belirtilmiştir. Yöntemde geri kazanımların % 63-101,7 arasında olduğu, tüm zenginleştirme seviyelerinde nitroimidazol ekstraksiyonunun % 15'in altında doğruluk koşullarında olduğu ve sonuçta doğru ve hassas bu yöntemin nitroimidazol bileşiklerin belirlenmesi için kullanılabileceği vurgulanmıştır (Prosekov vd., 2020).

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Nitroimidazoller memeliler için kanserojenik ve teratojenik olduğundan A6 (yasaklı) maddeler grubuna dahil edilmektedir ve bunların AB’de gıda üreten hayvanlarda kullanımına 2377/90 sayılı Yönetmelik uyarınca izin verilmemektedir. Ülkemizde ise bu maddelerin kalıntısının gıda değeri taşıyan hayvanlardan elde edilen ürünlerinde bulunmasına izin verilmemektedir. Bu bileşiklerin analizi AB direktiflerine bağlı olarak 96/23/EC sayılı karar uyarınca gereklidir. Nitroimidazollerin kullanımına ilişkin denetimler sürekli olarak güçlendirilse de nitroimidazollerin yasa dışı kullanımı yaşanabilir ve sağlık açısından ciddi tehlike yaratabilir. Bu nedenle, nitroimidazollerin yasadışı kullanımını engellemek amacıyla eser kalıntılarının belirlenmesine yönelik doğru ve hassas analizlerin düzenli olarak yapılmasına ihtiyaç vardır.

Yapılan incelemeler neticesinde, sütlerde nitroimidazollerin kromatografik cihazlarla belirlenmesine yönelik temel araştırmaların olduğu görülmektedir. Ayrıca, ulusal kalıntı izleme programında bulunan bu maddelerin sahadaki durumunu gösteren makale ya da araştırmalara da rastlanılmamıştır. Yapılan bu çalışmada sütlerde nitroimidazol kalıntısının belirlenmesine yönelik LC/MS/MS cihazı ile ilişkilendirilen valide bir metot ile Ankara ilinde tüketime sunulan 60 adet süt numunesinde nitroimidazol bileşiklerinin varlığına ilişkin analizler gerçekleştirildi ve hiçbir örnekte nitroimidazol varlığı tespit edilmedi. Bu durum tüketime sunulan sütlerin tüketici sağlığı açısından bir risk oluşturmadığını göstermiştir.

Sonuç olarak, her ne kadar yasaklı madde olsalar da nitroimidazoller ile kontaminasyonu önlemek için hayvan yemi ve/veya sütlerde bunların varlığının düzenli olarak izlenmesi gerekir. Ayrıca, üreticiler ve ilgili kuruluşlar nitroimidazollerin neden olduğu sağlık sorunlarına da dikkat etmelidir. Bu hedefe ulaşmak için rutin analizlerde düşük tespit limitlerine sahip hassas yöntemlerin kullanılması ve bu yöntemlerin sürekli geliştirilmesinin gerekliliği bulunmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Aarestrup, F. (2012). Sustainable farming: get pigs off antibiotics. *Nature*, 486(7404): 465-6.
- Arikan, O.A. (2008). The fate of chlortetracycline during the anaerobic digestion of manure from medicated calves. *J Hazard Mater*, 158 (2-3): 485-90.
- Bateman, H., Sargeant, H., McAdam, K. (2006). Dictionary of Food Science and Nutrition, London: A&C Black.
- Bates, C.J., Prentice A. (1996). Vitamins, minerals and essential trace elements. In: Drugs and Human Lactation, Ed: Bennett, P., 2nd Edition, Elsevier Science BV. p: 533-607.
- Cashman, K.D. (2006). Milk minerals (including trace elements) and bone health. *Int Dairy J*. 16 (11): 1389-1398
- Cavaliere, A., Bacci, M., Amorosi, A., Del Gaudio, M., Vitali, R. (1983). Induction of lung tumors and lymphomas in BALB/c mice by metronidazole. *Tumori Journal*, 69(5): 379-382.
- Cavaliere, A., Bacci, M., Vitali, R. (1984). Induction of mammary tumors with metronidazole in female Sprague-Dawley rats. *Tumori Journal*, 70(4): 307-311.
- Chandan, R.C. (2008). Dairy processing and quality assurance: An overview, in: Dairy Processing and Quality Assurance, Eds: Chandan, R.C., Kilara, A., and Shah, N.P., Wiley-Blackwell, pp: 1-40.
- CRL (2007). CRL Guidance Paper-CRLs view on state of the art analytical methods for the national residue plans for control of residues, available from the EU CRLs for veterinary drug residue analysis. Erişim: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/digitaaldepot/crlguidance2007.pdf> Erişim tarihi: 06.06.2024.
- Cronly, M., Behan, P., Foley, B., Malone, E., Martin, S., Doyle, M., Regan, L. (2010). Rapid multi-class multi-residue method for the confirmation of chloramphenicol and eleven nitroimidazoles in milk and honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS). *Food Addit Contam*, 27(9): 1233-1246.
- da Silva, G.R., Lima, J.A., de Souza, L.F., Santos, F.A., Lana, M.A.G., de Assis, D.C.S., de Vasconcelos Cançado, S. (2017). Multiresidue method for identification and quantification of avermectins, benzimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a QuEChERS approach. *Talanta*, 171: 307-320.
- Edwards, D.I. (1993). Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. *J Antimicrob Chemother*, 31(1): 9-20.
- Ehlhardt, W.J., Beaulieu Jr, B.B., Goldman, P. (1988). Mammalian cell toxicity and bacterial mutagenicity of nitrosoimidazoles. *Biochem Pharmacol*, 37(13): 2603-2606.

- FDA (1994). Animal Medicinal Drug Use Clarification Act of 1994 (AMDUCA). Erişim: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/guidance-regulations/animal-medicinal-drug-use-clarification-act-1994-amduca> Erişim Tarihi:06.06.2024.
- Fraselle, S., Derop, V., Degroodt, J.M., Van Loco, J. (2007). Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and the corresponding hydroxy metabolites in pig plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 586(1-2), 383-393.
- Getahun, M., Abebe, R.B., Sendekie, A.K., Woldeyohanis, A.E., Kasahun, A.E. (2023). Evaluation of antibiotics residues in milk and meat using different analytical methods. *Int J Anal Chem*, 2023(1), 4380261.
- Kayaalp, S. O. (2012). Nitroimidazol’lar. İçinde: Akılcı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Editör: Kayaalp, S. O. s: 247 Pelikan Yayıncılık.
- Kebede, G., Zenebe, T., Disassa, H., Tolosa, T. (2014). Review on detection of antimicrobial residues in raw bulk milk in dairy farms. *Afr J Basic Appl Sci*, 6(4): 87–97.
- Komorowski, E.S., Early, R. (1992). Liquid milk and cream, In: The technology of dairy products, Early R (Chief ed), VCH Publishers, Inc., New York
- Kümmerer, H.T.K. (2001). Pharmaceuticals in the environment-sources, fate, effects and risks. *Aquat Toxicol*, 71: 391–2.
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L. (2001). in: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Ed: H.R. Adams, Iowa State Press, Ames, IA, p: 992-1016.
- Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Torres-Padrón, M.E., Santana-Rodríguez, J.J. (2010). Analytical methodologies for the determination of nitroimidazole residues in biological and environmental liquid samples: a review. *Anal Chim Acta*, 665(2): 113-122.
- Melekhin, A.O., Tolmacheva, V.V., Goncharov, N.O., Apyari, V.V., Parfenov, M.Y., Bulkatov, D.P., Dmitrienko, S.G., Zolotov, Y.A. (2024). Rapid multi-residue LC-MS/MS determination of nitrofuran metabolites, nitroimidazoles, amphenicols, and quinolones in honey with ultrasonic-assisted derivatization - magnetic solid-phase extraction. *J Pharm Biomed Anal*, 237, 115764.
- Mital, A. (2009). Synthetic nitroimidazoles: biological activities and mutagenicity relationships. *Sci Pharm*, 77(3), 497-520.
- Mitrowska, K., Antczak, M., Posyniak, A. (2014). Confirmatory method for the determination of nitroimidazoles in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Vet Res*, 58(4): 581-587.
- Mohamed, R., Mottier, P., Treguier, L., Richoz-Payot, J., Yilmaz, E., Tabet, J.C., Guy, P.A. (2008). Use of molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the determination of four 5-nitroimidazoles and three of their metabolites from egg-based samples before tandem lc– esims/ms analysis. *J Agr Food Chem*, 56(10): 3500-3508.

- Musallam, H.M., Almozogai, H.M., Amkabis, S. S., Aoag, M.A., Hassan, T.M., Elhefian, E.A., Asseid, F.M. (2017). Physicochemical Characteristics of Various Milk Samples. *NJMBS*, 6(2): 1-3.
- Na lampang, K., Chongsuvivatwong, V., Kitikoon, V. (2007). Pattern and determinant of antibiotics used on dairy farms in Songkhla province, Southern Thailand. *Trop Anim Health Prod*, 39(5): 355-61.
- Nisha, A.R. (2008). Antibiotic residues-a global health hazard. *Vet World*, 1(12): 375-7.
- Pandya, A.J., Ghodke, K.M., (2007). Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Rum Res*, 68: 193-206,
- Park, Y.W., Chukwu, H.I. (1988). Macro-mineral concentrations in milk of two goat breeds at different stages of lactation. *Small Rum Res*, 1: 157-166.
- Polzer, J., Gowik, P. (2001). Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and corresponding hydroxy metabolites in turkey and swine muscle by means of gas chromatography–negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 761(1): 47-60.
- Prosekov, A., Podlegaeva, T., Chaplygina, O., Kozlova, O., Tulaeva, A. (2020). Control of animal products contamination with nitroimidazole group antibiotics. In: E3S Web of Conferences (Vol. 222, p. 06019). EDP Sciences.
- Rabea, D., Ryad, L., Shehata, M.R., Khalaf-Alla, P.A. (2024). Determination of 7 nitroimidazoles compounds in meat and natural casing using modified QuEChERS combined with HPLC Orbitrap MS: impact of meat processing approaches on the analytes residue. *Int. J. Environ. Anal. Chem*, 1-16.
- RG, 2017. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. Erişim: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/03/20170307-4.htm> Erişim tarihi: 29.05.2024.
- Roe, F.J. (1983). Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. *Surgery*, 93(1): 158-164.
- Rossi, R., Saluti, G., Moretti, S., Diamanti, I., Giusepponi, D., Galarini, R. (2018). Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry: a review. Food additives and contaminants. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 35(2): 242-57.
- Rustia, M., Shubik, P. (1979). Experimental induction of hepatomas, mammary tumors, and other tumors with metronidazole in noninbred Sas: MRC (WI) BR rats. *J Natl Cancer Inst*, 63(3): 863-868.
- Sachi, S., Ferdous, J., Sikder, M. H., Hussani, S. A. K. (2019). Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *J Adv Vet Anim Res*, 6(3): 315.

- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5):725–59.
- Topal, M., Şenel, G. U., Topal, E. I. A., Öbek, E. (2015). Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniversitesi FBE Dergisi*, 31(3): 121-127.
- Tripathi, A., Suriyamoorthy, P., Rawson, A. (2023). Nitrofuran residues in animal sourced food: Sample extraction and identification methods–A review. *Food Chem Adv*, 100396.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112(18): 5649-54.
- Ventola, C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 40: 277-83.
- Voogd, C. E. (1981). On the mutagenicity of nitroimidazoles. *Mutat Res*. 86(3): 243-77.
- Wang, J. H. (2001). Determination of three nitroimidazole residues in poultry meat by gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection. *J Chromatog A*, 918(2): 435-438.
- Wang, Y., Li, X., Zhang, Z., Ding, S., Jiang, H., Li, J., Shen, J., Xia, X. (2016). Simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles, and chloramphenicol components in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 192: 280-287.
- Yalap, K.S., Balcıoğlu, I.A. (2008). Oksitetrasiklinin ileri oksidasyon ile arıtımına su bileşenlerinin etkisi. *İTÜ Dergisi Su Kirlenme Kontrolü*, 18: 51-60.
- Yu, W., Jia, J., Shi, J., Shi, H., Yang, L. (2023). Magnetic solid-phase extraction based on GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> coupled with UPLC-MS/MS for determining nitroimidazoles and their metabolites in honey. *Talanta*, 254, 124181.
- Zhang, H., Ren, Y., Bao, X. (2009). Simultaneous determination of (fluoro) quinolones antibacterials residues in bovine milk using ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 49(2): 367-74.
- Zhou, J., Shen, J., Xue, X., Zhao, J., Li, Y., Zhang, J., Zhang, S. (2007). Simultaneous determination of nitroimidazole residues in honey samples by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J AOAC int*, 90(3): 872-878.