

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ULTRA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ-YÜKSEK
ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (UHPLC-HR/MS) İLE
BEBEK GIDALARINDA SÜLFONAMİD GRUBU ANTİBİYOTİK
KALINTILARININ VE METABOLİTLERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN
ANALİZ METODU GELİŞTİRİLMESİ**

Ülgen İlknur KONAK

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ULTRA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ-YÜKSEK
ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (UHPLC-HR/MS) İLE
BEBEK GIDALARINDA SÜLFONAMİD GRUBU ANTİBİYOTİK
KALINTILARININ VE METABOLİTLERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN
ANALİZ METODU GELİŞTİRİLMESİ**

Ülgen İlknur KONAK

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 2014.01.0102.010 proje numarasıyla desteklenmiştir.**

2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ULTRA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ-YÜKSEK
ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (UHPLC-HR/MS) İLE BEBEK
GIDALARINDA SÜLFONAMİD GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ VE
METABOLİTLERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN ANALİZ METODU
GELİŞTİRİLMESİ**

Ülgen İlknur KONAK

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez **07/09/2016** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muharrem CERTEL
Doç. Dr. Yahya TÜLEK
Doç. Dr. Hülya GÜL
Yrd. Doç. Dr. Bülent ŞIK
Yrd. Doç. Dr. Edip BAYRAM



ÖZET

ULTRA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ-YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (UHPLC-HR/MS) İLE BEBEK GIDALARINDA SÜLFONAMİD GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ VE METABOLİTLERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN ANALİZ METODU GELİŞTİRİLMESİ

Ülgen İlknur KONAK

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Eylül 2016, 206 Sayfa

Bu çalışmada, bebek gıdalarında eser miktarda bulunabilecek 17 tane sülfonamid grubu antibiyotik kalıntılarının ve metabolitlerinin ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresinde (UHPLC-HR/MS) analizi için yeni bir metot geliştirilmiştir. Analitler, ASE sistemi ve QuEChERS ekstraksiyonu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Geliştirilen analiz yönteminin güvenilirliğini test etmek amacıyla metot validasyonu yapılmıştır.

ASE sisteminde en yüksek verimi elde etmek için çözgen bileşimi, sıcaklığı, yıkama hacmi, döngü sayısı ve statik süresi parametreleri optimize edilmiştir. QuEChERS ekstraksiyonu AOAC'nin standart yöntemine göre yapılmıştır. Sıvı kromatografisi kısmında hareketli fazın bileşimi, akış hızı, kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi parametreleri açısından en uygun koşullar belirlenmiştir. Kütle spektrometresinde ise analitlerin yüksek seçicilikte ve hassasiyette tespit edilebilmesi için sheath ve auxiliary gazlarının akış hızları, kapiler ve heater sıcaklıkları ve sprey voltajı parametreleri optimize edilmiştir. Metot validasyonunda doğruluk ve ölçüm aralığı, seçicilik, tespit limiti, tayin limiti, doğruluk ve kesinlik parametreleri belirlenmiştir.

Araştırma sonucunda, QuEChERS ekstraksiyonu ile kıyaslandığında analitlerin geri kazanım oranlarının ASE sisteminde daha yüksek olduğu ve ASE'nin tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik açısından daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Metot validasyonu sonucunda elde edilen veriler, analiz yönteminin eser miktarda analitlerin yüksek seçicilik, doğruluk ve kesinlikte analizi için uygun olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Orbitrap-Exactive, bebek gıdaları, sülfonamid, ASE, QuEChERS, validasyon

JÜRİ: Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Danışman)

Doç. Dr. Yahya TÜLEK

Doç. Dr. Hülya GÜL

Yrd. Doç. Dr. Bülent ŞIK

Yrd. Doç. Dr. Edip BAYRAM

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AN ANALYSIS METHOD FOR DETERMINATION OF RESIDUES AND METABOLITES OF SULFONAMIDES IN BABY FOODS BY ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO HIGH-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

Ülgen İlknur KONAK

**PhD Thesis in Food Engineering
Supervisor: Prof. Dr. Muharrem CERTEL
September 2016, 206 Pages**

In this study, a new method was developed for the analysis of the residues and their metabolites of 17 sulfonamides in baby foods by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. All analytes were extracted using ASE and QuEChERS extraction. The developed method was validated to test the reliability of the analyses.

Solvent composition, temperature, flush volume, number of cycles and static time were optimized in ASE to obtain the highest yield. QuEChERS extraction was performed according to standard method of AOAC. The optimum conditions were determined in terms of composition of the mobile phase, flow rate, column temperature and injection volume in liquid chromatography. Sheat and auxiliary gas flow rates, capillary and heater temperatures and spray voltage were optimized to detect the analytes in high selectivity and sensitivity in mass spectrometry. Linearity, dynamic range, selectivity, limit of detection, limit of quantification, accuracy and precision were determined in method validation.

As a result, compared with QuEChERS extraction, recovery rates for all analytes were higher in ASE system and the optimized ASE procedure provided better repeatability and reproducibility values. The results obtained with method validation showed that this method was suitable for determination of trace amount of the analytes with high selectivity, accuracy and precision.

KEYWORDS: Orbitrap-Exactive, baby foods, sulfonamide, ASE, QuEChERS, validation

COMMITTEE: Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Supervisor)
Assoc. Prof. Dr. Yahya TÜLEK
Assoc. Prof. Dr. Hülya GÜL
Asst. Prof. Dr. Bülent ŞIK
Asst. Prof. Dr. Edip BAYRAM

ÖNSÖZ

Gıda güvenliği, tüketicilere sunulan gıdaların fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan içerdiği tehlikelerin azaltılması veya önlenmesi için alınan tedbirlerin bütünü ifade etmektedir. Gıda kaynaklı tehlikelerin önlenmesi, ham maddeden başlayarak gıda tüketimine kadar devam eden gıda zincirindeki her bir aşamanın kontrol edilerek uygun tedbirlerin alınması ile sağlanmaktadır. Günümüzde gıda maddelerinin daha güvenli bir şekilde tüketilebilmesi için gerekli uygulamaların yapılmasına rağmen tüketicilerin gıda kaynaklı hastalıklara maruz kaldığı görülmektedir. Kimyasal tehlikeler, gıda güvenliği kapsamında tüketici sağlığını olumsuz yönde etkileyen etkenlerden bir tanesidir. Antibiyotik kalıntıları, bu grup tehlikelerin içerisinde yer alan hayvansal gıda kaynaklı kimyasallardır. Gıdalarda antibiyotik kalıntıları hayvanlara uygulanan antibakteriyel tedavilerin aşırı veya yanlış uygulanması sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan ilaçların önceliği hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesi olmalıdır. Antibiyotikler, bu kullanım amacının yanı sıra hayvanların besi verimliliğinin artırılması ve canlı ağırlık artışının sağlanması için de uygulanmaktadır. Veteriner hekimlikte kullanılan antibiyotiklerin bilinçli ve güvenli kullanımı çok önemlidir; çünkü antibiyotiklerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı sonucunda et, süt, yumurta ve bal gibi hayvansal gıdalarda ilaç kalıntılarının rastlanılmaktadır. Bu durum insan sağlığı yanında ülke ekonomisini de olumsuz yönde etkilemektedir. Antibiyotiklerin aşırı ve uygun olmayan şekilde kullanılması sonucunda hayvansal gıdalarda oluşacak kalıntıların tespit edilmesi gıda güvenliğini ve buna bağlı olarak insan sağlığını korumak amacıyla üzerinde durulması gereken çok önemli bir konudur. Bu yüzden gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntılarının kontrolü ve tespiti için güvenilir analitik metotlara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada, hayvan kaynaklı gıdalarda özellikle eser miktarda bulunan kalıntıları yüksek doğrulukta ve kesinlikte tespit edecek uygun analiz yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bebeklerin ve çocukların antibiyotik kalıntısına maruz kalması sonucunda etkilenme oranı yetişkinlere göre daha yüksek olduğu için, bu grup tüketicilerin tükettiği hayvan kaynaklı bebek gıdalarında bulunabilecek kalıntıların analizi üzerinde durulmuştur. Çalışmamızda veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan sülfonamid grubu antibiyotiklerin ve metabolitlerinin yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile analizi gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlama aşaması, analitik yöntemin istenilen amaca uygun olarak başarılı bir şekilde uygulanması açısından önemlidir. Bu amaçla, çalışmamızda ilgili analitlerin gıda matriksinden yüksek verimde ekstrakte edilmesi amacıyla hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonu (ASE) ve QuEChERS ekstraksiyonu kullanılmıştır.

Tez çalışmam sırasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muharrem CERTEL'e, çalışmam sırasında görüş ve önerileri ile bana yol gösteren tez izleme komitesi üyeleri Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent ŞİK'a (Akdeniz Üniversitesi Turizm Fakültesi) ve Yrd. Doç. Dr. Edip BAYRAM'a (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi), Orbitrap kütle spektrometresinde yaptığım analizlerde değerli görüşleri ve teknik destekleri ile bana yardımcı olan Sayın Okan ONGAN'a (Okan Ongan Teknik) ve M. Onur SAĞLAM'a (RedoksLAB), ASE ve QuEChERS ekstraksiyon işlemleri sırasında bana destek olan Sayın Timur TONGUR'a (Gıda

Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi), ASE sistemi ile ilgili bilgilerini benimle paylaşan Sayın İ. Burak ÇAM'a (Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi), tez çalışmam sırasında manevi destekleri ile yanımda olan değerli arkadaşlarım Sayın şükriye NİLÜFER'e (Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi) ve H. Aydan YATMAZ'a (Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi), bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Sayın Gizem YILDIZ'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakóltesi) ve Taner ERKAYMAZ'a (Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi), hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan canım aileme, araştırmamı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne ve cihazlarını kullanma imkanı sunan Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi Müdürü Sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	6
2.1. Sülfonamid Grubu Antibiyotikler	7
2.2. Ekstraksiyon	13
2.2.1. Sıvı-faz ekstraksiyon	15
2.2.1.1. QuEChERS.....	15
2.2.1.2. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu	16
2.3. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)	18
2.4. Kütle Spektrometresi.....	20
2.4.1. İyonizasyon kaynakları	21
2.4.2. Elektrosprey iyonizasyon	23
2.4.3. Analizörler.....	26
2.4.4. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HRMS)	28
2.4.4.1. Orbitrap analizörü.....	30
2.5. Metot Validasyonu	34
2.6. Gıdalarda Kütle Spektrometresi Kullanılarak Yapılan Sülfonamid Grubu Antibiyotik Kalıntı Analizi Çalışmaları.....	36
3. MATERYAL ve METOT	41
3.1. Materyal.....	41
3.2. Metot	42
3.2.1. Standart çözeltilerin hazırlanması	42
3.2.2. Ekstraksiyon yöntemleri.....	42
3.2.2.1. QuEChERS yöntemi.....	42
3.2.2.2. Hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonu	43
3.2.3. Ultra yüksek performans sıvı kromatografisi.....	44
3.2.4. Kütle spektrometresi	44
3.2.5. Metot validasyonu	45
3.2.5.1. Doğrusallık ve ölçüm aralığı	45
3.2.5.2. Seçicilik	45
3.2.5.3. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)	45
3.2.5.4. Doğruluk ve kesinlik	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1. UHPLC’de Metot Geliştirme	47
4.1.1. Akış hızını belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları.....	49
4.1.2. Kolon sıcaklığını belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları.....	57
4.1.3. Enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları.....	65
4.1.4. Hareketli faz B’de asetonitril (MeCN) veya metanol (MeOH) kullanılmasının analiz sonuçlarına etkisi.....	73

4.1.5. Hareketli faz A (0,1 mM oksalik asit/su, pH:3,89) sabit tutularak, hareketli faz B’de (metanol) farklı konsantrasyonda formik asit kullanılması analiz sonuçlarına etkisi.....	76
4.1.6. Hareketli faz B (%0,1 formik asit/metanol, pH:2,70) sabit tutularak, hareketli faz A’da (su) farklı konsantrasyonlarda oksalik, formik ve asetik asit kullanımının analiz sonuçlarına etkisi	77
4.1.6.1. Oksalik asit	77
4.1.6.2. Formik asit.....	77
4.1.6.3. Asetik asit	78
4.1.6.4. Hareketli faz A’da oksalik, formik ve asetik asit kullanımının sinyal seviyesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması.....	79
4.1.7. Hareketli faz B (%0,1 formik asit/metanol, pH:2,70) sabit tutularak hareketli faz A’da (su) farklı konsantrasyonlarda amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analiz sonuçlarına etkisi	87
4.1.7.1. Amonyum format	87
4.1.7.2. Amonyum asetat.....	88
4.1.8. Hareketli faz A (0,5 mM oksalik asit/su; pH:3,31) sabit tutularak B fazında (metanol) oksalik, formik ve asetik asit kullanımının analiz sonuçlarına etkisi	89
4.1.8.1. Oksalik asit	89
4.1.8.2. Formik asit.....	90
4.1.8.3. Asetik asit	91
4.1.8.4. Hareketli faz B’de oksalik, formik ve asetik asit kullanımının sinyal seviyesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması.....	92
4.1.9. Hareketli faz B (0,2 mM oksalik asit/su, pH: 2,46) sabit tutularak A fazında (0,5 mM oksalik asit/su) oksalik asit ile birlikte farklı konsantrasyonlarda amonyum format kullanımının analiz sonuçlarına etkisi	100
4.1.10. UHPLC’de oluşturulan analiz metodu	100
4.2. Orbitrap Exactive HESI Parametrelerinin Belirlenmesi	101
4.2.1. Kapiler ve heater sıcaklık değerleri.....	101
4.2.2. Sheath ve auxiliary gaz değerleri	103
4.2.3. Sprey voltaj değerleri	103
4.3. Hızlandırılmış Çözgen Ekstraksiyonu Yönteminin Geliştirilmesi.....	104
4.3.1. Ekstraksiyonda kullanılan çözgenin belirlenmesi	105
4.3.2. Ekstraksiyonda kullanılan çözgenin asit konsantrasyonunun belirlenmesi	106
4.3.3. Ekstraksiyon sıcaklığının belirlenmesi.....	107
4.3.4. Statik süresinin, yıkama hacminin ve döngü sayısının belirlenmesi.....	108
4.3.5. Temizleme aşaması	113
4.4. Metot Validasyonu	114
4.4.1. Doğrusallık ve ölçüm aralığı	114
4.4.2. Seçicilik.....	119
4.4.3. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)	136
4.4.4. Doğruluk ve kesinlik	137
5. SONUÇ	142
6. KAYNAKLAR	144
7. EKLER.....	159

Ek-1 Cihazın ayarlama işlemi yapılırken ekran görüntüsü.....	159
Ek-2 Bebek sütünde yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS).....	160
Ek-3 Ek gıdada yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS).....	164
Ek-4 Et içeren mamalarda yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS).....	168
Ek-5 Bebek sütünde yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE).....	172
Ek-6 Ek gıdada yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE).....	176
Ek-7 Et içeren mamalarda yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE).....	180
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Da	dalton
dk	dakika
eV	elektronvolt
g	gram
kg	kilogram
kV	kilovolt
mbar	milibar
mg	miligram
mL	mililitre
mM	milimolar
mm	milimetre
MPa	megapascal
ms	milisaniye
psi	pound/inçkare
s	saniye
V	volt
µL	mikrolitre
µm	mikrometre
%	yüzde
°C	derece selsiyus

Kısaltmalar

akb	Atomik kütle birimi
ADI	Kabul edilebilir günlük alım miktarı
AOAC	Resmi Analitik Kimyagerler Derneği
APCI	Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon
API	Atmosferik basınç iyonizasyon
ASE	Hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonu
CAS	Kimyasal Kuramlar Servisi
CI	Kimyasal iyonizasyon
CID	Çarpışma etkili ayrışma
dSPE	Dispersif katı faz ekstraksiyonu
EI	Elektron iyonizasyon
ESI	Elektrosprey iyonlaşma kaynağı
Eurachem	Avrupa Analitik Kimya Örgütü
FWHM	Pik yüksekliğinin yarısındaki pik genişliği
GC-MS	Gaz kromatografi-kütle spektrometresi
GMP	İyi Üretim Uygulamaları
HACCP	Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
ICR	İyon siklotron rezonans
INN	Uluslararası tescilli olmayan adı

ISO	Uluslararası Standardizasyon Komitesi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
MAE	Mikroalga destekli ekstraksiyon
MALDI	Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon
MRL	Maksimum kalıntı limiti
PLE	Basınçlı sıvı ekstraksiyonu
PSA	Primer sekonder amin
QqQ	Üçlü kuadropol
SFE	Süperkritik sıvı ekstraksiyonu
TOF	Uçuş zamanlı
UHPLC	Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
PSE	Başınçlı çözgen ekstraksiyonu
SSE	Subkritik çözgen ekstraksiyonu



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sülfonamidlerin kimyasal yapısı	8
Şekil 2.2. Sülfonamid'in asetilasyonu.....	9
Şekil 2.3. ASE 350 sistemi.....	17
Şekil 2.4. Kütle spektrometresinin genel kısımları	21
Şekil 2.5. ESI'de iyon oluşumu	25
Şekil 2.6. Ion Max yapısı	26
Şekil 2.7. Üçlü kuadrupol sistemi	28
Şekil 2.8. Orbitrap iyon hareket yönleri.....	31
Şekil 2.9. Orbitrap-Exactive.....	33
Şekil 4.1. N-asetilsülfadiazin için farklı akış hızlarına kromatogramlar	50
Şekil 4.2. N-asetilsülfamerazini için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	50
Şekil 4.3. N-asetilsülfametazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	51
Şekil 4.4. N-asetilsülfametoksazol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	51
Şekil 4.5. N-asetilsülfapiridin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	52
Şekil 4.6. Sülfakloropiridazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	52
Şekil 4.7. Sülfadiazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	53
Şekil 4.8. Sülfadimetoksin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	53
Şekil 4.9. Sülfamerazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	54
Şekil 4.10. Sülfametazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	54
Şekil 4.11. Sülfametoksazol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	55
Şekil 4.12. Sülfametoksipiridazin-Sülfamonometoksin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	55
Şekil 4.13. Sülfamoksol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	56
Şekil 4.14. Sülfapiridin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	56

Şekil 4.15. Sülfakinoksalin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	57
Şekil 4.16. Sülfatiazol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar	57
Şekil 4.17. N-asetilsülfadiazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	58
Şekil 4.18. N-asetilsülfamerazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	58
Şekil 4.19. N-asetilsülfametazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	59
Şekil 4.20. N-asetilsülfametoksazol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	59
Şekil 4.21. N-asetilsülfapiridin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	60
Şekil 4.22. Sülfakloropiridazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	60
Şekil 4.23. Sülfadiazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	61
Şekil 4.24. Sülfadimetoksin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	61
Şekil 4.25. Sülfamerazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	62
Şekil 4.26. Sülfametazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	62
Şekil 4.27. Sülfametoksazol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	63
Şekil 4.28. Sülfametoksipiridazin–Sülfamonometoksin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	63
Şekil 4.29. Sülfamoksol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	64
Şekil 4.30. Sülfapiridin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	64
Şekil 4.31. Sülfakinoksalin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar.....	65
Şekil 4.32. Sülfatiazol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar	65
Şekil 4.33. N-asetilsülfadiazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	66
Şekil 4.34. N-asetilsülfamerazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	66
Şekil 4.35. N-asetilsülfametazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	67
Şekil 4.36. N-asetilsülfametoksazol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	67
Şekil 4.37. N-asetilsülfapiridin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	68

Şekil 4.38. Sülfakloropiridazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	68
Şekil 4.39. Sülfadiazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	69
Şekil 4.40. Sülfadimetoksin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	69
Şekil 4.41. Sülfamerazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	70
Şekil 4.42. Sülfametazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	70
Şekil 4.43. Sülfametoksazol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	71
Şekil 4.44. Sülfametoksipiridazin–Sülfamonometoksin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	71
Şekil 4.45. Sülfamoksol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	72
Şekil 4.46. Sülfapiridin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	72
Şekil 4.47. Sülfakinoksalin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	73
Şekil 4.48. Sülfatiazol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar	73
Şekil 4.49. Sülfametoksipiridazin ve sülfamonometoksin'in iki hareketli faz (MeCN-MeOH) kullanılarak elde edilen kromatogramları	75
Şekil 4.50. Oksalik, formik ve asetik asidin n-asetilsülfadiazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	80
Şekil 4.51. Oksalik, formik ve asetik asidin n-asetilsülfamerazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	80
Şekil 4.52. Oksalik, formik ve asetik asidin n-asetilsülfametazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	81
Şekil 4.53. Oksalik, formik ve asetik asidin n-asetilsülfametoksazol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi	81
Şekil 4.54. Oksalik, formik ve asetik asidin n-asetilsülfapiridin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	82
Şekil 4.55. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfakloropiridazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	82
Şekil 4.56. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfadiazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	83

Şekil 4.57. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfadimetoksin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	83
Şekil 4.58. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfamerazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	84
Şekil 4.59. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	84
Şekil 4.60. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametoksazol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi	85
Şekil 4.61. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametoksipiridazin ve sülfamonometoksin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	85
Şekil 4.62. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfamoksol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi	86
Şekil 4.63. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfapiridin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	86
Şekil 4.64. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfakinoksalin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	87
Şekil 4.65. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfatiazol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi	87
Şekil 4.66. Oksalik, formik ve asetik asidin N-asetilsülfadiazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	92
Şekil 4.67. Oksalik, formik ve asetik asidin N-asetilsülfamerazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	92
Şekil 4.68. Oksalik, formik ve asetik asidin N-asetilsülfametazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	93
Şekil 4.69. Oksalik, formik ve asetik asidin N-asetilsülfametoksazol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi	93
Şekil 4.70. Oksalik, formik ve asetik asidin N-asetilsülfapiridin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	94
Şekil 4.71. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfakloropiridazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	94
Şekil 4.72. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfadiazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	95

Şekil 4.73. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfadimetoksin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	95
Şekil 4.74. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfamerazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	96
Şekil 4.75. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	96
Şekil 4.76. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametoksazol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi	97
Şekil 4.77. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametokspiridazin-sülfamonometoksin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi.....	97
Şekil 4.78. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfamoksol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi	98
Şekil 4.79. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfapiridin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	98
Şekil 4.80. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfakinoksalin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi	99
Şekil 4.81. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfatiazol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi	99
Şekil 4.82. Ekstraksiyonda asetonitril ve metanol karışımlarının kullanılması sonucunda elde edilen ekstraktların görünüşleri	106
Şekil 4.83. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen ekstraktların görünüşleri	108
Şekil 4.84. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) bebek sütü örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir)	119
Şekil 4.85. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) ek gıda örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir)	122
Şekil 4.86. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) et ürünleri içeren örneklere ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir).....	124
Şekil 4.87. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) bebek sütü örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)	127

Şekil 4.88. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) ek gıda örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)..... 130

Şekil 4.89. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) et ürünleri içeren örneklere ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir) 132



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sülfonamid grubu antibiyotiklerin uluslararası tescilli olmayan adı (INN), Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından belirtilen adı, Kimyasal Kuramlar Servisi (CAS) tarafından belirtilen kayıt numaraları, molekül formülü ve kimyasal yapısı.....	10
Çizelge 2.2. Sülfonamid metabolitlerinin uluslararası tescilli olmayan adı (INN), Kimyasal Kuramlar Servisi (CAS) tarafından belirtilen kayıt numaraları, molekül formülü ve kimyasal yapısı	13
Çizelge 2.3. Kolon tedarik firmaları	19
Çizelge 2.4. İyon optikleri ve analizördeki vakum değerleri	33
Çizelge 3.1. Standartların saflık derecesi ve depolama sıcaklığı	41
Çizelge 3.2. ASE parametreleri.....	43
Çizelge 3.3. Hareketli faz oranları	44
Çizelge 3.4. Kontrol panelindeki parametrelerin değerleri.....	45
Çizelge 4.1. Analitlerin MeCN ve MeOH'daki tespit zamanı ve sinyal seviyesi.....	74
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda formik asit ile hazırlanan hareketli fazın analitlerin sinyal seviyesine etkisi	76
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda oksalik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi	77
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda formik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi..	78
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda asetik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi ...	78
Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda amonyum format ilavesinin sinyal seviyesine etkisi	88
Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda amonyum asetat ilavesinin sinyal seviyesine etkisi.....	89
Çizelge 4.8. Farklı konsantrasyonlarda oksalik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi	90
Çizelge 4.9. Farklı konsantrasyonlarda formik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi..	90
Çizelge 4.10. Farklı konsantrasyonlarda asetik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi	91

Çizelge 4.11. Farklı konsantrasyonlarda amonyum format ilavesinin sinyal seviyesine etkisi	100
Çizelge 4.12. Kapiler ve heater sıcaklıklarının sinyal seviyesine etkisi	102
Çizelge 4.13. Sheath ve auxiliary gaz değerlerinin sinyal seviyesine etkisi.....	103
Çizelge 4.14. Sprey voltajının sinyal seviyesine etkisi	104
Çizelge 4.15. Çözgen bileşiminin ve karışım oranlarının sinyal seviyesine etkisi	106
Çizelge 4.16. Asit konsantrasyonunun sinyal seviyesine etkisi.....	107
Çizelge 4.17. Ekstraksiyon sıcaklığının sinyal seviyesine etkisi	108
Çizelge 4.18. Analitlerin sinyal seviyelerinin statik süresine (5 dk), yıkama hacmine ve döngü sayısına bağlı olarak değişimi.....	109
Çizelge 4.19. Analitlerin sinyal seviyelerinin statik süresine (10 dk), yıkama hacmine ve döngü sayısına bağlı olarak değişimi.....	109
Çizelge 4.20. Analitlerin sinyal seviyelerinin statik süresine (15 dk), yıkama hacmine ve döngü sayısına bağlı olarak değişimi.....	110
Çizelge 4.21. Statik süresinin, yıkama hacminin ve döngü sayısının sinyal seviyesine etkisi.....	110
Çizelge 4.22. Bebek sütünde ASE sistemi ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri.....	116
Çizelge 4.23. Bebek sütünde QuEChERS ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri.....	116
Çizelge 4.24. Ek gıdada ASE sistemi ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri.....	117
Çizelge 4.25. Ek gıdada QuEChERS ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri.....	117
Çizelge 4.26. Et ürünleri içeren mamaların ASE sistemi ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri	118

Çizelge 4.27. Et ürünleri içeren mamaların QuEChERS ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri	118
Çizelge 4.28. Analitlere ait kütle doğruluğu (ppm) değerleri.....	135
Çizelge 4.29. Analitlere ait LOD ($\mu\text{g/kg}$) ve LOQ değerleri ($\mu\text{g/kg}$).....	136
Çizelge 4.30. Ek gıda ile yapılan analizlere ait geri kazanım oranları, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri.....	139
Çizelge 4.31. Bebek sütü ile yapılan analizlere ait geri kazanım oranları, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri.....	140
Çizelge 4.32. Et içeren mamalar ile yapılan analizlere ait geri kazanım oranları, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri.....	141

1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkması toplumları genel olarak sağlık, ekonomik ve sosyal açıdan etkilemektedir. Gıda güvenliği ve kalitesi, günümüz küresel pazarında tüketiciler, hükümetler ve de üreticiler tarafından giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu yüzden, gıda endüstrisinin bu ilgiyi karşılayabilecek şekilde üretim yapabilmesi gerekmektedir. Bu da güvenli gıda üretiminde ve tüketiminde belirli sistemlerin kullanılması ile mümkün olmaktadır. Bu sistemlerin başında İyi Üretim Uygulamaları (GMP) ve Kritik Kontrol Noktalarında Tehlike Analizi Uygulamaları (HACCP) gelmektedir. Bu uygulamaların temel prensibi, gıda kaynaklı tehlikelerin önlenmesi, azaltılması, kontrol edilmesi veya elimine edilmesidir (Malik vd 2010).

Gıda güvenliği, son yıllarda halk sağlığının korunması açısından birçok ülkede hükümetler tarafından yüksek öncelikli bir konu olarak dikkate alınmaktadır. Ayrıca tüketicilerin de bu konuya olan ilgileri ve duyarlılıkları gün geçtikçe artmaktadır. Bu yüzden, gıda güvenliği alanında bilim insanlarının ve mevzuatları oluşturan otoritelerin, gıda tüketiminde tüketicilerin karşılaştıracakları olası riskleri belirlemesi ve tanımlaması gerekmektedir. Bu işlemler de gıdalarda kimyasal kontaminantların analiz edilmesinde kullanılan analitik yöntemlerin giderek gelişmesi ile sağlanmaktadır. Veteriner ilaçları, pestisitler, kalıcı çevresel kimyasallar ve doğal toksinler gıdalarda bulunabilecek insan sağlığını tehdit eden başlıca kimyasallardır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve diğer uluslararası örgütler, hem insan hem de hayvan tıbbında antibakteriyel tedavilerin aşırı veya yanlış uygulanması sonucunda ortaya çıkan risklere dikkat çekmektedir. Bu açıdan gıdalarda eser miktarda bulunabilecek kalıntı ve kontaminantların belirlenmesi günümüzde giderek artan bir ilgi görmektedir (Sun vd 2012).

Antienfeksiyöz, antimikrobiyal veya kemoterapötik maddeler olarak da bilinen antibakteriyel ajanlar, hem sentetik hem de doğal bileşikler içermektedir. Doğal antibakteriyel ajan sınıfında yer alan antibiyotikler, küfler veya bakteriler tarafından üretilen ve düşük konsantrasyonda diğer mikroorganizmaları öldüren (bakterisid) veya onların gelişimini engelleyen (bakteriyostatik) düşük molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir. Doğal olarak mikroorganizmalar tarafından üretilen antibiyotikler; penisilin, tetrasiklin, makrolid, aminoglikozit ve amfenikol olmak üzere beş gruptan oluşmaktadır. Fakat, günümüzde antibiyotik ve antibakteriyel ajan terimleri eş anlamlı kullanıldığı için; antibiyotik terimi sülfonamid, kinolon, nitrofuran ve nitroimidazol gibi sentetik bileşikler de kapsamaktadır (Gentili vd 2005, Reeves 2012).

Antibiyotikler, en önemli biyoaktif ve kemoterapötik bileşik gruplarından biri olarak mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesi veya tedavisi amacıyla insan ve hayvan tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır (Di Corcia ve Nazzari 2002, Kümmerer 2009). Hayvanlara hastalıkları önlemek, tedavi etmek ve kontrol altında tutmak amacıyla düzenli olarak antibiyotik verilmektedir. Tedavi amacının yanı sıra bu bileşikler hayvanların besi verimliliğinin artırılması ve canlı ağırlık artışının sağlanması amacıyla da uygulanmaktadır (Greenless vd 2012). Veteriner hekimlikte kullanılan başlıca antibiyotikler şunlardır; β -laktam (penisilin ve sefalosporin), tetrasiklin, kloramfenikol, makrolid, linkozamid, spektinomisin, sülfonamid, nitrofuran, nitroimidazol, polimiksin, kinolon ve makrosiklik (ansamisin, glikopeptit ve aminoglikosid) (Cháfer-Pericás vd

2010). Günümüzde insan ve hayvan tıbbında birçok antibiyotik kullanılmasına rağmen bunlardan bazıları gıda üretiminde kullanılan hayvanlara verilmesi için onaylanmıştır.

Sülfonamid grubu antibiyotikler, 1940'lı yılların başından itibaren bakteriyostatik etkili sentetik antibakteriyel ilaçlar olarak insan ve hayvan tıbbında uygulanmaktadır (Baran vd 2011). Bu grup antibiyotikler, beyaz veya çok az sarımsı renkli ve kokusuz toz yapıya sahiptir ve bazıları acı tattadır (Dmitrienko vd 2014). Geniş spektrumlu etkiye sahip olan sülfonamid grubu antibiyotikler; kolay bulunabilmeleri, ucuz olmaları ve hastalıkların önlenmesinde ve tedavi edilmesinde oldukça etkili olmalarından dolayı hayvancılık sektöründe küresel ölçekte yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu grup antibiyotikler, insanlarda bakteriyel enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavi edilmesinde uygulanan ilk ilaçlardır (Gentili vd 2004, Tarbin vd 2012). Prontosil, 1930'ların başında Gerhard Domagk tarafından keşfedilen ilk sülfonamid yapısında olan antibiyotiğin ticari adıdır ve Gerhard Domagk, Prontosil'in kemoterapötik etkisini keşfinden dolayı 1939 yılında Nobel Tıp Ödülünü almıştır (Samanidou vd 2008, Reeves 2012).

Sülfonamid grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı vücutta metabolize edilirken değişim göstermekte ve metabolitleri açığa çıkmaktadır. Bu grup antibiyotiklerin temel metabolik iz yolu, yapısındaki benzen halkasında N⁴ konumunda yer alan amino grubunun asetilasyonudur. Bu dönüşüm öncelikle karaciğerde meydana gelmekle birlikte diğer dokularda da gerçekleşebilmektedir (García-Galán vd 2008, Abdallah vd 2014). Sülfonamidlerin metabolize olması, bu bileşiklerin antibakteriyel aktivitesini ve toksisitesini etkilemesi açısından önemli bir olgudur. Genel olarak, metabolitleri ana bileşiğe oranla daha düşük antibakteriyel aktivite değerine sahiptir. Ayrıca, bu grup antibiyotiklerin asetilasyonu sonucu oluşan metabolitler ana bileşiğe kıyasla suda kayda değer miktarda daha az çözünmektedir. Gıda üretiminde kullanılan hayvanlara antibiyotik uygulandığında bu hayvanların böbreklerinde çökerek biriken metabolitler renal toksite oluşturmaktadır ve ayrıca ana bileşiğe oranla plazma proteinine daha fazla bağlanmaları ilacın dışarıya atılım hızını da etkileyebilmektedir (Botsoglou ve Fletouris 2001a, Li vd 2013). N⁴-asetil metabolitlerin asidik ortamda stabil olmamaları ve deasetilasyon ile ana bileşiğe geri dönüşümleri analiz metotlarında büyük bir sorun teşkil edebilmektedir. Analitlerin matriksten ekstraksiyonu sırasında meydana gelebilecek dönüşümler analiz sonucunda metabolitlerin ana bileşik olarak değerlendirilmesine (yanlış pozitif sonuç) ve hesaplamalarda hata yapılmasına neden olabilmektedir. Bu yüzden N⁴-asetil metabolitlerin analiz sırasında tespit edilebilmelerinin yanı sıra ana bileşikten ayırt edilebilmeleri güvenilir bir analiz metodu için zorunludur (Grant vd 2003).

Vücuda alınan antibiyotikler, organizmada tam olarak metabolize olamadıklarından ve vücuttan atılamadıklarından dolayı antibiyotik kalıntıları tüketiciler için toksik olabilmekte, tüketicilerin organlarının çalışmasına olumsuz etkide bulunabilmekte ve bunun sonucu olarak da hastalıklara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Ayrıca, antibiyotikler insanlarda alerjik reaksiyonlara ve antibiyotiğe dirençli patojenlerin gelişmesine yol açabilmektedir (Di Corcia ve Nazzari 2002, Gentili vd 2005, Wang vd 2006). Gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntılarının insanlarda immunopatolojik ve otoimmün hastalıklara, kanserojen ve mutajen etkiye, nefropatiye, üreme bozukluklarına ve kemik iliği toksisitesine neden olduğu belirtilmektedir (Nisha

2008). Antibiyotik kalıntılarının insanlar üzerindeki olumsuz etkileri nüfusun en savunmasız risk grubunda yer alan 0-2 yaş arasındaki bebek ve çocuklarda daha önemlidir. Bu yüzden bebek ve çocuklar için gıda güvenliğine özel olarak önem verilmesi gerekmektedir. Çünkü bazı bebek ve çocuk gıdaları hayvan kaynaklı (et, tavuk, hindi) olduğu veya bal ve süt ürünü içerdiği için antibiyotik kalıntılarını içerebilmektedir. Bebeklerin ağırlık başına gıda tüketim oranı yetişkinlere göre daha yüksek olduğundan dolayı bebeklerin yetişkinlere kıyasla veteriner ilaç kalıntılarına maruz kalma riski daha fazladır (Herrera-Herrera vd 2011, Aguilera-Luiz vd 2012).

Son yıllarda gıda güvenliği açısından veteriner ilaç kalıntıları ile ilgili çeşitli sorunlar sık sık gündeme gelmektedir. Avrupa Birliği gıda güvenliğini sağlamak amacıyla hayvan kaynaklı gıdalardaki ilaç kalıntılarına yönelik maksimum kalıntı limitlerini (MRL) belirlemiştir. Bu değerler her bir ilacın kabul edilebilir günlük alım miktarı (ADI) ve maksimum gıda tüketimi dikkate alınarak hesaplanmaktadır. Avrupa Birliği'nde 470/2009/EC sayılı Konsey Tüzüğü ile ilaç kalıntı limitleri belirlenmiştir (Anonymous 2010a). Ayrıca veteriner ilaç kalıntılarının izlenmesi 2377/90/EC sayılı Konsey Direktifi ile düzenlenmiştir (Anonymous 2007). Avrupa ülkelerinde, Kanada'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yenilebilir hayvansal ürünlerde sülfonamidlerin MRL değeri 100 µg/kg; Japonya'da ise 20 µg/kg olarak kabul edilmiştir (Wang vd 2006). Ülkemizde ise hayvansal gıdalarda bulunabilecek farmakolojik aktif maddelerin sınıflandırılmasını ve maksimum kalıntı limitlerini içeren ve 470/2009/EC sayılı Avrupa Birliği Parlamentosu ve Konsey Tüzüğü'nün ilgili hükümleri ile 37/2010/EEC sayılı Komisyon Tüzüğüne paralel olarak hazırlanan yönetmelik mevcuttur (Anonim 2012). Yönetmeliklerde sülfonamid grubu antibiyotiklerin, gıda elde edilen tüm türlerin kas, yağ, karaciğer ve böbrek dokularında ve sığır, koyun ve keçi sütünde MRL değeri 100 µg/kg olarak belirlenmiştir. Ancak hem Avrupa Birliği'nde hem de ülkemizde bebek gıdalarında ilaç kalıntı limitlerini tanımlayan geçerli herhangi bir mevzuat ve yöntem bulunmamaktadır. Bu boşluktan dolayı bebek mamalarında antibiyotik kalıntı tolerans limiti sıfır olarak kabul edilmektedir.

Gıdalarda bulunan çeşitli mikro kontaminantların tespit edilmesi amacıyla öncelikli olarak doğruluk değeri yüksek ve sağlam (robust) analitik metotların geliştirilmesi önem arz etmektedir (Stolker ve Brinkman 2005). Düşük miktardaki parçalanma ürünlerinin ve ayrıca ham maddelerin veya ürünlerin analizi sırasında yardımcı maddelerden kaynaklanan girişimlerin (interference) tespiti oldukça zordur (Joshi 2002). Bu yüzden gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntılarının kontrolü için güvenilir bir analitik metoda ihtiyaç vardır. Gıdalardaki ve hayvan dokularındaki bu kalıntıların analizinde yaygın olarak biyolojik yöntemler (bioassay) kullanılmaktadır. Bu yöntemler genellikle bir antibiyotik grubunun üyeleri arasında analit bazında bir ayırım yapmamakta, tespit edilen 'toplam' kalıntı miktarının yarı-nicel bir şekilde belirlenmesini sağlamaktadır. Ancak basit ve düşük maliyetle olmalarından dolayı bu yöntemlerin kullanımı devam etmektedir. Bununla birlikte, analiz edilen örneklerin tolerans seviyesini aşan konsantrasyonda antibiyotik içerdiğini belirtmeden önce bileşikleri tek tek tanımlayacak sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) veya gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) gibi yeterli ölçüde seçici ve hassas aletsel yöntemlerle bu belirlemenin doğrulanması veya onaylanması gerekmektedir (Stolker ve Brinkman 2005). Sülfonamid grubu antibiyotiklerin kalıntı analizleri genel olarak kütle spektrometresine dayalı yöntemlerdir. GC-MS cihazında polar yapıda olan

ve uçucu yapıda olmayan bu bileşiklerin türevlendirme işleminin yapılması gerektiğinden dolayı antibiyotik kalıntı analizinde LC-MS cihazı kullanılmaktadır (Balizs ve Hewitt 2003).

Bir analizin en önemli basamağı olan numune hazırlama aşaması, analizde sonraki basamakları etkilediğinden dolayı analitlerin tanımlanmasında, onaylanmasında ve miktarının belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu aşama, çeşitli matrikslerden ilgili bileşiklerin izolasyonunu ve/veya ekstraksiyonunu içermektedir. Ayrıca analitleri ayırmak ve tespit etmek için daha uygun hale getirmektedir. Son yıllarda, farklı içerikteki matrikslerde bulunan tek sınıfa veya farklı sınıflara ait bileşiklerin eser düzeydeki miktarlarını belirlemek için hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonu, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, katı faz mikro ekstraksiyon ve QuEChERS gibi yeni ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir (Turner 2006, Stolker ve Danaher 2012). Genelde ekstraksiyon işleminden sonra örneklerin doğrudan cihazda okutulması, işlem sayısının azalmasını ve analiz süresinin kısılmasını sağlamasına rağmen; cihazın ölçüm performansını etkilemesi ve kirliliğe yol açması açısından sorun çıkarabilmektedir. Cihazda okuma yapılacak örnek içerisinde matriks bileşenlerinin konsantrasyonunun analitlerden daha fazla olması, analit iyonlarını baskılamasından dolayı analitlerin sinyal seviyesini olumsuz yönde etkilemekte ve tespit edilmelerinde güçlükler yol açmaktadır. Bu yüzden, ekstraksiyon aşamasından sonra örneğin ve analitlerin yapısına uygun bir temizleme (clean-up) işleminin yapılması analizin performansını olumlu yönde etkilemektedir (Balizs ve Hewitt 2003).

Ekstraksiyon ve temizleme aşamalarından sonra analitlerin tanımlanmasını sağlayacak güvenilir, yüksek verimli ve etkili analitik metotların uygulanması gerekmektedir. Kuadrupol kütle analizörünün (özellikle üçlü kuadrupol, QqQ) bulunduğu kütle spektrometresine bağlanan yüksek performanslı sıvı kromatografisi, çeşitli kimyasal kalıntıların nicel ve onaylı analizleri için yaygın olarak kullanılan bir analiz tekniğidir. Ancak, son yıllarda analiz süresi ve cihazın çözünürlüğü açısından kromatografik performansı artırıcı farklı uygulamalar geliştirilmektedir. Bu uygulamalardan ilki, analiz verimini artırmak ve analizin süresini kısaltmak amacıyla geleneksel yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) yerine ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (UHPLC) kullanılmasıdır. İkincisi ise, kütle analizörünün çözünürlüğünü artırarak doğru kütle ölçümlerinin yapılabilmesi için kuadrupol kütle analizörünün yerine yüksek çözünürlüklü kütle analizörlerinin (Orbitrap, TOF, vb) kullanılmasıdır (Guillarme vd 2010). Bir ölçümde kütle doğruluğu ölçüm yapılan cihazın özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Bu özelliklerin en başında, cihazın birbirine yakın m/z değerine sahip iki ayrı pikin iyi bir şekilde ayırmasını sağlayacak çözünürlüğe sahip olması gelmektedir. Aksi takdirde, cihaz iki ayrı kütle profilinin toplamını alarak, ölçülen değeri (bu profilin tepe noktasını) iki ayrı pikin tam kütle (exact mass) değerlerinin arasında bir değer olarak gösterecektir. Bu yüzden bir analitik cihazın, yüksek seçicilikte ve duyarlılıkta ölçüm yapabilmesi, bileşiği doğrulayabilmesi ve bulunan analitin miktarını doğru bir şekilde verebilmesi gibi gereksinimlere sahip olması gerekmektedir (Kellman vd 2009).

Bu çalışmada, daha önce yapılmış çalışmalardan farklı olarak hayvansal ürün (et, süt, bal) içeren bebek gıdalarında eser miktarda bulunabilecek sülfonamid grubu

antibiyotik kalıntılarının ve metabolitlerinin yüksek bir doğruluk ve kesinlik ile belirlenmesini sağlayacak bir analiz metodunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Farklı matriklerdeki bebek gıdalarından antibiyotik kalıntılarının ve metabolitlerinin izole edilmesi amacıyla karşılaştırmalı olarak sıvı faz ekstraksiyon yöntemleri (ASE ve QuEChERS) kullanılmıştır. En uygun ekstraksiyon koşulu belirlendikten sonra antibiyotik kalıntılarının karakterize edilmesi amacıyla elektrosprey iyonlaşma kaynağına (ESI) sahip, hassas ölçüm yapan ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresinden (UHPLC-Orbitrap Exactive) yararlanılmıştır.



2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

Besinlerle alınan doğal bileşikler dışında kalan ve insan vücuduna çeşitli yollar ile dışarıdan giren her türlü yabancı maddeye toksikolojide ksenobiyotik denilmektedir. Yunanca kökenli ksenos (vücuda yabancı) kelimesinden gelen bu terim, organik ve inorganik birçok maddeyi kapsamaktadır. İlaçlar (antibiyotikler), besin katkı maddeleri, pestisitler, havayı ve suyu kirleten atıklar, tarım ve endüstri kaynaklı kimyasal maddeler ile çeşitli bitki kökenli maddeler, ksenobiyotikler arasında yer almaktadır. Bu kimyasallar 100-1000 dalton (Da) aralığında, genellikle 200-400 Da, molekül ağırlığına sahip küçük moleküllerdir (Gren 2012, Parkinson vd 2013). Çeşitli yollarla vücuda alınan ksenobiyotikler değişmeden atılabildikleri gibi, kendiliğinden değişime uğrayabilmekte ya da enzimler aracılığıyla metabolize edilebilmektedir. Ksenobiyotiklerin çeşitli enzimlerin etkisi ile vücutta uğradığı kimyasal değişiklikler 'biyotransformasyon' olarak adlandırılmaktadır. Biyotransformasyon sırasında bazı ksenobiyotikler inaktivasyona uğrarken (biyoinaktivasyon), bazıları da biyolojik olarak daha etkin veya toksik metabolitlere dönüşmektedir (biyoaktivasyon) (Macherey ve Dansette 2008).

Canlı organizmalar genel olarak düşük molekül ağırlıklı biyolojik aktif bileşikler üretilebilmektedir. Doğada bu bileşiklerin dağılımı ve fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte; mikrobiyal olarak üretilebilen ve antibakteriyel aktiviteye sahip antibiyotiklere olan ilgi, terapötik yararlılıklarından dolayı günümüze kadar artarak devam etmiştir. Antibiyotiklerin bulaşıcı hastalıkların tedavisinde başarılı bir şekilde uygulanması, çoklu kullanımlarının ve etki mekanizmalarının detaylı olarak araştırılmasını teşvik etmiştir. Buna bağlı olarak, literatürde bu bileşiklerin farmakoloji, dozaj, yan etkileri ve klinik uygulamaları ile ilgili kapsamlı bilgiler mevcuttur (Davies vd 2006).

Antibiyotikler, insan ve hayvan tıbbında tedavi edici amaçla uygulanmalarının yanı sıra, hayvancılıkta özellikle besi verimliliğinin artışı sağlayarak sağlıklı ve verimli bir şekilde ürün elde edilebilmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak yanlış ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucunda hayvanların yenilebilir dokularında ve ürünlerinde (et, süt, bal, yumurta) antibiyotik kalıntılarına rastlamak mümkündür. Bu duruma neden olan en önemli faktör, hayvanlara antibiyotik verildikten kısa bir süre sonra hayvanların ürünlerinin toplanması, kesim veya sağım işlemlerine kadar geçmesi gereken ve önerilen bekleme süresine uyulmamasıdır. İnsanları antibiyotik kalıntısı içeren gıdalara maruz kalmaktan koruyabilmek için bileşiklere özgü uzaklaşma (vücuttan atılma) süresi belirlenmelidir. Bu süre, antibiyotik uygulandıktan sonra kalıntıların toksikolojik olarak tolere edilebileceği güvenli konsantrasyona ulaşması için geçmesi gereken süredir (Botsoglou ve Fletouris 2001a, Nisha 2008).

Genel olarak ilaçların vücuda girişinden vücuttan çıkışına kadar geçen süre 4 evreye ayrılmıştır. Bunlar; absorpsiyon (emilim), vücutta dağılım, metabolizma ve atılımdır (Holçapek vd 2008). İlk olarak, ilaç uygulama yüzeyinden emilerek kan dolaşımına geçiş yapmaktadır (absorpsiyon). Absorbe edildikten sonra ilaç kan dolaşımını terk ederek vücut dokularında ve sıvılarında dağılmaktadır (dağılım). Daha sonra, ilaç başta karaciğer olmak üzere vücut dokularında biyokimyasal değişimlere

uğramaktadır (metabolizma). Son olarak, ilaç ve metabolitleri idrar ve dışkı ile vücuttan uzaklaşmaktadır (atılım) (Sakai 2014).

Antibiyotiklerin vücuda giriş-çıkışını etkileyen en kritik faktör, bileşiklerin absorpsiyonudur. Absorpsiyon, ilacın uygulama alanından vücuttaki dağılım bölgesine (kan dolaşımı) geçişidir (Holçapek vd 2008). Absorpsiyon, vücuda girdikten sonra art arda gelen zaman aralıklarında bileşiklerin kan dolaşımına geçiş hızı sabitinin belirlenmesi ile açıklanmaktadır. Antibiyotiklerin vücut doku ve sıvılarına absorpsiyon düzeyi, hücre membranının yapısına (protein-lipid etkileşimi ve gözenek boyutu) ve bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerine (iyonizasyon düzeyi) bağlı olarak değişmektedir. Lipofilik özelliği fazla olan ve en az iyonlaşan antibiyotiğin absorpsiyon hızı en yüksektir. Lipofilik özellikte olmamasına rağmen küçük molekül yapısındaki bileşikler de membranın gözeneklerinden kolayca geçebilmektedir. Ayrıca bileşiklerin pKa değeri ve ortamın pH'sı, bileşiklerin iyonlaşmasına etki ederek absorpsiyona etkide bulunmaktadır (Botsoglou ve Fletouris 2001b, Sakai 2014). İlaç dağılımı, emilen ilacın kan dolaşımından ayrılarak çeşitli vücut sıvılarına, hedef dokulara ve doku hücrelerine geçiş yaptığı süreci ifade etmektedir (Holçapek vd 2008). İlacın dağılım hızını, öncelikle ilacın lipidlerde çözünürlük derecesi ve uygulama alanındaki kan akış hızı etkilemektedir. İlacın dağıldığı ortamın pH'sı ve bileşiğin pKa'sı dağılıma etki eden diğer faktörlerdir. Ayrıca, ilacın plazma proteinlerine bağlanma özellikleri de dağılım hızını etkilemektedir (Botsoglou ve Fletouris 2001b, Sakai 2014).

Metabolizma ve atılım aşamaları, ilacın vücuttan uzaklaşma sürecini kapsamaktadır. Metabolizma veya biyotransformasyon çalışmaları, ilacın vücuttan atılım süresinin, dozajın etkisinin, metabolitlerinin farmakoloji ve toksikolojisinin ve çoklu ilaç kombinasyonlarının etkileşimlerinin anlaşılması açısından oldukça önemlidir. Hidrofobisite, ilaçların hem ağızdan emiliminde hem de hedef moleküller ile etkileşiminde rol oynayan, birçok ilaç molekülünün önemli bir kimyasal özelliğidir. Hidrofobisite arttıkça ilacın emilimi ve etkileşimi artma eğilimindedir. Tam tersi olarak, ilacın böbrek veya safra ile vücuttan atılımı hidrofobisite arttıkça azalmaktadır. Bu yüzden, hidrofobik ilaç moleküllerinin hidrofilik moleküllere metabolizması veya biyotransformasyonu ilacın vücuttan atılımını hızlandırmak için çok önemli bir faktördür (Bachmann 2009). İlaç ve metabolitlerini içeren atık maddelerin vücuttan atılımı, başta idrar yoluyla böbreklerden olmak üzere safra ile karaciğerden, tükürük ve anne sütü gibi vücut sıvılarından veya akciğerden solunum ile uzaklaşarak gerçekleşmektedir (Taft 2009). Atılımı etkileyen faktörlerin başında böbrek ve karaciğer işlevlerinin iyi olması gelmektedir. Bunun yanı sıra, ilacın dozajı ve hidrofobisitesi de atılımı etkileyen diğer faktörlerdir (Botsoglou ve Fletouris 2001b).

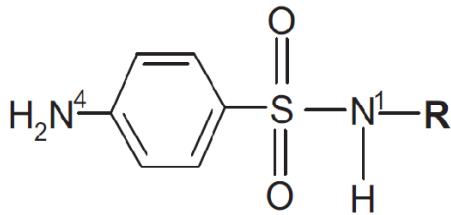
2.1. Sülfonamid Grubu Antibiyotikler

İlaçların dünyada üretimi ve tüketimi giderek artmaktadır. Enfeksiyona karşı kullanılan (antienfektif) ilaçların, mikrobiyal enfeksiyonların modern tedavisinde kullanımı oldukça önemli bir olgudur. Sülfonamidler, antienfektif olarak çiftçilikte, su ürünleri yetiştiriciliğinde, hayvancılıkta ve tıpta uzun zamandır kullanılmaktadır ve günümüzde yaygın olarak reçete edilmektedir (Samanidou vd 2008, Baran vd 2011). Bu grup antibiyotikler, veteriner hekimlikte bakteriyel ve protozoal enfeksiyonların tedavisinde etkili olan kemoterapötik bileşikler olarak önemli bir rol oynamaktadır. Bu

ilaçların endikasyonları, geniş spektrumda aktiviteye sahip olmalarından dolayı oldukça geniştir. Genel olarak, sindirim ve solunum yollarındaki bulaşıcı hastalıklarda, ikincil enfeksiyonlarda, mastit (meme iltahabı), metritis (rahim iltahabı) ve ayak çürümesi (footrot) gibi hastalıklarda kullanılmaktadır (Botsoglou ve Fletouris 2001a). Sülfonamidler, gram-pozitif bakterilerin geniş spektrumuna ve birçok gram-negatif bakteriye karşı etki göstermektedir. Etki spektrumları, Streptococcus, Staphylococcus, Escherichia, Neisseria, Shigella, Salmonella, Nocardia, Chlamydia ve Clostridium bakterileridir. Ayrıca protozoa (*Toxoplasma gondii*), parazit (*Plasmodium malariae*) ve fungi (*Pneumocystis carinii*)'ye de etki etmektedir (Baran vd 2011).

Sülfonamid grubundaki antibiyotiklerin kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bu grup, ortak olarak bir benzol halkasına para durumunda bağlı olan (N⁴ konumu) bir amino (NH₂) grup ve bir de fonksiyonel grup içermektedir. Fonksiyonel grup (SO₂NHR), amin grubun bağlı olduğu sülfon grubundan oluşmaktadır. Grup içerisindeki antibiyotiklerin birbirinden farkı, fonksiyonel grupta yer alan yapının (R) farklılığından kaynaklanmaktadır (N¹ konumu). Sülfonamidlerin etki mekanizması, para-aminobenzoik asidin (PABA) etkinliğini önleyerek hücrede DNA sentezi için gerekli olan dihidrofolik asidin sentezini engellemektedir (Wang vd 2006, Samanidou vd 2008). Sülfonamidler, amfoterik özelliğe sahip polar yapıli bileşiklerdir. Amfoterik özellik, sülfonamidin yapısındaki amino grubunun bazik ve amid grubunun da asidik oluşundan kaynaklanmaktadır (Gentili vd 2004, Baran vd 2011, Dmitrienko vd 2014). Sülfonamidlerin pK_{a1} (1,4-2,5) ve pK_{a2} (5,0-8,5) değerleri, sırasıyla, amin grubunun proton kazanması ve amid grubunun proton kaybetmesi ile bağlantılıdır. Bu yüzden bu bileşiklerin çoğu asidik ortamda pozitif yüklü, bazik ortamda ise negatif yüklü hale gelmektedir (Dmitrienko vd 2014, Kung vd 2015).

Düşük molekül ağırlığına sahip bu bileşiklerin çoğu, suda çözünebilmektedir (Baran vd 2011). Çözünen sülfonamidler geniş ölçüde dokulara nüfuz etmekte ve idrar, safra ve süt gibi vücut sıvılarına geçebilmektedir. Sülfonamid kalıntılarının vücut dokularından ve sıvılarından atılım hızı bileşiklerin yapısına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Botsoglou ve Fletouris 2001a). Sülfonamidler, kolay ve hızlı bir şekilde doğada yayılabilmektedir. Ayrıca ısı ve ışığa karşı kararlı bileşiklerdir (Baran vd 2011).

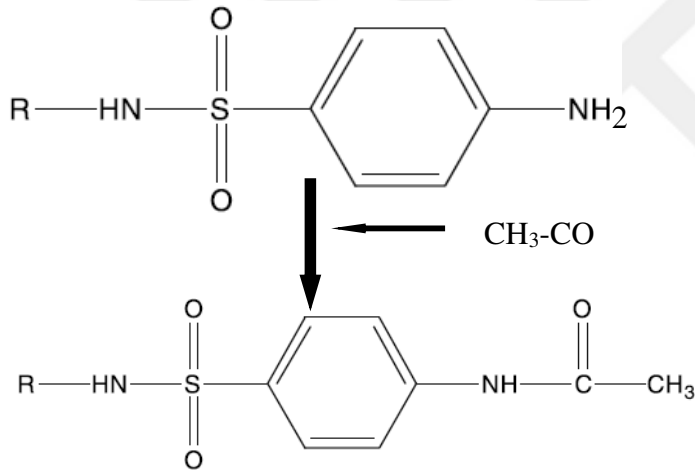


Şekil 2.1. Sülfonamidlerin kimyasal yapısı

Ksenobiyotiklerin enzimlerin etkisi ile metabolitlerine biyotransformasyonu faz I ve faz II reaksiyonları olmak üzere 2 yolla gerçekleşmektedir. Faz I reaksiyonları; oksidasyon, redüksiyon ve hidrolizi içermektedir. Bu reaksiyonlar sonucunda bileşiğe -OH, -SH, -NH₂ ve -COOH gibi polar fonksiyonel gruplardan bir tanesi eklenerek veya bileşiğin yapısında açığa çıkarılarak, bileşiğin hidrofilik özelliğinde artış

sağlanmaktadır. Faz II reaksiyonları ise konjugasyon reaksiyonları olarak adlandırılmaktadır. Bu reaksiyonlar; glukuronidasyon, sülfatasyon, asetilasyon, metilasyon reaksiyonlarını ve aminoasit ve glutatyon konjugasyonlarını kapsamaktadır (Holçapek vd 2008, Parkinson vd 2013). Biyotransformasyon, bileşiğin molekül yapısını değiştirerek bazı karakteristik özelliklerinde kayıplara veya değişikliğe neden olmaktadır. Bu işlem, bileşiğin çözünürlük, biyoyararlılık gibi fiziko-kimyasal özellikleriyle birlikte toksisitesine de etki etmektedir. Faz I ve faz II reaksiyonları genellikle detoksifikasyona yönelik reaksiyonlardır ve bileşiğin vücuttan atılımını hızlandırmaktadır. Ancak bazı bileşiklerin biyolojik aktivitesi metabolitlerinde de görülebilmektedir (Gren 2012).

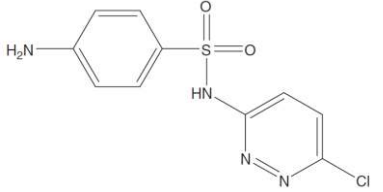
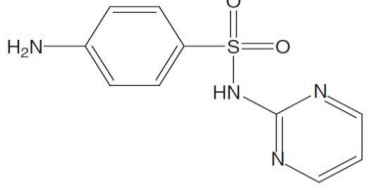
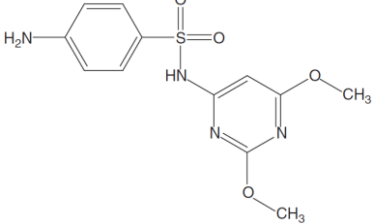
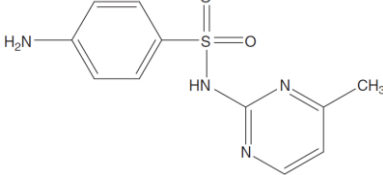
Sülfonamid grubu antibiyotiklerin biyotransformasyonu, faz I oksidasyon ve faz II asetilasyon olmak üzere 2 yolla gerçekleşerek sırasıyla N¹ ve N⁴ türevleri oluşmaktadır. Bu grup antibiyotiklerin hayvanlardaki temel metabolik iz yolu, Şekil 2.2’de belirtildiği üzere yapısındaki benzen halkasında N⁴ konumunda yer alan amino grubunun asetilasyonudur (García-Galán vd 2008, Abdallah vd 2014). Asetilasyon ile oluşan metabolitlerin çeşidi ve miktarı hayvanın türüne, yaşına, cinsiyetine, beslenmesine ve yaşadığı çevre koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Samanidou vd 2008).



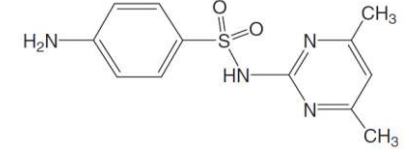
Şekil 2.2. Sülfonamid’in asetilasyonu

Çizelge 2.1’de bu tez kapsamında kullanılan sülfonamid grubu antibiyotiklerin uluslararası tescilli olmayan adı (INN), Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından belirtilen adı, Kimyasal Kuramlar Servisi (CAS) tarafından belirtilen kayıt numaraları, molekül formülü ve kimyasal yapısı belirtilmiştir (Reeves 2012).

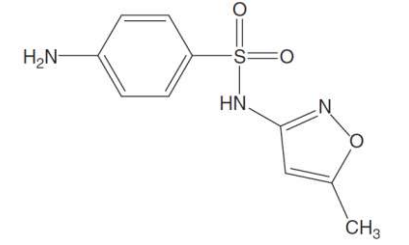
Çizelge 2.1. Sülfonamid grubu antibiyotiklerin uluslararası tescilli olmayan adı (INN), Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından belirtilen adı, Kimyasal Kuramlar Servisi (CAS) tarafından belirtilen kayıt numaraları, molekül formülü ve kimyasal yapısı

INN adı	IUPAC adı	CAS numarası	Molekül formülü	Kimyasal yapısı
Sülfakloropiridazin	4-Amino- <i>N</i> -(6-chloropyridazin-3-yl) benzenesulfonamide	80-32-0	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	
Sülfadiazin	4-Amino- <i>N</i> -pyrimidin-2-yl-benzenesulfonamide	68-35-9	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	
Sülfadimetoksin	4-Amino- <i>N</i> -(2,6-dimethoxypyrimidin-4-yl) benzenesulfonamide	122-11-2	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	
Sülfamerazin	4-Amino- <i>N</i> -(4-methylpyrimidin-2-yl)benzenesulfonamide	127-79-7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	

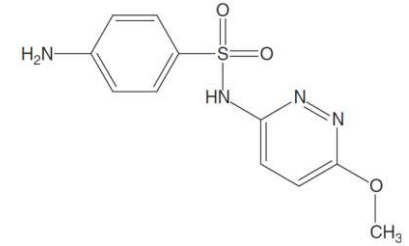
Sülfametazin

4-Amino-*N*-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzenesulfonamide 57-68-1 $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ 

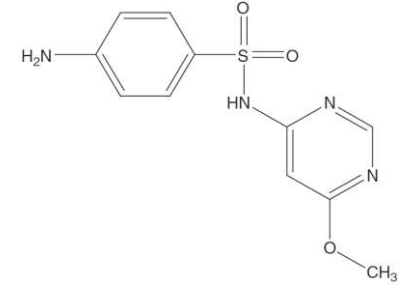
Sülfametoksazol

4-Amino-*N*-(5-methyl-3-isoxazolyl)-benzenesulfonamide 723-46-6 $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ 

Sülfametoksipiridazin

4-Amino-*N*-(6-methoxypyridazin-3-yl)benzenesulfonamide 80-35-3 $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ 

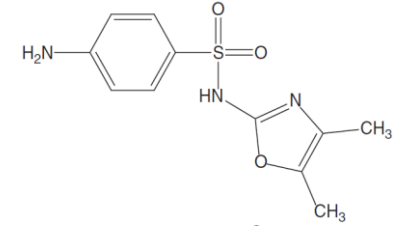
Sülfamonometoksin

4-Amino-*N*-(6-methoxy-4-pyrimidinyl)benzenesulfonamide 1220-83-3 $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ 

Sülfamoksol

4-Amino-*N*-(4,5-dimethyl-1,3-oxazol-2-yl)benzenesulfonamide

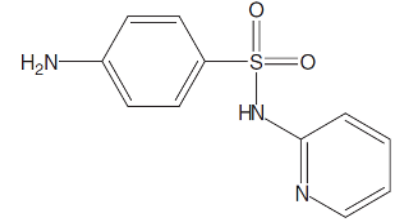
729-99-7

 $C_{11}H_{13}N_3O_3S$ 

Sülfapiridin

4-Amino-*N*-pyridin-2-ylbenzenesulfonamide

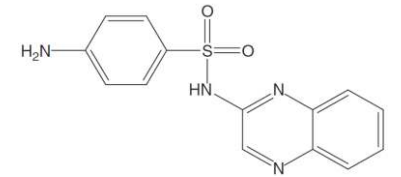
144-83-2

 $C_{11}H_{11}N_3O_2S$ 

Sülfakinoksalin

4-Amino-*N*-2-quinoxalinylnbenzenesulfonamide

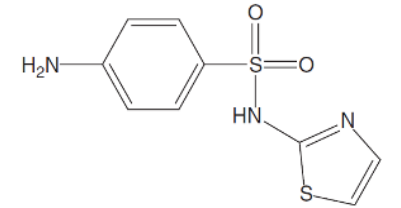
59-40-5

 $C_{14}H_{12}N_4O_2S$ 

Sülfatiazol

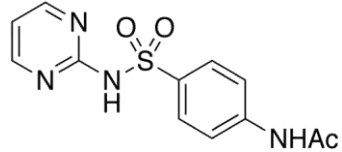
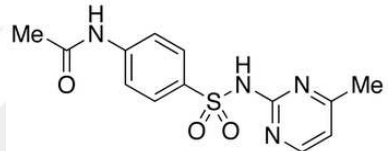
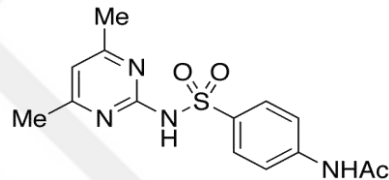
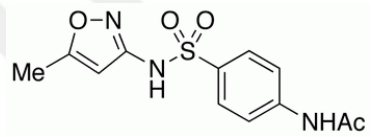
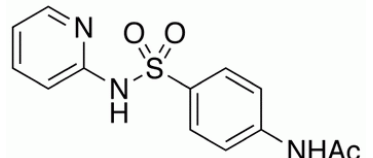
4-Amino-*N*-(1,3-thiazol-2-yl)benzenesulfonamide

72-14-0

 $C_9H_9N_3O_2S_2$ 

Çizelge 2.2’de bu tez kapsamında kullanılan sülfonamidlerin 5 tanesinin metabolitlerinin INN adı, CAS numaraları, molekül formülü ve kimyasal yapısı belirtilmiştir (Anonymous 2015).

Çizelge 2.2. Sülfonamid metabolitlerinin uluslararası tescilli olmayan adı (INN), Kimyasal Kuramlar Servisi (CAS) tarafından belirtilen kayıt numaraları, molekül formülü ve kimyasal yapısı

INN adı	CAS numarası	Molekül formülü	Kimyasal yapısı
N-asetilsülfadiazin	127-74-2	C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	
N-asetilsülfamerazin	127-73-1	C ₁₃ H ₁₄ N ₄ O ₃ S	
N-asetilsülfametazin	100-90-3	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₃ S	
N-asetilsülfametoksazol	21312-10-7	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	
N-asetilsülfapiridin	19077-98-6	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	

*Me, metil (CH₃) organik yapısını ifade etmektedir

*Ac, asetil (CH₃-CO) karbonil grubunu ifade etmektedir

2.2. Ekstraksiyon

Tüketilen gıdalarda antibiyotik kalıntılarının bulunması insan sağlığını ciddi düzeyde etkilemektedir. Bu amaçla; hızlı, seçici ve hassas yöntemler kullanılarak gıdalarda olabildiği kadar düşük konsantrasyon seviyelerinde bulunabilecek antibiyotik kalıntılarının tespit edilmesi önemlidir. Genel olarak, bir analitik yöntem birbirini izleyen örnekleme, örnek hazırlama, ayırma, tespit etme ve veri analizi olmak üzere beş aşamayı kapsamaktadır. Her bir aşama, analizin doğruluğu, güvenilirliği ve performansı açısından kendi içerisinde önem arz etmektedir (Dean 2009). Ancak, analitik yöntemin toplam süresinin %80’ini kapsayan örnek hazırlama aşaması, bir analiz yönteminin kilit noktasını oluşturmaktadır (Dean 2009, Kinsella vd 2009). Gıda gibi homojen yapıda olmayan karmaşık yapıli matrikslerde eser (trace) kalıntı ve kontaminantların belirlenmesi için enstrümental analiz aşamasından önce örnek hazırlama işleminin

uygun şekilde yapılması önemlidir. Bu aşamada hem süreyi hem de hata kaynaklarını azaltmak için işlem basamaklarını minimize etmek gerekmektedir (Smith 2003, Ridgway vd 2007).

Temel işlevi, matriksi analiz için uygun formda örneğe dönüştürmek olan bu aşamada uygulanan birçok güncel teknik mevcuttur (Dean 2009, Kinsella vd 2009). Bu tekniklerin uygulanış biçimlerinde farklılık olmasına rağmen; interferans oluşturan maddeleri uzaklaştırmak, analitin konsantrasyonunda artış sağlayarak analizin duyarlılığını artırmak, gerekli olduğu takdirde analitin ayrılması ve tespit edilmesi için onu uygun forma dönüştürmek ve örnek matriksindeki varyasyondan bağımsız olarak sağlam ve tekrarlanabilir yöntem sağlamak gibi ortak amaçları vardır (Smith 2003, Pavlovic vd 2007). En uygun örnek hazırlama işlemi ile analiz süresinin kısaltılması ve hata kaynaklarının azaltılması, duyarlılığın artırılması ve tanımlama, doğrulama ve miktar belirleme işlemlerinin doğru bir şekilde yapılması mümkün olmaktadır (Smith 2003, Ridgway vd 2007).

Ekstraksiyon işlemi, uygun seçicilikte bir çözücü kullanılarak matriksten ilgili analiti ayırmak amacıyla uygulanan en eski ve temel örnek hazırlama yöntemidir (Smith 2003). 1879 yılında Franz Soxhlet tarafından geliştirilen ve günümüzde de rutin olarak laboratuvarlarda kullanılmakta olan Soxhlet ekstraksiyonu uygulanan en eski ekstraksiyon yöntemidir. Ancak, bu yöntemin uygulanışı zaman almakta, yöntemde fazla miktarda çözen kullanılmakta ve bunun sonucu olarak da atık miktarı fazla olmaktadır (Buldini vd 2002, Kaufmann ve Christen 2002, Smith 2003, Mustafa ve Turner 2011). Son yıllarda ise, manuel örnek hazırlama işleminin yerine otomasyon ile işlemin yapıldığı, daha az organik çözenin ve daha küçük örnek hacminin kullanıldığı ve daha az atığın açığa çıktığı çevre dostu tekniklerin uygulanmasına doğru bir yönelim vardır (Smith 2003, Kronholm vd 2007, Ridgway vd 2007). Çevre dostu veya yeşil teknoloji (green technology) tekniklerin uygulanmasının amacı, çevreyi ve doğal kaynaklarını korumak ve insanların neden olduğu olumsuz etkileri kısıtlamaktır. Buna bağlı olarak, yeşil kimyanın (green chemistry) felsefesi, zararlı toksik bileşiklerin kullanımını veya üretimini azaltan ve/veya elimine eden yöntemleri geliştirmek ve bu yöntemlerden yararlanılmasını teşvik etmektir (Mustafa ve Turner 2011). Gelişmiş (modern) ekstraksiyon yöntemlerinin uygulanmasında pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyulmasına rağmen; çevresel etkileri, hızı ve otomasyonu açısından günümüz gereksinimlerinin çoğunu karşıladıkları için bu tekniklere artan bir talep olmuştur. Süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE), basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE) ve mikrodalgade destekli ekstraksiyon (MAE) en yaygın kullanılan gelişmiş ekstraksiyon yöntemleridir. Bu tekniklerin ortak özelliği, ekstraksiyon hızını önemli ölçüde artıran, yüksek sıcaklık ve basınçta çalışmalarıdır (Kaufmann ve Christen 2002, Turner 2006, Kinsella vd 2009, Stolker ve Danaher 2012).

Sıvı-faz ekstraksiyon ve katı-faz ekstraksiyon günümüzde en yaygın kullanılan örnek hazırlama yöntemleridir. Bu tekniklerin, kullanılan örnek ağırlığı/hacmi, ekstraksiyon süresi, çözen çeşidi ve tüketim miktarı, ekstrakte edilecek materyalin yapısı (katı, yarı-katı, sıvı), ekstraksiyonun kesikli veya sürekli yapılışı, işlemi yapacak olan personelin deneyimi, ekipman maliyeti ve otomasyon düzeyi açısından birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (Buldini 2002, Dean 2009).

2.2.1. Sıvı-faz ekstraksiyon

Sıvı-faz ekstraksiyon, laboratuvar çalışmalarında ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntem, çözünen maddelerin katı matriksten çözgene geçişini içeren bir ayırma prosesidir. Çözgen, ayırmak istenilen çözünenin çözünürlük özellikleri baz alınarak seçilmektedir. Ayırma işleminde mümkün olduğunca saf bir bileşik elde etmek için ayırmak istenilen bileşiğin çözgünde yüksek çözünürlüğe sahip olması, matriks içerisindeki diğer bileşiklerin ise çözgünde çözünmemesi gerekmektedir (Pronyk ve Mazza 2009). Ekstraksiyon işleminin verimli olabilmesi için çözgen seçiminde analitin polarite ve pKa gibi fiziko-kimyasal özelliklerinden yararlanılmaktadır (Kinsella vd 2009). Ayrıca, çözgenin geri kazanımının kolay, yüzey geriliminin ve viskozitesinin düşük, yapısının stabil, çevreye zararsız ve ucuz olması; fakat toksik, reaktif ve yanıcı olmaması dikkate alınmalıdır (Aguilera 2003). Gıda matrikslerinde yapılan kalıntı analizinde çözgen olarak genellikle metanol, asetonitril, etilasetat veya aseton gibi organik çözücüler kullanılmaktadır (Anastassiades vd 2003, Kaufmann vd 2008). Son yıllarda, sıvı-faz ekstraksiyon işlemini gerçekleştirmek için manuel ekstraksiyon uygulamalarının (QuEChERS) yanısıra otomasyon ile yapılan uygulamalar (PLE) da cazip hale gelmektedir.

2.2.1.1. QuEChERS

Hızlı (quick), kolay (easy), ucuz (cheap), etkili (effective), sağlam (rugged) ve güvenli (safe) kelimelerinin baş harflerinden oluşan QuEChERS yöntemi, Anastassiades vd (2003) tarafından meyve ve sebzelerde pestisit kalıntılarının analizi için geliştirilen bir ekstraksiyon yöntemidir. Orijinal yöntemde, analitler magnezyum sülfat ($MgSO_4$) veya sodyum klorür ($NaCl$) gibi tuzların varlığında asetonitril ile ekstrakte edildikten sonra susuz $MgSO_4$ ve primer sekonder amin (PSA) ile temizlenmektedir (clean-up). Sonraki yıllarda, bu yöntemin performansını artırmak amacıyla içeriğinde bazı değişiklikler yapılarak yöntem daha etkili ve verimli hale getirilmiştir (Lehotay vd 2010). Ancak genel olarak bu yöntem iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama, gıdalardaki analitlerin susuz magnezyum sülfat ($MgSO_4$) veya sodyum klorür ($NaCl$) gibi tuzların varlığında asetonitril, metanol, etilasetat veya aseton ile ekstrakte edilmesini; ikinci aşama ise elde edilen ekstraktın susuz $MgSO_4$, PSA, C18 veya aktif kömür yardımıyla dispersif katı faz ekstraksiyonu (dSPE) kullanılarak temizlenmesini (clean-up) kapsamaktadır (Bruzoniti vd 2014).

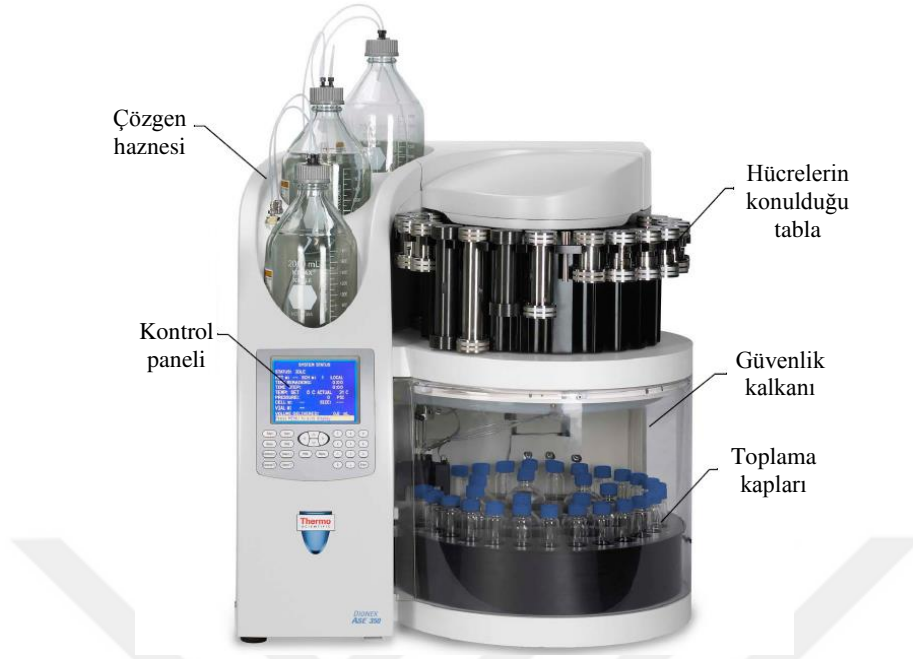
Asetonitril, ekstraksiyon işleminde diğer çözücülere kıyasla analitleri daha yüksek verimle matriksten ayırdığı ve aynı zamanda interferans etki oluşturabilecek bileşikler en az düzeyde çözdüğü için, ekstraksiyon işleminde diğer organik çözücülere göre daha çok tercih edilmektedir (Kaufmann vd 2008). Analizin yapılışı oldukça esnek olup, analitin ve matriksin yapısına bağlı olarak yöntemin uygulanışı değiştirilebilmektedir (Kinsella vd 2009). Bazı uygulamalarda, analitin ekstraksiyon sırasında stabilitesini sağlamak, geri kazanımını artırmak ve ortamın pH'sını ayarlamak ve muhafaza etmek amacıyla ilk aşamada asetonitril, asetik asit (%1) ve sodyum asetat ile birlikte kullanılmaktadır (Lehotay vd 2005). İlk aşamada kullanılan tuzlar, çözücü ile gıdanın yapısında bulunan su arasında faz ayrımını sağlamaktadır. Hedef analit ve matriksten ekstrakte edilen diğer bileşikler sıvı fazda polaritelerine göre ayrılmakta; analit çözgen fazına geçerken diğer bileşikler su fazına geçmektedir (Kinsella vd 2009).

Ekstraksiyonun ikinci aşamasında yaygın olarak kullanılan sorbentler; C18, PSA ve aktif kömürdür. C18, yağ gibi hidrofobik bileşikler; PSA, şeker ve organik asitler gibi polar bileşikler; aktif kömür ise meyve ve sebze matrislerinde bulunan klorofil gibi pigmentleri uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu aşamada kullanılan susuz $MgSO_4$, ekstraktaki suyu tutmakta ve matristen gelen interferans etki yaratan bileşiklerin uygun sorbent üzerinde tutunmasını artırmaktadır (Bruzzoniti vd 2014, Moldoveanu ve David 2015).

2.2.1.2. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu

Basınçlı sıvı ekstraksiyon yöntemi ilk defa 1995 yılında Dionex firması tarafından geliştirilmiş olup, ticari olarak otomatik ekstraksiyon sistemi (Dionex ASE®) adı altında kullanımı onaylanmıştır (Richter vd 1996). Bu teknik aynı zamanda basınçlı çözügen ekstraksiyonu (PSE), hızlandırılmış çözügen ekstraksiyonu (ASE) ve subkritik çözügen ekstraksiyonu (SSE) olmak üzere farklı isimlerle de literatürde geçmektedir (Pronyk ve Mazza 2009). Bu yöntem, örneğin paslanmaz çelikten yapılmış ekstraksiyon hücresinde 5-10 dk gibi kısa sürede yüksek sıcaklık (50-200 °C) ve basınçta (500-3000 psi) çözügene maruz kalarak, örneğin yapısında bulunan ilgili analitlerin çözügene geçişini ve belirli basınçtaki gaz (N_2) yardımıyla ekstraktın hücreden toplama kabına aktarılmasını kapsamaktadır (Richter vd 1996, Buldini vd 2002). Ekstraksiyon hücreleri 1, 5, 10, 22, 34, 66 ve 100 mL olmak üzere farklı hacimlerde bulunmaktadır. Hücrenin hacmi ekstraksiyon süresini etkilememektedir. Bu değer ekstraksiyonda kullanılacak çözügen hacmi ile doğrudan ilgilidir. Ekstraksiyon verilerinin doğru elde edilebileceği, yeterli miktarda örneğin konulduğu en küçük boyutta hücre seçimi önemlidir. Ekstraksiyon işleminde daha az çözügen harcanması amacıyla küçük hacimli hücreler tercih edilmektedir. Bu duruma ilave olarak, hücreye örnekle birlikte belirli oranda diatome toprağının konulması örnek hacmini artırarak hücrenin daha az çözügenle dolmasını sağlayacaktır (Anonymous 2011).

Bu yöntemde ekstraksiyon verimini etkileyen temel parametreler; sıcaklık, basınç, çözügen çeşidi, örnek miktarı ve yapısı, ekstraksiyon modu ve süredir (Sun vd 2012). Ekstraksiyon sisteminde sıcaklık ve basınç değiştirilerek çözügenin yoğunluk, difüzyon, viskozite ve dielektrik sabiti gibi fizikokimyasal özellikleri kontrol altına alınabilmektedir (Pronyk ve Mazza 2009, Sun vd 2012). Ekstraksiyonun yüksek sıcaklıkta gerçekleşmesi çözügenin difüzyon hızını, analitin çözünürlüğünü ve kütle transferini artırmakta; çözügenin viskozitesini ve yüzey gerilimini azaltmaktadır. Bu değişimler, çözügenin matriste daha iyi penetre olmasını sağlayarak, analitin çözügen ile etkileşimini artırmakta ve klasik yöntemlerle kıyaslandığında işlemin daha hızlı ve az çözügen harcanarak gerçekleşmesini sağlayarak ekstraksiyonu geliştirmektedir (Richter vd 1996, Buldini vd 2002, Ramos vd 2002, Luthria vd 2004, Carabias-Martínez vd 2005, Schantz 2006). Ayrıca yüksek sıcaklık uygulaması, analit ile matris interaksiyonunun kırılmasına etki ederek analitin matris yüzeyine difüzyonunu desteklemektedir (Carabias-Martínez vd 2005, Ridgway vd 2007). Yüksek basınç ise; çözügenin matris gözeneklerinden içeriye daha çok girmesini ve çalışılan yüksek sıcaklıklarda çözügenin kaynamasını önleyerek sıvı fazda kalmasını sağlamaktadır (Richter vd 1996, Buldini vd 2002, Ramos vd 2002, Luthria vd 2004, Carabias-Martínez vd 2005, Schantz 2006).



Şekil 2.3. ASE 350 sistemi

Ekstraksiyon işleminde kullanılacak çözügen seçilirken çözügenin kaynama noktası, polarite ve yoğunluk gibi fizikokimyasal özelliklerinin yanısıra toksisitesi de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu yöntemde cihazda meydana gelebilecek aşınmalardan dolayı kuvvetli asit ve bazlar dışında, metanol, su, toluen, diklormetan, etil asetat ve asetonitril gibi birçok çözügen kullanılmaktadır. İşlemin yüksek verimde gerçekleşmesi için çözügenin polaritesinin hedef bileşiğin polaritesine yakın olması istenir; ancak farklı polaritedeki birden fazla analitin ekstraksiyonunda polar ve apolar çözügenlerin karıştırılarak kullanılması ile daha yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Aynı şekilde örneğin fizikokimyasal yapısı ve buna ek olarak boyutu da ekstraksiyon verimine etki etmektedir. Partikül boyutunun azaltılması yüzey alanını artırdığından dolayı çözügenin daha iyi bir şekilde örneği ıslatması sağlanmaktadır. Bu parametreler analitin çözügen fazına geçişini ve orada tutulmasını etkilemektedir (Sun vd 2012).

Ekstraksiyon işlemi için uygun örnek miktarı seçilirken dikkate alınması gereken iki durum vardır. Bunlardan ilki örneğin yapısı ile ilgilidir. Eğer örnek yaş haldeyken yapısal olarak sıkıysa ekstraksiyon için az miktarda örnek kullanılmalıdır (Nieto vd 2010). Ayrıca örneğin yapısında bulunan organik bileşiklerin sayısı arttıkça ekstraksiyon işlemi daha karmaşık hal almaktadır. Genellikle bu yapılardan bazıları ekstraksiyon sırasında analit ile birlikte ekstrakta geçmektedir. Bu yüzden bu yapılar ya ekstraksiyondan önce ya da sonra yapıdan uzaklaştırılmalıdır (Giergielewicz-Możajska vd 2001, Sun vd 2012). İkinci durum ise, ekstraksiyon hücresinin hacmi ile ilgilidir. Ekstraksiyon hücresinin maksimum kapasitede doldurulması onun bloke olmasına neden olmaktadır. Yaygın olarak kullanılan 11 mL'lik hücrelere 1 g örnek koyulurken, 5 g'a kadarki örnek ağırlıklarında 33 mL'lik hücreler kullanılmaktadır (Nieto vd 2010).

Bu ekstraksiyon yönteminde işlem statik mod ve dinamik mod olmak üzere 2 ayrı şekilde veya bu iki modun kombinasyonu ile gerçekleşmektedir. Statik modda, ilk olarak hücre içerisindeki örnek ve çözgen uygun sıcaklığa kadar ısıtılmakta ve basınç ayarlanmaktadır. Bu parametreler dengeye ulaştığında da ekstraksiyon başlamakta ve sabit koşullarda devam etmektedir (Giergielewicz-Możajska vd 2001, Sun vd 2012). Bu modda ekstraksiyon verimi analit ile çözgen arasındaki denge sabitine ve bileşiklerin çözünürlüğüne bağlı olarak değişmektedir. Bu durum özellikle yüksek oranda konsantre ürünler ve düşük çözünürlüğe sahip analitler için sıkıntı yaratabilmektedir (Kronholm vd 2007, Sun vd 2012). Bu modda yapılan ekstraksiyonda kritik olan parametreler sıcaklık ve süredir. Ekstraksiyon süresi, döngü sayısı ile bağlantılıdır ve verimi etkilemektedir. Döngü sayısı taze çözgenin hücreye giriş ve örnek ile etkileşim sayısını ifade etmektedir. Döngü sayısı yani süre çözgenin analit ile yeterli düzeyde etkileşimini sağlamak açısından önemlidir (Nieto vd 2010, Sun vd 2012). Dinamik modda ise örnek belirli hızda sürekli olarak taze çözgen akışına maruz kalmaktadır. Bu durum kütle transferini artırmasına rağmen, bu modda statik moda kıyasla daha fazla miktarda çözgen harcandığı için dinamik mod analizlerde nadir kullanılmaktadır (Giergielewicz-Możajska vd 2001). Analiz sırasında gereğinden fazla çözgen kullanılması ekstraktın seyrelmesine neden olacağı için ekstraktın konsantre edilmesine veya uygulanacak konsantrasyon işlemlerinin zorlaşmasına ve zaman kaybına sebep olmaktadır (Ridgway vd 2007).

2.3. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), 30 yıldan fazla süredir dünya çapında laboratuvarlarda kullanılan yaygın bir teknolojidir. Bu tekniğin gelişmesinde yer alan başlıca faktör, etkili ayrımı sağlayabilecek kolon dolgu malzemelerinin evrimi olmuştur (Swartz 2005). Bu evrimin temel ilkeleri van Deemter denklemi ile literatürde yer almaktadır. Bu denklem, doğrusal hız (akış hızı), plaka yüksekliği (HETP, veya kolon verimi) ve partikül boyutu arasındaki ilişkiyi tanımlayan deneysel bir formüldür (Villiers vd 2006). Sıvı kromatografinin keşfinden bu yana araştırmacılar çözünürlüğü ve verimliliği artırarak piklerin ayrımını geliştirmeye çalışmaktadır ve kolonda küçük boyutta partikül kullanımının daha iyi sonuç verdiği yıllardır bilinmektedir. LC'de 1950 yıllarında ilk olarak kullanılan 100-200 µm boyutundaki partikül çapının günümüze gelene kadar 2 µm'nin altına düşürülmesi önemli bir gelişmedir. Partikül boyutu 1960lı yıllarda 40-50 µm'ye, 1970li yıllarda 10 µm'ye, 1980li yıllarda 5µm'ye ve 1990lı yıllarda da 3-3,5 µm'ye düşürülmüştür. Partikül boyutunun azalması analiz veriminin artması ve analiz süresinin kısalması açısından önemli gelişmeler sağlamıştır. 2004 yılında ise 1,7 µm boyutunda küçük partiküllü, gözenekli silika malzemesi ticari olarak piyasaya sürülmüştür. Günümüzde ise Çizelge 2.3'de belirtildiği üzere çeşitli kolon tedarik firmaları tarafından 1,5-2 µm aralığında gözenek boyutuna sahip birçok kolon piyasada mevcuttur (Nguyen vd 2006).

Çizelge 2.3. Kolon tedarik firmaları

Üretici firma	Kolon adı	Partikül boyutu (µm)
Agilent	Zorbax RRHT	1,8
Alltech	Alltima, Platinum, ProSphere	1,5
Bischoff	ProntoPEARL	1,8
Interchim	TSKgel Super-ODS	2,0
Macherey Nagel	Nucleodur	1,8
Sepax	GP	2,0
Shimadzu	Pathfinder	1,5
Thermo	Hypesil GOLD	1,9
Waters	ACQUITY BEH	1,7
YMC	YMC	2,0

Partikül boyutunun küçülmesi analiz veriminde artışa neden olmakla birlikte beraberinde bazı olumsuz durumlar da açığa çıkarmıştır. Bunlardan ilki, partikül boyutunun küçülmesine paralel olarak sistemde kolon geri basıncında artış olduğunun gözlenmesidir. Buna bağlı olarak, geleneksel HPLC ekipmanlarının basınç limitinden dolayı yüksek basınç değerlerine karşı dayanıklı bir sistem olan UHPLC cihazı geliştirilmiştir. Geleneksel sıvı kromatografilerinde maksimum geri basınç 350-400 bar arasında değişirken; UHPLC’de bu değer 1035 bar’a kadar çıkabilmektedir (Novákova vd 2006, Villiers vd 2006). Diğer bir olumsuz durum ise, hareketli fazın küçük partikül boyutlu kolon malzemesinden yüksek basınç vasıtasıyla geçerken sürtünmeden dolayı açığa çıkan ısıdır. Bu ısının özellikle geniş çaptaki kolon içerisinde hemen dağılması mümkün olmadığı için hareketli fazın sıcaklığında artışa ve analitin yapısında değişimlere neden olabilmektedir. Ayrıca kolon içerisinde oluşan sıcaklık dalgalanmaları analitin tespit zamanının değişmesine ve pikte bant genişlemesine yol açarak analizin güvenilirliğini azaltmaktadır. Bu olumsuz durumu elimine etmek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda kolon çapının azaltılmasının iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (Nguyen vd 2006, Novákova vd 2006, Villiers vd 2006).

Yüksek basınçta başarılı bir pik ayrımı gerçekleştirmek için partikül boyutunun yanı sıra sabit fazın yani kolon dolgu materyalinin kalitesi ve stabilitesi de önemlidir. Silika bazlı kolonlar yüksek basınca karşı mekanik olarak dayanıklıdır; ancak sınırlı pH aralığında çalışması ve bazik analitlerde sinyal piklerinde kuyruk oluşturması açısından dezavantajları mevcuttur. Polimer bazlı kolonların ise çalışma pH aralığı geniştir; fakat bu kolonların düşük verimlilikleri ve sınırlı kapasiteleri açısından sorunlar vardır. Bu yüzden bu iki materyalin olumsuzluklarını ortadan kaldırmak ve olumlu yönlerini birleştirmek amacıyla günümüzde de yaygın olarak kullanılan hibrit kolon materyali üretimi yapılmaktadır. Bu amaçla, 1999 yılında ilk olarak Waters firması tarafından patenti alınan hibrit partikül teknolojisi ve 2005 yılında ise köprülü etil hibrid (BEH) teknolojisi geliştirilmiştir. Günümüzde bu teknoloji kullanılarak C18, C8, fenil ve amid fonksiyonel gruplarını içeren hibrit kolon dolgu materyalleri üretilmektedir. Böylece sert işlem koşullarında kolon performansı yüksek ve ömrü uzun olabilmektedir (Swartz 2005, Nguyen vd 2006, Cielecka-Piontek vd 2013).

Genel olarak değerlendirildiğinde UHPLC’nin temel avantajları; yüksek akış hızında çalışarak analiz süresinin kısalması, yüksek verimlilikte ayırım sağlanması,

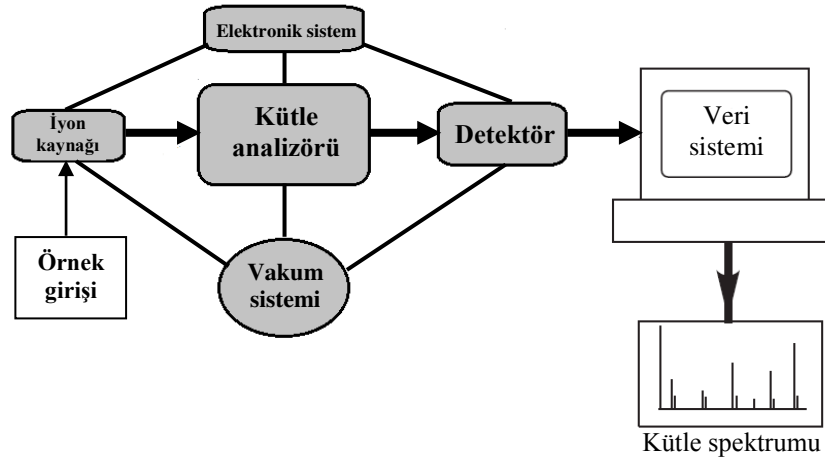
yüksek duyarlılık ve diğer analitik uygulamalara kıyasla daha az çözücü tüketilmesidir (Cielecka-Piontek vd 2013). UHPLC cihazı en altta pompa, pompanın üzerinde örnekleyici ve en üstte dedektör olmak üzere 3 temel kısımdan oluşmaktadır. Cihazın en üstünde analizde kullanılacak hareketli fazları içeren şişeler bulunmaktadır. Bu şişelerden belirli bir hat boyunca çözücü pompaya iletilmektedir. Burada analizde gradiyent elüsyon kullanılması durumunda hareketli fazlar karıştırılarak, hareketli faz bileşimi istenilen oranda hazırlanmakta ve pompa yardımıyla kolona iletilmektedir. Bu arada analiz edilecek örnek örnekleyicide vial içerisinden şırınga aracılığıyla enjeksiyon valfine bağlı olan örnek lupuna aktarılmaktadır. Buradan da hareketli fazın akıtılmasıyla örnek kolona taşınmaktadır. Kolondan geçen bileşikler kısa uzunlukta bir bağlantı yardımıyla dedektöre iletilmektedir. Yaygın olarak kullanılan dedektörler; ultraviyole/görünür ışık (UV/Vis), fotodiyot (PDA) ve refraktif indekstir (RI) (Anonymous 2010b).

2.4. Kütle Spektrometresi

Sıvı kromatografisi (LC), uçucu olmayan ve termal olarak kararsız bileşiklerin ayrılması için oldukça etkili bir ayırma yöntemidir. Ancak, LC dedektörlerinin tek başına kullanıldığında yeterince duyarlı ve seçici olamaması, bu kromatografi yönteminin kütle spektrometresi (MS) ile birleştirilmesini teşvik etmiştir (Blasco ve Picó 2007). Kütle spektrometresi, her bir bileşiğin ve atomun yüklü iyonlara (genellikle pozitif) dönüştürülerek moleküler kütlelerini belirleyen bir analiz tekniğidir. Çoğu zaman, molekülün yapısı da belirlenebilmektedir. Bu teknik, bir analit ile ilgili yüksek seçicilik ve hassasiyette kantitatif bilgi sağlanması açısından da eşsiz bir niteliğe sahiptir (Dass 2007). Bu yüzden, bu cihaz bilinmeyen bileşiklerin tanımlanmasında, bileşiklerin miktarının tespit edilmesinde ve bileşiklerin kimyasal ve yapısal özelliklerinin belirlenmesinde akademik alanda ve endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kütle spektrometresi, elektriksel veya manyetik alan veya bu ikisinin birleşimi kullanılarak vakum altında analitten iyonların oluşması, oluşan iyonların kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılması, analiz edilmesi ve bu değerlerin ölçülmesine dayalı olarak çalışmaktadır (Lavagnini vd 2006). Bu bağlamda, kütle spektrometresi iyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektör olmak üzere 3 temel kısımdan oluşmaktadır (Lavagnini vd 2006, Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009). Bazı iyon kaynakları dahil bu temel kısımların çalışması sırasında düşük basınç yani yüksek vakum ortamına gereksinim duyulduğu için cihazın pompa sistemine ihtiyacı vardır. Ayrıca, dedektör tarafından alınan sinyallerin kaydedilmesi için de bilgisayar tabanlı bir veri sistemi gerekmektedir. Bilgisayar, sinyallerin m/z değerlerine göre bağlı bolluğunu grafik halinde kütle spektrumu şeklinde göstermektedir (Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009).

Şekil 2.4’de kütle spektrometresinin temel kısımları belirtilmiştir. Temel kısımların yüksek vakum altında çalışması, oluşan iyonların başka bileşikler ile çarpışmasını veya etkileşime girmesini engelleyerek ortamda serbestçe hareket etmesini sağlamaktadır. Çarpışma, moleküler iyonların parçalanmasına ve ayrıca iyon-molekül etkileşimlerinden dolayı farklı türlerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Bunun sonucunda da duyarlılık azalmakta, ölçüm belirsizliği artmakta ve çözünürlük düşmektedir (Dass 2007).



Şekil 2.4. Kütle spektrometresinin genel kısımları

Kütle spektrometresinde ölçümler bileşiklerin nötral formunun aksine iyon hali ile yapılmaktadır. Çünkü, deneysel olarak iyonların hareketini ve yönünü değiştirmek rastgele ve amaçsızca hareket eden nötral bileşiklere göre daha kolaydır. İyonlara uygulanan elektrik ve manyetik kuvvetler sonucunda iyonların enerjileri ve hızları değiştirilip kontrol altında tutulabilmektedir. Bu durum, iyonların ayırımına ve tespit edilmesine yardımcı olmaktadır. İyonlaşma, analit moleküllerinin veya atomlarının yapısından bir elektron uzaklaştırılması veya yapısına bir proton ilave edilmesi sonucunda gaz-fazı iyonlarına dönüştürülmesi ile gerçekleşmektedir. Bu dönüşüm sırasında açığa çıkan enerji, molekülü belirli bağlardan kırarak karakteristik parçalarına (fragment) ayırmaktadır (Dass 2007).

2.4.1. İyonizasyon kaynakları

Analitler kütle spektrometresine gaz, sıvı veya katı halde girmektedir. Son iki durumda, iyonizasyon işlemi öncesinde veya sırasında analitler uçucu hale getirilmelidir. Analitlerden yüklü parçacıkların oluşturulması (iyonizasyon) çeşitli teknikler ile gerçekleşmektedir (Wang ve Turnipseed 2012). Kütle spektrometresi icat edildiği yıldan (1912) itibaren günümüze kadar sürekli bir değişim ve gelişim içerisinde olmuştur. Örneklerin iyonizasyon işlemi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi bu cihazın kullanım alanını da genişletmiştir. İlk olarak kullanılan iyonizasyon yöntemleri; alan desorpsiyonu (FD), plazma desorpsiyonu (PD), ikincil iyon kütle spektrometresi (SIMS), lazer desorpsiyonu (LD), hızlı atom bombardımanı (FAB) ve termosprey (TS) iyonlaştırmadır (Cooks 2010). Kullanılacak olan yöntem, ilgili analitin uçuculuk, molekül ağırlığı ve ısıya dayanıklılık gibi fiziko-kimyasal özelliklerine ve içinde bulunduğu matriksin yapısına bağlı olarak seçilmektedir (Lavagnini vd 2006).

Günümüzde ise en yaygın kullanılan teknikler; elektron iyonizasyon (elektron çarpması-EI), kimyasal iyonizasyon (CI), matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI) ve atmosferik basınç iyonizasyondur (elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI)) (Wang ve Turnipseed 2012). Bu yöntemler, iyonlaşma sırasında meydana gelen parçalanma derecesine bağlı olarak, sert (hard) ve yumuşak (soft) iyonizasyon teknikleri olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan EI ve CI teknikleri ilk grupta; ESI ve MALDI teknikleri ikinci grupta yer almaktadır (Niessen 2006). Sert iyonizasyon kaynakları gaz fazındaki ve düşük molekül ağırlığındaki (<1000 Da) örnekler için; yumuşak iyonizasyon kaynakları ise düşük uçuculuktaki ve yüksek molekül ağırlığındaki sıvı veya katı örnekler için kullanılmaktadır. Bu yüzden, EI ve CI teknikleri genellikle gaz kromatografisinde; ESI ve MALDI ise sıvı kromatografisinde kullanılmaktadır (Bush 2000). Ayrıca bu iyonizasyon kaynaklarından bazıları düşük basınç ortamında çalışırken (EI, CI, MALDI), bazıları (ESI, APCI) ise atmosferik basınçta çalışmaktadır (Dass 2007).

EI tekniğinde, gaz fazındaki örnek molekülleri düşük basınç altında (10^{-5} - 10^{-6} tor) tungsten veya renyum filamentinden yayılan yüksek enerjili elektronlar (70 eV) ile bombardımana uğramaktadır. Çarpışma sırasında hedef molekülün yapısından bir elektron koparak molekül pozitif iyon (moleküler iyon) haline dönüşmektedir. Eğer analit yüksek elektron affinitesine sahipse molekülün yapısına elektron eklenmesi sonucunda negatif iyonlar oluşmaktadır; ancak negatif iyondan yararlanılarak yapılan ölçümler sınırlıdır. İyonizasyon işleminin gerçekleşmesi için bombardıman yapılan elektronların kinetik enerjilerinin, molekülün iyonizasyon enerjisini aşması çok önemlidir. EI'nin yüksek vakum ortamında gerçekleşmesi moleküller arası çarpışmayı engellemektedir (Niessen 2006, Dass 2007, Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009). EI tekniğinin uygulanmasındaki en önemli sınırlama, elektron bombardımanı sırasında analit molekülüne kazandırılan fazla enerji ile molekülün hızlı bir şekilde parçalanması sonucunda moleküler iyonun kütle spektrumunda gözlenememesi veya düşük sinyal gücü (intensity) vermesinden dolayı diğer sinyallerden ayırt edilmemesidir. CI tekniği, molekülün parçalanmasını azaltmakta ve moleküler iyonların oluşumunu artırmaktadır. Bu açıdan, EI tekniğine göre daha yumuşak bir iyonizasyon tekniğidir (Bush 2000, Ardrey 2003,). Ancak EI tekniği ile kıyaslandığında hassasiyeti daha düşüktür (Li vd 2015). EI tekniğinde analit direkt olarak elektron ışınına maruz kalarak iyonlaşırken; CI tekniği 2 aşamada gerçekleşmektedir. Önce reaktif gaz molekülleri 200-500 eV elektron ışını ile iyonlaşmakta; daha sonra oluşan reaktif gaz iyonları çarpışma sırasında yükünü nötral analite aktarmaktadır (proton transferi). En yaygın kullanılan reaktif gazlar; metan, isobütan ve amonyaktır. Diğerlerine kıyasla daha düşük protein afinitesine sahip olduğu için içlerinde en yaygın kullanılan metan (CH_4) gazı iyonlaşarak CH_5^+ iyonlarını oluşturmaktadır ve bu iyonlar analit molekülleri ile reaksiyona girerek pozitif yüklerini analite geçirmektedir (Ardrey 2003, Dass 2007, Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009).

İyonizasyonun vakum ortamında gerçekleştiği iyonizasyon tekniklerinden farklı olarak atmosferik basınç ortamında meydana geldiği tekniklere genel olarak atmosferik basınç iyonizasyon (API) teknikleri denilmektedir. Bu kapsamda yer alan atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) ve elektrosprey iyonizasyon (ESI), özellikle sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi sistemi için kullanım alanı çok yaygın olan tekniklerdir. Bu tekniklerde, EI ve CI tekniklerine göre analit molekülünde daha az parçalanma gözlenmekte, moleküler iyon büyük oranda korunmakta ve böylece duyarlılık ve seçicilik artmaktadır (Li vd 2015). Özellikle karmaşık yapıları örneklerde yapılan eser miktardaki bileşiklerin analizinde bu durum çok önemlidir. CI tekniği ile aynı iyonlaşma ilkesine sahip olan atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) tekniğinin CI tekniğinden farkı, iyonlaşmanın atmosferik basınç ortamında

gerçekleşmesidir. Böylece örnek molekülleri ve reaktif iyonlar arasında daha fazla iyon-molekül etkileşimi gerçekleşerek iyonizasyon verimi ve tespit hassasiyeti önemli düzeyde artmaktadır (Dass 2007). Bu teknikte sıvı kromatografisinden gelen hareketli faz ve içerisindeki analit molekülleri, sıcak nebulizer probundan (350-500 °C) auxiliary gaz (N₂) eşliğinde geçerek çok ince partiküller (sprey) halinde dağılmaktadır. Ortamda analit partiküllerinden daha fazla miktarda bulunan hareketli faz partikülleri, korona deşarjı tarafından sağlanan elektron akışına maruz kalmada önceliğe sahiptir. İyon haline geçen hareketli faz partikülleri veya auxiliary gaz (N₂⁺ veya N₄⁺), analit partikülleri ile etkileşime girerek yüklerini (genellikle proton transferi) onlara aktarmaktadır. Böylece analit molekülleri iyon haline geçmektedir (Lavagnini vd 2006, Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009, Li vd 2015).

2.4.2. Elektrosprey iyonizasyon

1912 yılında icat edilen ve ticari olarak 1940lı yıllarda piyasaya sürülen kütle spektrometresi ile 1952 yılında icat edilen ve yağ asitleri, steroidler gibi ısıya dayanıklı bileşiklerin ayrımında kullanılan gaz kromatografisinin 1957 yılında birleştirilmesi, bu güçlü tekniğin biyokimya alanında kullanımına olan ilgiyi artırmıştır. Ancak iyonlaşma işleminde sert iyonizasyon tekniklerinin (EI ve CI) kullanılması proteinler, nükleik asitler ve kompleks karbonhidratlar gibi kompleks biyomoleküllerin yıkımı ile sonuçlanmıştır. Bu tekniğin uçucu bileşiklerin ayrılmasında kullanılması ve bu teknik ile proteinlerin yapısında önemli derecede yıkım ve parçalanma olmaksızın gaz fazına geçişini sağlamanın mümkün olmamasından dolayı yumuşak iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesi ön plana çıkmıştır. Yumuşak iyonizasyon, iyonizasyon işlemi sırasında analite minimum düzeyde iç enerjinin aktarıldığını ve parçalanmanın düşük olduğunu ifade etmektedir (El-Aneed vd 2009). ESI tekniği 1968 yılında Malcom Dole ve çalışma arkadaşları tarafından keşfedildikten sonra, 1984 yılında Masarmichi Yamashita ve John Fenn tarafından da kütle spektrometresi ile birleştirilmiştir (Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009). John Fenn'in biyolojik makromoleküllerin kütle spektrometresinde analizi için ESI tekniğini geliştirmesinden dolayı 2002 yılında kimya alanında Nobel ödülü alması, bu tekniğin biyokimya, biyomedikal ve farmakolojik araştırma alanlarında kullanımının önemini artırmıştır (Kearle ve Verkerk 2010). Zamanla LC-MS sistemlerinde kullanılan en önemli arayüz parçası olmuştur. APCI tekniği gibi atmosferik basınç altında gerçekleşen ESI, APCI tekniğinin aksine, yüksek molekül ağırlıklı, ısıya duyarlı ve polar bileşiklerin iyonizasyonu için kullanılmaktadır. (Blasco ve Picó 2007).

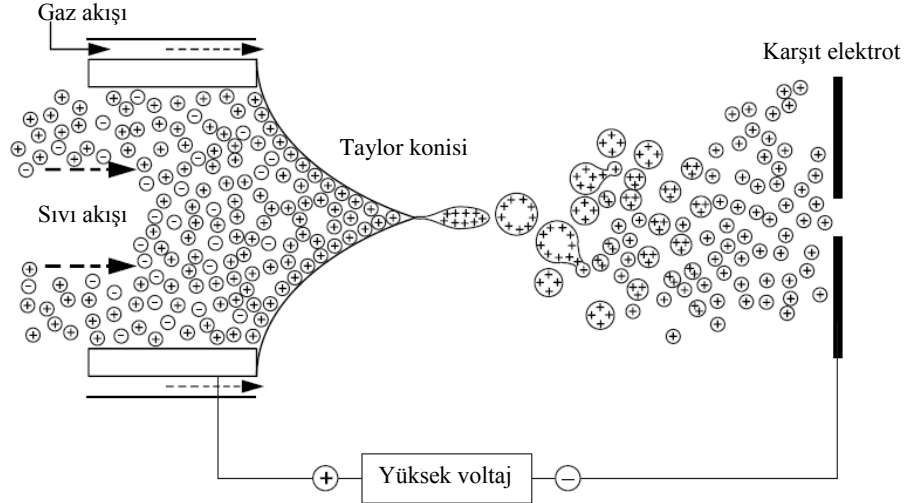
ESI tekniği temel olarak 2 elektrot sisteminden oluşmaktadır. Elektrotlardan biri, çözelti ile temas halinde olan metal kapiler tüptür ve elektrospreyin yüklü damlacıkların oluştuğu kısımda yer almaktadır. Bu elektrot, yayıcı (emitter) elektrot olarak adlandırılmakta ve analitik açıdan reaksiyonlar bu elektrotta meydana gelmektedir. İkinci elektrot veya karşıt (counter) elektrot ise, kütle spektrometresinin bir parçası olan örneklem konisi veya örneğin analizöre geçişini sağlayan giriş kapiler aparatlarından biridir (Berkel ve Kertesz 2007). ESI tekniğinin prensibi, atmosferik basınçta sürekli akış halinde olan ve analit moleküllerini içeren uçucu polar çözünün, paslanmaz çelik kapiler tüpten (yayıcı elektrot) geçerken, bu tüpün uç kısmına yüksek elektrik voltajı (3-5 kV) uygulanması sonucunda kapiler tüpün ucu ile analizörün girişi (karşıt elektrot) arasında oluşan elektriksel alanda yüklü damlacıklar halinde dağılmasına dayanmaktadır

(Ho vd 2003, Berkel ve Kertesz 2007, Dass 2007). Uygulanan bu teknikte, analit fragmentlerine çok az düzeyde ayrılmakta veya hiç ayrılmamaktadır. Kapiler tüpün dış yüzeyinden, sıvı ile aynı eksen doğrultusunda akan sheath gaz (kuru N₂) sprey oluşumunu daha iyi hale getirmektedir. Bu gaz, aynı zamanda kapilerin ucundan gelen yüklü partiküllerin analizörün girişine ulaşmasına yardımcı olmaktadır (Banarjee ve Mazumdar 2012).

ESI kullanılarak moleküllerin çözeltiden gaz fazına geçişi 3 aşamada gerçekleşmektedir: (1) yüklü damlacıkların ince partiküller halinde dağılması (2) çözücünün buharlaştırılması (3) yük oranı yüksek damlacıklardan iyonların açığa çıkması (Ho vd 2003, Lavagnini vd 2006, Kebarle ve Verkerk 2010). İlk aşama kapsamında, kapiler tüpün içinden geçerken sıvının yapısında burada oluşan potansiyel farktan dolayı değişimler gözlenmektedir. İletken sıvı kuvvetli elektriksel alana maruz kaldığında, bu sıvının yapısındaki yükler Coulomb yasasına bağlı olarak ayrılmaktadır. Elektroforetik hareket, ayrılan katyonları (pozitif modda) elektriksel alanın en kuvvetli olduğu noktaya (kapilerin uç yüzeyi) doğru iletirken, anyonları ise iki elektrotu birbirine bağlayan ve bunlara elektrik potansiyeli sağlayan metal tel üzerinden yüzeyden uzaklaştırmaktadır. Bu yük ayrımı sıvıda yeni bir kuvvetin oluşmasına neden olmakta ve sıvının yüzey gerilimi bu kuvveti etkisiz hale getiremediği zaman sıvı kapilerin ucunda konik bir yapı halini almaktadır. Bu yapıya Taylor konisi denilmektedir. Sisteme uygulanan yüksek elektrik voltajı sonucunda oluşan elektriksel kuvvetler yüzey gerilimini yenerek sıvının, koninin tepe noktasından damlacıklar halinde ayrılmasını sağlamaktadır (Bökman 2002, Kebarle ve Verkerk 2010).

İkinci aşamada, elektrosprey ucun çıkışında oluşan yüklü damlacıklar ortamdaki potansiyel değişimden dolayı sheath gaz akışının yardımıyla kütle spektrometresinin analizör girişine (karşıt elektrot) doğru sürüklenmektedir. Bu sırada, damlacıklara sıcak azot gazı (auxiliary gaz) uygulanmasıyla çözücü buharlaşmakta ve yüklü damlacıkların boyutu azalmakta ancak yük miktarı sabit kalmaktadır. Damlacık boyutunun azalması, yüzeydeki yük yoğunluğunu ve dolayısıyla yüklerin elektrostatik itme gücünü artırmaktadır. Sonuç olarak, belirli bir noktada (Rayleigh limit) damlacıklar stabil olmayan bir hal almakta ve Coulombik kuvvetler yüzey gerilimini aşarak damlacıkların bölünmesine (fizyon) neden olmaktadır. Üçüncü aşamada, devam eden çözücü evaporasyonu ile birlikte damlacık boyutu oldukça küçülmekte ve sürekli parçalanma sonucunda damlacıkların yapısındaki analit iyonları gaz fazında açığa çıkmaktadır (Bökman 2002, Kebarle ve Verkerk 2010). Şekil 2.5’de ESI sisteminde iyonların oluşumu belirtilmiştir (Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009).

ESI sistemlerinde iyonizasyon, analitin ve cihazın özelliklerine bağlı olarak birçok parametreden etkilenmektedir. Bu parametrelerden bir tanesi, asidik özellikteki analitler için pK_a veya bazik özellikteki analitler için pK_b değeridir. Bu değerler analitin proton (H atomu) alarak veya vererek yük kazanacağını ve buna bağlı olarak iyonizasyon modunun pozitif veya negatif olacağını belirlemek açısından önemlidir (Kebarle ve Verkerk 2010).

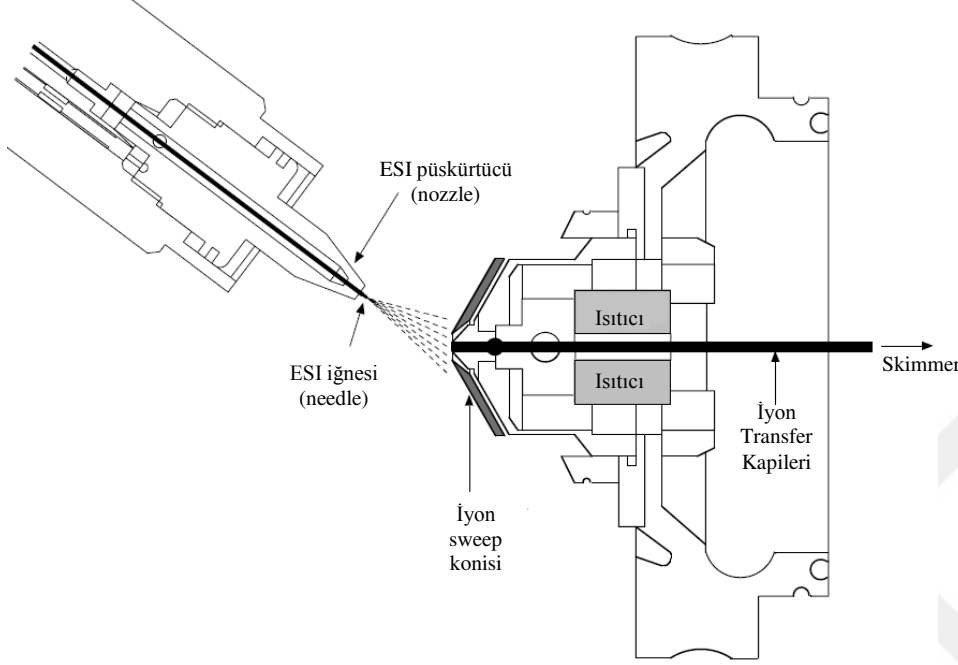


Şekil 2.5. ESI’de iyon oluşumu

ESI sisteminin en iyi şekilde çalışması açısından çözücü bileşimi ve akış hızı iki önemli değişkendir. Akış hızı, ESI sırasında oluşan damlacıkların hem boyutunu hem de boyut dağılımını belirlemektedir. Genel olarak ESI kaynağı 1-10 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında çalışmaktadır. Sprey, daha yüksek akış hızlarında büyük boyutta damlacıklar oluşturarak elektriksel akımda soruna yol açtığı için işlem stabil olmamaktadır. Çözücü bileşimi, sıvıların yüzey gerilimi açısından önemlidir. Saf su gibi yüksek yüzey gerilimine sahip sıvıların elektrosprey işlemi metanol, etanol, izopropanol ve asetonitril gibi çözücülere kıyasla daha zor gerçekleşmektedir (Dass 2007). Ancak gradient sistemlerde saf su hareketli faz bileşiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, yüzey gerilimi yüksek sıvılara elektrosprey ile iyonlaşması için daha yüksek kapiler voltajı uygulanmaktadır. Örneğin, metanolün iyonlaşması için gerekli olan kapiler voltajı 2.2 kV iken, suyun iyonlaşması için gerekli olan voltaj 4 kV’tur (Kearle ve Verkerk 2010).

Auxiliary gazın ve kapiler tüpün sıcaklık değerleri iyonlaşma üzerine etkilidir. Auxiliary gazın sıcaklığı, ESI probunun ucunda oluşan damlacıkların analizöre gidiş yolunda çözücünün buharlaşarak uzaklaşması açısından önemlidir (Janusson vd 2015). Damlacıklardan açığa çıkan yüklü iyonlar, kütle spektrometresinin örnekleme konisi girişindeki ısıtılmış kapiler tüpten geçerek analizöre girmektedir. Dış yüzeyini çevreleyen 2 kartuş ısıtıcı tarafından ısıtılan kapiler tüp (genellikle 0.2 mm iç çaplı, 60-100 mm uzunlukta, 100-400 $^{\circ}\text{C}$ ’ye ısıtılabilen), atmosferik basınç ile yüksek vakum ortamları arasında bulunmaktadır. Kapiler, iyonların buradan geçerken tamamen gaz fazına geçişini sağlamaktadır (Banarjee ve Mazumdar 2012). Ayrıca auxiliary ve sheath gaz akış hızları da iyonlaşma işlemine etkilidir (Janusson vd 2015). ESI işlemi sonucunda, analitin iyonları ile birlikte nötral formları da sprey içerisinde mevcuttur. Nötral moleküllerin, iyonlar ile analizöre girmemesi için sprey kapilerinin yönünün, kütle spektrometresinin girişi ile aynı eksen doğrultusunda olmaması gerekmektedir. Genellikle gaz fazına geçen küçük damlacıklar spreyin dış bölgesinde daha yoğun olduğu için ESI probunun, analizör girişinden çok az eksen dışı olacak şekilde konumlandırılması iyonların nötral formlarına göre daha çok analizöre girmesini sağlamaktadır (Cech ve Enke 2001). İyonlaşmayı etkileyen diğer bir faktör analit

konsantrasyonudur. Damlacık yüzey alanına paralel olarak yüzeydeki iyon miktarı da sınırlı olmaktadır. Analit konsantrasyonunun yüksek olduğu durumda, damlacık yüzeyi tamamen analit iyonları ile dolduğu zaman fazla iyonlar damlacıkların iç kısmında sıkışmaktadır (Bökman 2002).



Şekil 2.6. Ion Max yapısı (Manisalı vd 2006)

2.4.3. Analizörler

Kütle analizörleri, iyonları kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırmakta ve ayrılan iyonları tek bir odak noktasında toplamaktadır. Bu kısımda, iyonların hareketleri manyetik ve/veya elektriksel alan ile gerçekleşmektedir. Bu alanda hareketli yüklü bir parçacık sahip olduğu momentuma (kütle.hız) ve kinetik enerjiye bağlı olarak diğer bir yüklü parçacıktan ayrılmaktadır. Bu temel özelliklere dayanarak çalışan manyetik sektör, kuadropol (Q), kuadropol iyon tuzağı (QIT), uçuş zamanlı (TOF), orbitrap ve iyon siklotron rezonans (ICR) analizörleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kütle analizörlerinin çalışma performansı; kütle aralığı (analiz edilebilen en yüksek m/z değeri), çözünürlük (komşu iki iyonu ayırabilme yeteneği), verim (tek bir iyonizasyon işleminde oluşan ilgili iyonların oranı), doğruluk (ölçülen kütle değeri ile tam kütle değeri arasındaki fark), dinamik aralık (ölçülebilen en yüksek sinyal değerinin en düşük sinyal değerine oranı), hız (birim zamanda elde edilen spektrumların sayısı) ve hassasiyet (analitin belirli bir güven aralığında tespit edilebilen en düşük miktarı) gibi özellikler baz alınarak değerlendirilmektedir (Dass 2007, Hart-Smith ve Blanksby 2012).

Antibiyotik kalıntı analizinde genellikle kuadropol, kuadropol iyon tuzağı, uçuş zamanlı ve orbitrap analizörleri kullanılmaktadır. Her sistem antibiyotik kalıntı analiz uygulamaları açısından kendine özgü tasarımı, işlevi ve performansı bakımından avantajlara ve dezavantajlara sahiptir. Kuadropol ve kuadropol iyon tuzağı sistemleri,

genellikle pik yüksekliğinin yarısındaki pik genişliği (FWHM) 0.7 akb (Da) değerinde olmasından dolayı düşük çözünürlüklü kütle analizörleri iken; uçuş zamanlı ve orbitrap analizörleri orta-yüksek çözünürlüklü olup aralarında birkaç milidaltan (mDa) kütle farkı bulunan iyonları ayırabilme yeteneğine sahiptir. Böylece bu analizörler ile doğru kütle ölçümleri yapılabilir (Wang ve Turnipseed 2012).

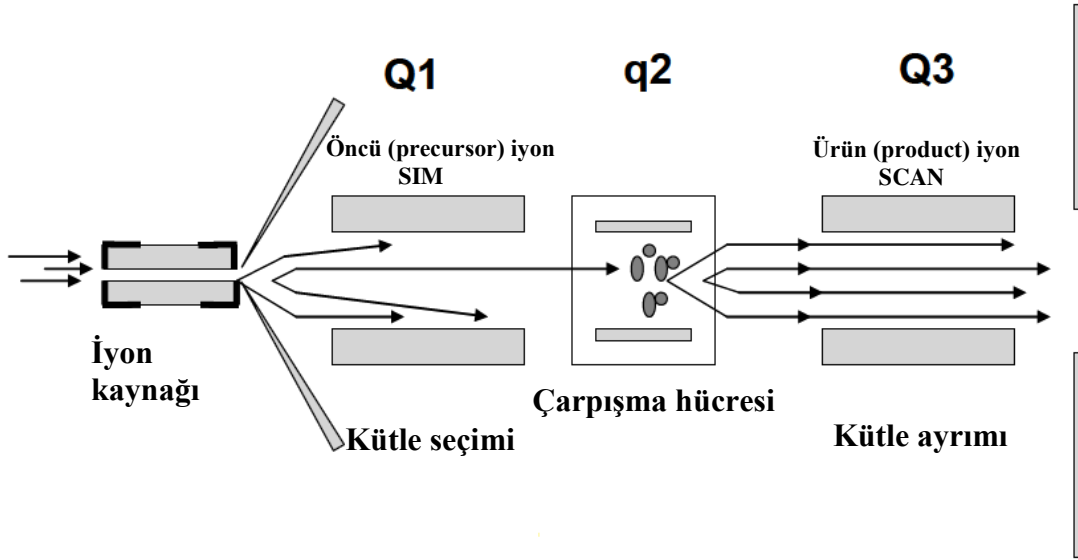
Kuadrupol, laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan bir analizördür. Bu analizör, sadece kütle analizörü olarak kullanılmamakta; sık sık iyon transfer optiği ve çarpışma hücresi (collision cell) olarak da kullanılmaktadır. Tekli kuadrupol, birbirine paralel 4 metal çubuk elektrottan oluşmaktadır. Zıt yüklü her bir metal çubuk çifti birbiriyle elektriksel olarak bağlıdır ve bir çift çubuk ile diğeri arasında radyo frekansı (RF) voltajı uygulanmaktadır. RF voltajına ilave olarak doğru akım (DC) voltajı da uygulanarak iyonların çubuklar arasından geçmesi sağlanmaktadır. Belirli voltaj oranlarında (DC/RF) sadece istenilen m/z değerindeki iyonlar detektöre ulaşmaktadır. Kütle ayrımı, elektrotlara uygulanan DC ve RF potansiyellerinin oluşturduğu yüksek frekanslı elektriksel alanda iyonların sabit titreşim hareketi ile sağlanmaktadır. Diğer iyonlar kararsız yörüngelerinden dolayı çubuklar ile çarpışmakta ve detektöre ulaşmamaktadır (Blasco ve Picó 2007, Dass 2007, Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009).

Kuadrupol iyon tuzağı (Paul tuzağı), kuadrupol analizörü ile aynı prensipte çalışmaktadır; aralarında geometrik şekil açısından fark vardır. Bu sistem, merkezde halka şeklinde metal bir elektrot ve bu elektrodun her iki tarafını kapatan hiperbolik iki elektrottan oluşan üç boyutlu bir yapıdır. Bu şekilde iyonların hapsediği bir alan yaratılmıştır. İyon hareketleri kuadrupol analizöründe olduğu gibi DC ve RF potansiyelleri ile sağlanmaktadır. DC potansiyelindeki artış ile birlikte istenilen m/z'ye sahip iyonlar, diğer iyonların tuzaktan ayrılması sonucunda onlardan ayrılmaktadır. Tuzağın içerisine iyonların soğuması için yaklaşık 10^{-3} tor basınçta helyum (He) gazı gönderilmektedir. Aynı zamanda bu gaz iyonları tuzağın merkezinde tutmaktadır. Daha sonra RF potansiyelindeki artış ile birlikte de tuzağın içinde kalan iyonlar çıkarılmakta ve detektöre iletilmektedir (Dass 2007, Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009).

Tekli sistemler genel olarak EI ile çalışan GC-MS cihazlarının bir parçası olmuştur. Bunun nedeni, EI ile hedef molekülün yüksek enerjili elektronlar ile çarpışarak birçok fragmente ayrılmasıdır. Böylece analizörde istenilen kütledeki fragment ilave bir ayırma işlemine gerek kalmadan analiz edilebilmektedir. Bu analizör LC sistemi ile birlikte de kullanılabilir. Ancak ESI veya APCI işlemlerinde iyonlar fragmentlere ayrılmadan moleküllerin proton kazanması veya kaybetmesi ile oluştuğundan dolayı tekli sistemler ile yapılan taramalarda molekül yapısı ile ilgili çok az bilgiye ulaşılmaktadır. Kuadrupol sistemler çözünürlük, seçicilik ve kütle doğruluğu açısından yetersiz olduğu için günümüzde tekli analizörün yerine tandem (MS/MS) veya yüksek çözünürlüklü (HR) kütle spektrometreleri kullanılmaktadır. Çünkü karmaşık yapıli matrikslerle yapılan analizlerde ilgili analitin doğru ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesi önemlidir (Blasco ve Picó 2007, Wang ve Turnipseed 2012).

Üçlü kuadrupol (QqQ) sistemi 1978 yılında geliştirilmiştir ve günümüzde laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemde ardarda 3 tane kuadrupol analizörü bulunmaktadır. Bunlardan ilki (Q1) ve sonuncusu (Q3) kütle filtresi olarak

kullanılmakta; ikinci kuadrupolde ise m/z seçimi veya taraması yapılmamaktadır. İkinci kuadrupolde, ilk kuadrupolde seçilen öncü iyonun fragmentlere ayrılması gerçekleşmektedir. Bu amaçla hücreye azot (N_2) veya argon (Ar) nötr gazları doldurulmaktadır. İlk ve sonuncu kuadrupollere DC ve RF uygulanırken; ortadaki kuadrupole sadece RF uygulanarak burada oluşan tüm iyonların diğer kuadrupole geçişi sağlanmaktadır. İlk kuadrupolde istenilen m/z değerindeki öncü (precursor) iyon seçilerek ikinci kuadrupole geçmekte; buradaki gaz ile çarpışan iyonlar fragmentlerine ayrılmakta ve bu fragmentlerin hepsi üçüncü kuadrupole aktarılmaktadır. Her öncü iyonun ürün iyonlarına parçalanma enerjisi ana iyonun kimyasal yapısının farklı olmasından dolayı aynı değildir. Bu yüzden ikinci kuadrupolde çarpışma enerjisi değerinin öncü iyonlara göre optimize edilmesi önemlidir. Üçüncü kuadrupolde öncü iyona özgü oluşan ürün (product) iyonların taraması yapıp bu iyonlar seçildikten sonra detektöre aktarılmaktadır (Blasco ve Picó 2007, Dass 2007, Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009, Wang ve Turnipseed 2012).



Şekil 2.7. Üçlü kuadrupol sistemi (Blasco ve Picó 2007)

Kuadrupol kütle analizörü kantitatif analizlerde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bu uygulamada her bir bileşik için uygun öncü/ürün iyonları seçilerek ve çarpışma etkili ayrışmada (CID) kullanılan çarpışma enerji değerleri belirlenerek cihaz parametrelerinin analizden önce optimize edilmesi gerekmektedir. Bu yüzden, bu aşamalar metot geliştirme uygulamalarında zaman kaybına neden olmaktadır. Ancak yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrelerinde yapılan analizlerde ilgili parametrelerin optimizasyonu yapılmadan tam tarama gerçekleştirilebildiğinden dolayı her bir bileşik için optimizasyon ihtiyacı ortadan kalkmaktadır (Bateman vd 2009).

2.4.4. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HRMS)

Bir bileşiğin kütlesinin belirlenmesinde kesinliğin iyi ve doğruluğun yüksek olması için bazı faktörlerin optimize edilmesi önemlidir. Bu faktörler, pik şekli, iyon bolluğu, çözünürlük ve kalibrasyondur. Doğru kütle ölçümleri için m/z skalasında pik şeklinin merkezi baz alınarak düzgün ve simetrik olması önemlidir. Pik şeklini etkileyen faktörlerden bir tanesi iyon bolluğudur. Sinyalin çok yoğun olması dedektör ölçümünün

baskılanmasına; yeterli seviyede olmaması ise pik şeklinin kötü olmasına neden olmaktadır. HRMS ile yapılan ölçümlerde daha dar pik şekilleri elde edilebilmekte ve bu da belirsizliği azaltmaktadır. Kalibrasyon ise, kütle tayininde doğruluğun iyi ve ölçümün güvenilir olması açısından önemlidir (Ojanperä vd 2012).

Kütle spektrometresi ile yapılan analizlerde cihazın analiz performansı açısından göz önünde bulundurulması gereken en önemli özelliklerinden bir tanesi çözünürlüktür. Çözünürlük değeri, analizörün (kütle filtresi) birbirine yakın kütleleri ayırabilme yeteneğidir. Buna bağlı olarak, çözünürlüğün artması bileşiklerin kimyasal yapısı ile ilgili bilgilerin açığa çıkmasını sağlamaktadır. Çözünürlük değeri 1000-10000 arasında nominal kütleleri farklı iki pikin ayrımı (örneğin; 325 Da ile 326 Da), 10000-100000 arasında aynı nominal kütleyle sahip fakat yapısındaki bir aminoasit ile birbirinden ayrılan küçük kütleli (<2500 Da) peptitlerin ayrımı (örneğin; lösin ve izolösin); 100000 ve üzerinde ise aynı nominal kütleyle sahip fakat elementel bileşimi farklı moleküllerin (örneğin; N₂ ve CO, 28 Da) ayrımı yapılabilmektedir (Marshall ve Hendrickson 2008). Her elementin her bir izotopu kendine has tam kütleyle sahiptir. Bir iyonun tam kütlesi (4-6 ondalık noktası), onun elementel ve izotopik bileşimini güvenilir bir şekilde tanımlamaktadır. Bir bileşiğin tam molekül kütlesi elementel bileşiminde yer alan iyon veya moleküllerin atomik kütlelerinin toplamından oluşmaktadır. Atomik kütle ise, her bir atom için doğada en yaygın bulunan izotopunun kütlesi baz alınarak hesaplanmaktadır. Bir bileşiğin tam kütle (4-6 ondalık noktası) değerinin doğru bir şekilde belirlenebilmesi için yüksek çözünürlüklü kütle analizörlerinin kullanılması gerekmektedir (Lebedev 2009).

HRMS'nin, çok küçük kütle farklılıklarını algılayarak yüksek ayırma kapasitesine sahip olması, kromatografik ayırım ihtiyacını düşürmesi ve metabolitlerin tekli kütle analizörü ile geniş kapsamda miktarını belirlemesi bu cihazın kullanımının yaygınlaşmasını sağlamıştır. Günümüzde en yaygın kullanılan yüksek çözünürlüklü kütle analizörleri, uçuş zamanlı (TOF), iyon siklotron rezonans (ICR) ve orbitrap analizörleridir. Uçuş zamanlı kütle spektrometresinde iyonların kütlelerine bağlı olarak sahip oldukları hızlara göre ayırım yapılmaktadır. Bu analizörde iyonlar kısa süreli pulslarla (örneğin, elektron veya lazer) oluşmakta ve belirli bir potansiyelde uygulanan elektrik pulslarıyla hızlandırılarak uçuş tüpünün girişine iletilmektedir. Uygulanan potansiyel ile hızlanan iyonlar tüpün girişinde aynı miktarda kinetik enerjiye sahiptir. Aynı kinetik enerjiye sahip farklı m/z değerindeki iyonlar elektrik alanı bulunmayan 1-2 m uzunluğundaki uçuş tüpünde hızlarındaki farklılıktan dolayı detektöre farklı sürelerde ulaşmaktadır. Düşük kütleli iyonlar daha hızlı olduğu için detektöre daha önce ulaşmaktadır (Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009, Wang ve Turnipseed 2012). Analizörün yapısında yer alan reflektör (elektrostatik ayna) iyon yolunu uzatarak kütlelerin daha iyi ayrılmasına olanak sağlamaktadır. Bu analizör, kuadropol gibi sırayla tek bir iyon üzerinden ölçüm yapmaya odaklanan analizöre kıyasla oldukça hızlı ve hassas bir şekilde birçok kütleli aynı anda ölçebilmektedir (Marshall ve Hendrickson 2008).

İyon siklotron rezonans ve orbitrap analizörleri, az sayıda iyon varlığında bile yüksek kütle çözünürlüğü ve doğruluğu açısından rutin olarak yapılan analizlerde yaygın olarak kullanılan diğer kütle spektrometrelerinden daha üstündür. Bu iki kütle spektrometresinin, görüntü akımı algılama sistemi ve görüntü akımı tarafından üretilen

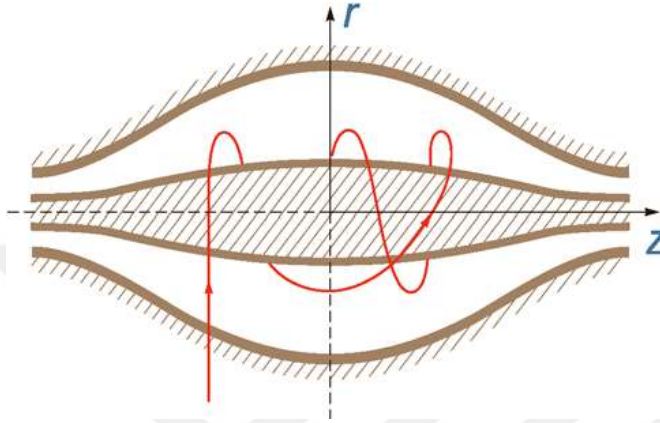
zamana bağlı anlık kütle spektrumlarının oluşumunda kullanılan Fourier dönüşüm matematiksel işlemlerinin kullanılması gibi belirli ortak özellikleri vardır. Fourier dönüşümü ile zamana bağlı sinyal, frekansa bağlı sinyale yani kütle spektrumuna dönüştürülmektedir. Fourier dönüşüm kütle spektrometrelerinde kütleler frekans olarak temsil edilmektedir. Burada, görüntü akımı elektrotlar üzerine düşmekte, dijital hale dönüştürülmekte ve kaydedilmektedir (Scigelova vd 2011). Genel olarak, iyon siklotron rezonans analizörünün ayırma gücü ve kütle doğruluğu orbitrap analizöründen daha iyi olmasına rağmen, orbitrap analizörünün ICR analizörüne kıyasla avantajları vardır. Orbitrap analizörünün çalışması için süperiletken mıknatıslara gereksinim duyulmadığından, bu analizörün hem maliyetinin daha düşük olması hem de laboratuvarında daha az yer kaplaması en önemli avantajlarıdır. Bu etkenler orbitrap analizörünün rutin analizlerde daha çok tercih edilmesini sağlamaktadır (Hart-Smith ve Blanksby 2012).

2.4.4.1. Orbitrap analizörü

K.H. Kingdon, 1923 yılında merkez elektrodun etrafında belirli bir yörüngede dönerek iyonları yakalayan bir yöntem geliştirmiştir. Fakat, bu düzenek uzun yıllar kütle spektrometresi olarak değil, iyon yakalama cihazı olarak kullanılmıştır. Bu cihazda iyonların yakalanması için manyetik veya dinamik (RF) elektrik alanların yerine elektrostatik alandan yararlanılmıştır. Düzenek, merkezde (içte) ince tel elektrot, dışta merkez ile eş eksenli elektriksel olarak izole edilmiş silindirik elektrot ve iki uçta uçları kapatan iki tane elektrottan oluşmaktadır. İç ve dış elektrotlara uygulanan DC voltajı ile iki elektrot arasında radyal logaritmik bir potansiyel oluşmakta ve iyonlar tel elektrodun etrafında belirli bir yörüngede dönmektedir. Uç elektrotlara uygulanan potansiyel ile de iyonlar eksensel olarak hareket etmekte ve tuzak içerisinde tutulmaktadır. 1981 yılında ise R.D. Knigh, Kingdon tuzağındaki dış elektrodun şeklini değiştirerek radyal logaritmik ifadeye ek olarak eksensel kuadropol terimini üretmiştir. İç ve dış elektrotlar arasındaki logaritmik potansiyel Kingdon tuzağında olduğu gibi iyonların radyal yönde orbital olarak yakalanmasını sağlarken, kuadropolar potansiyel ise iyonların z yönünde harmonik salınım hareketi yaparak düzlemsel olarak hapsedilmesini sağlamaktadır. Orbitrap kütle analizörü ise 2000 yılında Alexander Makarov tarafından Knigh tarzı Kingdon tuzağından esinlenilerek tasarlanmış ve 2005 yılında ticari olarak piyasaya sunulmuştur (Hu vd 2005, Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009). Günümüzde ise kütle spektrometresi alanında çok önemli bir yere sahiptir. Bu analizörün analitik performansı, cihazın rutin bileşik tanımlamasından karmaşık yapıdaki matrislerde eser miktarda bileşen analizine kadar geniş uygulama alanında kullanılmasına olanak vermektedir (Makarov ve Scigelova 2010).

Orbitrap, temeli iyon sapması (elektrikli/manyetik sektör), iyon kararlılığı (kuadropol, kuadropol iyon tuzağı) veya uçuş süresi (TOF) ölçümlerine dayanan analizörlerden farklı olarak iyon frekansına göre analiz yapan bir kütle analizörüdür (Marshall ve Hendrickson 2008). Frekans, genlikten ve iyon enerjisinden bağımsız olduğu için kütle analizinde iyonlar sadece m/z değerine göre ayrılmaktadır. Orbitrap, bir iyon tuzağı analizörüdür. Kuadropol iyon tuzağında iyonlar dinamik elektriksel alanda RF ile tuzakta tutulurken, orbitrap analizöründe iyonları tutmak için ne RF ne de mıknatıs kullanılmaktadır. Orbitrap, hareketli iyonları sabit elektriksel alanda (elektrostatik) kuadro-logaritmik potansiyel ile merkez elektrodun etrafında belirli bir

yörüngede tutmaktadır (Hu vd 2005, Marshall ve Hendrickson 2008). Orbitrap analizörünün çalışma prensibi, Knigh tarzı Kingdon tuzağı ile aynı olup aralarında elektrot şekilleri açısından şekilsel olarak fark bulunmaktadır. Bu analizör, çan şeklinde bir çift dış elektrot tarafından çevrelenen iç şeklinde merkez elektrottan oluşmaktadır. İyonlar, merkez elektrot etrafında r yönünde (radyal ve açısıl) orbital hareket ederken aynı zamanda z yönünde (eksensel) sürekli olarak salınım yapmaktadır (Şekil 2.8). Ancak elektrotların kendine özgü şekli, radyal ve eksensel iyon hareketlerinin birbirinden bağımsız olmasını sağlamaktadır (Hu vd 2005, Perry vd 2008).



Şekil 2.8. Orbitrap iyon hareket yönleri

İyonların r yönündeki hareketi iyon kütlelerinden bağımsız olarak iyonların kinetik enerjisinden ve dış ve iç elektrotlar arasındaki elektriksel alan kuvvetinden (2.1) kaynaklanmaktadır; z yönündeki hareketi ise, r yönündeki hareketinden tamamen bağımsız olup, elektrotlar arasındaki sabit potansiyelde iyonların sadece m/z değerine (2.2) göre gerçekleşmektedir. İyonların radyal ve eksensel hareketi belirli sayıda döngüden sonra ince halka şeklini almaktadır. İlk denklemde; r elektrostatik analizörün yarıçapını, qV iyon kinetik enerjisini ve qE de iyonun elektriksel alanda maruz kaldığı kuvveti ifade etmektedir. İkinci denklemde; m/z iyonun kütle/yük oranını ve k eksensel kuvveti ifade etmektedir. k değeri, elektrotların şekline ve uygulanan potansiyele bağlı olarak belirlenmektedir (Hu vd 2005, Perry vd 2008).

$$r = \frac{2qV}{qE} \quad (2.1)$$

$$\omega = \sqrt{\left(\frac{z}{m}\right) \cdot k} \quad (2.2)$$

Orbitrap kütle analizörü ile güvenilir kütle ölçümleri yapılarak 1 ppm değerinin altında kütle sapması elde edilebilmektedir. Bu özelliği küçük yapıli moleküllerin analizinde önemli ölçüde yararlı olmaktadır. Yüksek çözünürlükte sinyal gürültüden iyi bir şekilde ayrılacağı için (S/N>2-3) iyonun tam kütle değeri belirlenebilmektedir. Bir bileşiğin kütlelerinin yüksek doğrulukta ölçümü, diğer olasılıkların elenmesini sağlayarak elementel bileşiminin kolayca belirlenmesi açısından önemlidir. Ancak, moleköl yapısındaki elementlerin sayısının veya bileşiğin moleköl kütlelerinin arttığı durumlarda

doğru kütle ölçümü onun elementel yapısının belirlenmesinde yeterli olmamaktadır. Bu değere ilaveten, molekül yapısının belirlenmesine izotop piklerin yoğunluğu önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Çözünürlük değerinin yüksek olması kütle doğruluğunun güvenilirliği açısından çok önemlidir. Buna ilaveten, kütle toleransının çok geniş tutulması girişim unsurlarının ilgili bileşiğin pik alanına dahil olmasından dolayı doğru kütle ölçümlerinde hataya ve ayrıca yanlış pozitif sonuçların elde edilmesine; çok dar tutulması da bileşiğin kütle değerinde hatalara ve buna bağlı olarak da yanlış negatif sonuçlara neden olmaktadır (Scigelova ve Makarov 2009).

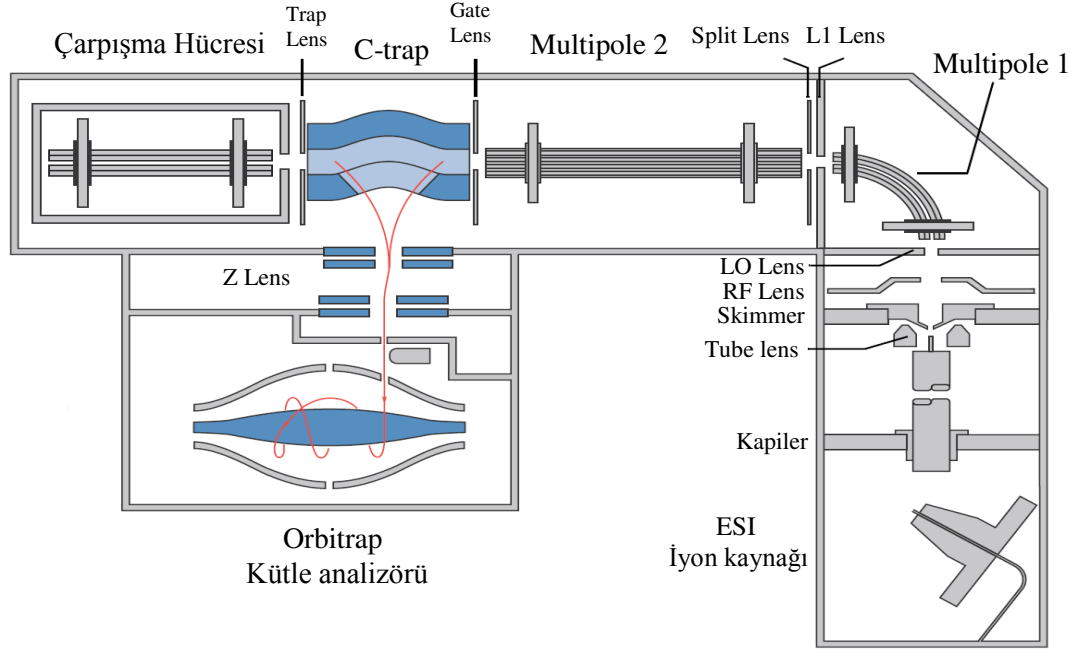
ESI işlemi ile oluşan iyonlar, atmosfer basıncındaki ortamda iyon transfer kapilerine girmekte ve basıncın gradient olarak azaldığı, yüksek vakum altında tutulan iyon optikleri ile yüksek vakum altında bulunan analizöre iletilmektedir (Anonymous 2009a). Gaz fazındaki iyonlar oldukça reaktif ve genelde kısa ömürlü olduklarından dolayı, iyonlar oluştuktan sonra detektöre iletilene kadar yüksek vakum altında olmalıdır. Ayrıca yüksek vakum iyonların birbiriyle çarpışmasını engellemektedir. Bu yüzden; iyon optikleri, analizör ve detektör de vakum altında tutulmalıdır. Kütle spektrometresinin bu kısımlarında yüksek vakum sağlamak amacıyla genel olarak difüzyon pompası veya turbomoleküler pompalardan (TMP) yararlanılmaktadır (Banarjee ve Mazumdar 2012).

İyon optikleri; iyon kaynağı ve analizör iyon optikleri olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.9). İyon kaynağı optikleri; tube lensleri, skimmer, RF lensleri ve LO lenslerinden oluşmaktadır. Kapilerden geçen iyonlar, kütlelerine bağlı olarak tube lensler tarafından uygulanan potansiyel (tube lens voltajı) ile skimmerin girişine doğru yönlendirilmektedir. Skimmer, iyon source bölgesi (yüksek basınç) ile RF lens bölgesi (düşük basınç) arasında vakum ayarlayıcı (baffle) olarak çalışmaktadır. Kapiler tüpün çıkışı, direkt olarak skimmerin girişine denk gelecek şekilde ayarlanmaktadır. Böylece, yüklü büyük partiküllerin skimmerden geçerek analizöre girişi azaltılıp detektördeki gürültü miktarı azaltılmaktadır. RF ve LO lenslerine uygulanan potansiyel ile iyonların analizöre doğru geçişi sağlanmaktadır. Ayrıca LO lensleri vakum ayarlayıcı (baffle) olarak da işlev görmektedir (Anonymous 2009a).

Analizör iyon optikleri; multipole 1, L1 lensler, split lensler ve multipole 2 (octapole)'den oluşmaktadır. Multipole 1 parçaları, cihaza 90°'lik eğim ile yerleştirilerek analizöre girişi istenmeyen nötral bileşiklerin vakum altında ortamdan uzaklaştırılmasını ve iyonların analizöre geçişini sağlamaktadır. L1 lenslerine uygulanan potansiyel ile iyonlar multipole 2'ye doğru ilerlemektedir. Ayrıca L1 lenslerinin vakum ayarlayıcı (baffle) olarak işlevi vardır. Split lensler, iyonların kütle analizörüne girişini başlatmak veya durdurmak için kullanılmaktadır. C-trap'e girmesine izin verilmeyen iyonlar, L1 lensler tarafından uygulanan yüksek voltaj ile ayarlayıcıya doğru saptırılmaktadır. Multipole 2 (octapole), lenslerden geçen iyonların C-trap'e iletilmesini sağlamaktadır (Anonymous 2009a).

C-trap (kavisli lineer tuzak), orbitrap analizörünün hemen yanında bulunan, iyonların analizöre girmeden önce kısa süreli depolandığı bölümdür. C-trap'in başında (gate lens) ve sonunda (trap lens) bulunan lenslere uygulanan potansiyel ile iyon geçişleri ve iyonların bu bölümde tutulması sağlanmaktadır. İyonizasyon kaynakları aralıksız iyon ürettiklerinden dolayı kütle analizörüne varış sırasında iyon kaybı

yaşamamak amacıyla iyonların burada toplanması ve sonra analizöre geçmesi önemlidir. Burada önemli olan, C-trap'ten iyonların mümkün olduğunca hızlı bir şekilde analizöre iletilmesidir. İyonlar, lenslere DC voltajı uygulanması ve C-trap'teki RF potansiyelinin hızlı bir şekilde sıfıra düşürülmesi sonucunda C-trap'ın çıkışına doğru yönelmektedir. C-trap'ten sonra gelen Z lenslerine uygulanan potansiyel de iyonların orbitrap girişine iletilmesini sağlamaktadır (Marshall ve Hendrickson 2008; Anonymous 2009a).



Şekil 2.9. Orbitrap-Exactive

İyon optikleri ve orbitrap analizörünü çevreleyen vakum manifoldu, bu alanlarda yüksek ve ultra yüksek vakum ortamını sağlamaktadır. Vakum manifoldu kapiler-skimmer bölgesi, kaynak bölgesi ve analizör bölgesi olmak üzere 3 bölmeye ayrılmıştır ve bu bölmelerde vakum sırasıyla ön pompa, turbomoleküler pompa (kaynak TMP) ve diğer turbomoleküler pompa (analizör TMP) ile sağlanmaktadır. Kapiler-skimmer bölgesinden orbitrap analizör bölgesine doğru vakum değeri kademeli olarak artmaktadır. Kapiler-skimmer bölgesi önvakum (FV), multipole 2 ve C-trap bölgesi yüksek vakum (HV) ve orbitrap analizör bölgesi ultra yüksek vakum (UHV) bölgesi olarak adlandırılmaktadır (Anonymous 2009a) (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. İyon optikleri ve analizördeki vakum değerleri

Bölge	Vakum (mbar)	Vakum sağlayıcı
Kapiler-skimmer	< 2	Ön pompa FV
Multipole 2	1E-05	Kaynak TMP HV
Orbitrap analizör	< 8E-10	Analizör TMP UHV

Detektör, analizörde m/z oranlarına göre ayrılan iyonların enerjilerini elektrik enerjisine dönüştürerek, verilerin bilgisayar sisteminde insan gözü tarafından algılanabilen biçimde görüntülenmesini sağlamaktadır (Dass 2007, Westman-

Brinkmalm ve Brinkmalm 2009). Kütle spektrometrelerinde kullanılan dedektörler iki ana kategoriye ayrılmaktadır. İlk grupta, yüksek doğrulukta izotop oranlarının ölçüldüğü sektör analizörleri ile birlikte kullanılan, fotoğraf plakası ve Faraday kabı gibi gelen sinyalleri direkt ölçen dedektörler; ikinci grupta ise sintalasyon sayıcı ve elektron çoğaltıcı gibi gelen sinyalleri yeterli yoğunlukta vermek amacıyla artıran sinyal çoğaltıcının (multiplier) kullanıldığı dedektörlerdir (Evans 1990). Görüntü akımı dedektörü ise sadece iyon siklotron rezonans ve orbitrap analizörleri ile birlikte kullanılan ve zamana bağlı sinyallerin oluştuğu dedektördür. Bu sinyaller elde edildikten sonra Fourier dönüşümü ile frekansa bağlı sinyale yani kütle spektrumuna dönüştürülmektedir (Dass 2007, Westman-Brinkmalm ve Brinkmalm 2009).

2.5. Metot Validasyonu

Bir analitik ölçümün amacı; tutarlı, güvenilir ve doğru verilerin elde edilmesidir. Bu amaca ulaşmada valide edilmiş analitik metotların büyük bir rolü vardır. Metot validasyonu sonucunda elde edilen veriler, iyi bir analitik çalışmanın ayrılmaz bir parçası olarak, analitik sonuçların kalitesini, güvenilirliğini ve tutarlılığını sorgulamak amacıyla kullanılmaktadır. Bir analitik metot, rutin analizlerde kullanılmaya başlanmadan önce ve başka bir laboratuvarında kullanılmak amacıyla transfer edildiğinde valide edilmelidir; ayrıca farklı özellikte bir cihaz veya matriks kullanılması gibi metot şartlarının veya parametrelerinin değiştiği durumlarda valide edilmiş bir metodun tekrar validasyonu yapılmalıdır (Huber 2010). Validasyon, asgari kabul kriterlerini yerine getiren bir metodun kalitesini tarafsız olarak gösteren ve belirli bir amaç için metodun uygulanabilirliğini ispatlayan bir prosedürdür. Bu, özellikle kalite yönetimi ve akreditasyon bağlamında önemli bir konudur (Peters vd 2007).

Metot validasyonu, doğrudan nicel verilerin kalitesini etkilediği için metot geliştirme ile yakından ilgilidir. Validasyon sayesinde geliştirilen metodun kabul edilebilirliği güvence altına alınmaktadır. Analitik metotların validasyonuna ilişkin sayısız kuruluşun farklı ihtiyaçları karşılayan bilgi kaynakları mevcuttur. Bu yüzden, metot validasyonu için rehberlik yapacak uygun kaynağın seçilip uygulanması önemlidir. Temel olarak bu kaynaklar Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC), Uluslararası Standardizasyon Komitesi (ISO), Avrupa Analitik Kimya Örgütü (Eurachem) ve Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC International) gibi bağımsız bilimsel kuruluşlar tarafından sağlanmaktadır. Bu kuruluşlar, ulusal/bölgesel düzenleyici otoritelerden ve uluslararası düzenleyici standart ve uygulamaları oluşturan uluslararası kuruluşlardan oluşmaktadır (Kay ve MacNeil 2012).

Validasyonun kapsamı ve değerlendirilecek performans parametrelerinin seçimi analitik yöntemin durumuna göre değişmektedir. Yöntem daha önce uluslararası protokole göre tamamen valide edilmişse, geniş kapsamlı laboratuvar içi (in-house) validasyonun yapılması gerekmemektedir. Ancak, laboratuvar içi yeni geliştirilen metoda ait herhangi bir performans kriteri belirlenmemişse mümkün olduğu kadar çok sayıda validasyon parametresinin (tam validasyon) incelenmesi gerekmektedir (Taverniers vd 2004). Genel olarak metot validasyonu için incelenmesi önerilen performans kriterleri; doğrusallık (linearity), ölçüm aralığı (range), seçicilik (selectivity), tespit limiti (limit of detection-LOD), tayin limiti (limit of quantification-

LOQ), doğruluk (accuracy) ve kesinliktir (precision) (Taverniers vd 2004, Peters vd 2007, Huber 2010, Kay ve MacNeil 2012).

Seçicilik, tespit edilecek analitin matriks içerisinde bulunan diğer bileşiklerden (metabolit, safsızlık, diğer matriks bileşenleri) ayırt edilerek ölçülmesini ifade etmektedir. Seçiciliğin belirlenmesi için, kör numuneye (analiti içermeyen örnek) farklı konsantrasyonda aranan analit eklenerek girişim unsurlarının oluşup oluşmadığı incelenmektedir. Bir metodun seçiciliğini metot parametrelerinin yanısıra örnek hazırlama aşamaları da önemli ölçüde etkilemektedir. Günümüzde yüksek çözünürlüklü kütle spektrometreleri ile yapılan çalışmalarda eser miktardaki analitlerin belirlenmesinde çok iyi seçicilik sağlanmaktadır. Kalibrasyon modelinin seçimi analit miktarının güvenilir bir şekilde tespit edilmesi için önemlidir. Bu yüzden analit konsantrasyonu ile cihazda vermiş olduğu sinyal arasındaki ilişki incelenmelidir. Bu açıdan, doğrusalılık ve ölçüm aralığı analitik çalışmalarda belirlenmesi gereken iki önemli parametredir. Doğrusallık, analit konsantrasyonu ile sinyalin doğru orantılı olarak değiştiği alt ve üst sınırları belirtmektedir. Analizlerde analitlerin ölçüm aralığı bu sınırlar içerisinde olmalıdır. Ölçüm aralığının alt sınırını tayin limiti (LOQ) değeri belirlemektedir (Taverniers vd 2004, Peters vd 2007, Huber 2010, Kay ve MacNeil 2012).

Doğruluk, analiz sonucunda elde edilen verilerin gerçek değere yakınlığını ifade etmektedir. Doğruluk, gerçeklik ve kesinlik parametrelerini kapsamaktadır. Gerçeklik, bir değer bilinen gerçek değere yakınlığını (sapma-bias) belirtmektedir. Bu değer, bir ölçüm metodunun gerçek sonucu verebilme kabiliyetini ifade eden sistematik hatalardan etkilenmektedir. Gerçek değer, sertifikalı referans maddelerin kullanıldığı valide edilmiş bir metot uygulanarak belirlenmektedir. Ancak sertifikalı referans madde ve metodun bulunmadığı durumlarda geri kazanım çalışması yapılarak da belirlenebilmektedir. Bu kapsamda validasyon çalışmasının yapılacağı matrikse (blank) tespit edilecek analit bilinen konsantrasyonda ilave edilerek analiz edilmektedir. Kesinlik ise, aynı örnekten elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Kesinlik tekrarlanabilirlik (repeatability), ara kesinlik (intermediate precision) ve tekrarüretilebilirlik (reproducibility) olmak üzere 3 farklı şekilde belirlenmektedir. Tekrarlanabilirlik örneklerin aynı laboratuvarında aynı ekipman kullanılarak aynı analist tarafından kısa zaman aralığında analiz edilmesi sonucunda verilerin elde edilmesi; ara kesinlik aynı laboratuvarında farklı günlerde farklı analistler tarafından yapılan analiz sonuçlarının elde edilmesi ve tekrarüretilebilirlik ise aynı metodun farklı laboratuvarında uygulanması sonucunda verilerin elde edilmesi olarak tanımlamaktadır. Bir metodun kesinliği standart sapma veya bağlı standart sapma (RSD) değeri ile belirlenmektedir (Taverniers vd 2004, Peters vd 2007, Huber 2010, Kay ve MacNeil 2012).

Eser miktarda analit konsantrasyonlarında çalışılması durumunda analit sinyalinin kör numune sinyalinden ayrılması ve uygun bir kesinlikte sonuçların elde edilmesi daha da önem arz etmektedir. Bu durum için tespit limiti ve tayin limiti kavramları oluşturulmuştur. Tespit limiti, örnek içerisinde yer alan analitin tespit edilebilen fakat değeri tam olarak ölçülemeyen en düşük miktarı ya da konsantrasyonudur. Kromatogramda bu değer, analit pikinin yüksekliğinin (sinyal-S) temel taban çizgisinden (baseline) yani gürültü seviyesinden (N) en az 3 kat yüksek olmasını ifade etmektedir. Tespit limitinin altında kalan nicel verilerin ölçümü

yapılabilmektedir ancak bu değerlerin ölçümündeki belirsizlik gerçek değerden oldukça yüksek olduğu için ölçümler doğru ve kesin olmamaktadır. Tayin limiti ise örnek içerisindeki analitin kabul edilebilir doğrulukta ve kesinlikte ölçülebilen en düşük miktarını ya da konsantrasyonunu ifade etmektedir ve raporlama limiti olarak da bilinmektedir. Genellikle tespit limiti ve tayin limiti en düşük konsantrasyonda analitin örnek köru üzerine eklenerek yapılan çoklu analiz sonuçlarının standart sapmasının hesaplanması ile elde edilmektedir. Belirlenen standart sapmanın 3 ile çarpılması sonucunda tespit limiti, 10 ile çarpılması sonucunda tayin limiti hesaplanmaktadır. Bu sayılar, sırasıyla ölçümlerde maksimum kabul edilebilir bağıl belirsizlik yüzdeleri olan %33 ve %10 değerlerinin karşılığı olan katsayılardır (Taverniers vd 2004, Peters vd 2007, Huber 2010, Kay ve MacNeil 2012).

2.6. Gıdalarda Kütle Spektrometresi Kullanılarak Yapılan Sülfonamid Grubu Antibiyotik Kalıntı Analizi Çalışmaları

Cavaliere vd (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, süt ve yumurtada sülfonamid grubunda yer alan 14 tane antibiyotik katı faz ekstraksiyon kartuşu ile ekstrakte edildikten sonra HPLC-MS cihazı (tekli kuadropol) kullanılarak analiz edilmiştir. Analizde gradiyent elüsyon kullanılmıştır ve analiz süresi 44 dakikadır. Sütte geri kazanım değeri 5 ppb seviyesinde %13'ün altında bağıl standart sapma ile %76-112; yumurtada ise 50 ppb seviyesinde %12'nin altında bağıl standart sapma ile %68-106 aralığında bulunmuştur. LOQ değeri sütte 1-6 ppb; yumurtada ise 5-13 ppb olarak tespit edilmiştir. Sütte sülfonamid analizi için yapılan diğer bir çalışmada 24 tane sülfonamid grubu antibiyotik asetonitril ile sıvı faz ekstraksiyonundan sonra UPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) ile analizi yapılmıştır. Gradiyent elüsyon kullanılarak 10 dakika süre içerisinde örnekler analiz edilmiştir. Matriks uyumlu yapılan kalibrasyonda doğrusal aralık 0.99'un üzerindeki korelasyon katsayısı ile 0,2-100 ppb değerinde elde edilmiştir. LOD değeri 0,04-1,35 ppb, LOQ değeri ise 0,5 ppb olarak hesaplanmıştır. Her bir antibiyotik iyi geri kazanım değeri (%60,59-116,66) ile analiz edilmiştir ve bağıl standart sapma değeri %2,92-18,64 aralığında değişmektedir (She vd 2010).

Lu vd (2007) tarafından et ürünlerinde yapılan bir çalışmada 8 tane sülfonamid katı faz ekstraksiyon yönteminden sonra HPLC-MS (kuadropol iyon tuzağı) ile analizi yapılmıştır. Kolonda analitlerin ayrımı için su (30) ve %80 asetonitril/su (70) karışımı izokratik elüsyon olarak kullanılmıştır ve analiz süresi 40 dakikadır. Doğrusallık çalışması için yapılan matriks uyumlu kalibrasyonda 50-2000 ppb aralığının uygun olduğu belirlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 16-39 ppb ve 53-130 ppb aralığında değişirken, bağıl standart sapma gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizler sonucunda sırasıyla %15'in ve %19'un altında tespit edilmiştir. Çin'de et ürünlerinde sülfonamid analizi için yapılan diğer bir çalışmada etil asetat-su karışımı ile sıvı ekstraksiyon yapıldıktan sonra 24 tane sülfonamid UPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) ile analizi yapılmıştır. Gradiyent programda yapılan analizin süresi 15 dakikadır. Analizde 0,2-50 ppb aralığında doğrusallık tespit edilmiştir (r^2 :0,991-0,999). Tüm sülfonamidler için geri kazanım değeri %67,8-113,9 arasında belirlenmiştir. LOQ değeri ise 0,04-0,37 ppb, bağıl standart sapma ise gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizler sonucunda sırasıyla %0,46-7,28 ve %0,44-7,10 aralığında tespit edilmiştir (Cai vd 2008).

Chitescu vd (2011) tarafından kanatlı et sanayisinde en yaygın kullanılan 4 tane (sülfadimetoksin, sülfametoksazol, sülfakinoksalin ve sülfadiazin) sülfonamid grubu antibiyotiğin sırasıyla uygulanan asetonitril, aseton ve diklormetan ekstraksiyonlarından sonra HPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) ile analizi yapılmıştır. İzokratik elüsyon ile yapılan analizin süresi 10 dakikadır. Analizde kalibrasyon değerleri 30-150 ppb aralığında 0,99'un üzerinde korelasyon katsayısı ile doğrusallık göstermektedir. Bağlı standart sapma %7,8-13,5 olarak belirlenmiştir. Doğruluğun göstergesi olarak yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda %70-84 aralığındaki değerler elde edilmiştir. Üç antibiyotik için LOQ değeri 0,4-1,7 ppb olarak belirlenirken, sülfakinoksalin için bu değer 19,6 ppb olarak belirlenmiştir.

İspanya'da domuz etinde bulunabilecek 12 tane sülfonamid grubu antibiyotiğin analizi Font vd (2007) tarafından yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi 160 °C sıcaklıkta ve 1500 psi basınçta su kullanılarak yapılmıştır. Analiz için kapiler elektroforez-iyon tuzluğu kütle spektrometresi (MS/MS) kombinasyonu kullanılmıştır. Kalibrasyonda 50-500 ppb aralığında 0,996'nın üzerindeki korelasyon katsayısı ile doğrusallık elde edilmiştir. Bağlı standart sapmanın %14'ün altında ve geri kazanım değerinin %76-98 aralığında olduğu belirlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri de sırasıyla 1,56-12,5 ppb ve 13,8-42,3 ppb aralığında hesaplanmıştır. Yu vd (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, domuz, sığır ve tavuk ürünlerinde (et, karaciğer ve böbrek) 18 tane sülfonamid grubu antibiyotik basınçlı sıvı ekstraksiyonu ve HPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Ekstraksiyonda 70 °C sıcaklıkta ve 1400 psi basınçta asetonitril kullanılmıştır. Gradyent elüsyon kullanılarak yapılan analizin süresi 60 dakikadır. Analizde matriks uyumlu kalibrasyon kullanılarak 10-2000 ppb gibi geniş bir aralıkta doğrusallık elde edilmiştir (r^2 :0,9981-0,9990). Metodun %13'ün altında bağlı standart sapma ile elde edilen geri kazanım değerleri %71,1-118,3 aralığındadır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 5-10 ppb ve 15 ppb'nin altında hesaplanmıştır.

Kore'de farklı deniz ürünlerinde (balık, mavi yengeç, karides, deniz kulağı) yapılan bir çalışmada 14 tane sülfonamid grubu antibiyotiğin analizi yapılmıştır. Bu amaçla sıvı faz ekstraksiyon yöntemi ve UPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı kullanılmıştır. Gradyent elüsyonun kullanıldığı analizin süresi 20 dakikadır. Doğrusallık 20-500 ppb değerleri arasında 0,999'un üzerinde bir korelasyon katsayısı ile tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 3-6 ppb ve 9-18 ppb aralığında hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmalarında %4-11,3 bağlı standart sapma ile %51,8-89,7 değerleri elde edilmiştir (Won vd 2011). Kung vd (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise balık dokularında eser miktarda bulunabilen 14 tane sülfonamid grubu antibiyotiğin analizi yapılmıştır. QuEChERS ekstraksiyon yöntemiyle matriksten ekstrakte edilen sülfonamidler HPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı ile analiz edilmiştir. Gradyent elüsyon kullanılarak yapılan analiz 20 dakika sürmektedir. Analiz için kullanılan kalibrasyon eğrisi 10-100 ppb arasındaki değerlerde hazırlanmıştır. Bu aralıkta uygun korelasyon katsayısı (r^2 :0,9950-0,9994) ile doğrusallık elde edilmiştir. Geri kazanım çalışmalarında sülfonamidler %80,2-93,5 oranlarında elde edilmiştir. Bağlı standart sapma ise %3,8-8,7 aralığında tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,43-1,22 ppb ve 1,27-3,71 ppb aralığında hesaplanmıştır.

Dubreil-Chéneau vd (2014) tarafından balda yapılan bir çalışmada katı faz ekstraksiyon kartuşları kullanılarak ekstrakte edilen 13 tane sülfonamid HPLC-MS/MS

(üçlü kuadropol) cihazı ile analiz edilmiştir. Gradyent elüsyon kullanılan analizin süresi 17 dakikadır. Analizde kalibrasyon değerleri 10-50 ppb aralığında 0,97'nin üzerinde korelasyon katsayısı ile doğrusallık göstermektedir. Geri kazanım değerleri %85,8-110,2 ve bağıl standart sapma %2,6-19,8 aralığında hesaplanmıştır. Balda yapılan diğer bir çalışmada yine katı faz ekstraksiyon kartuşu uygulanarak ekstrakte edilen 11 tanesülfonamid grubu antibiyotik HPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı ile analiz edilmiştir. Analizde gradyent elüsyon kullanılmıştır ve analiz süresi 13 dakikadır. Metot 5-100 ppb aralığında tüm sülfonamidler için doğrusallık göstermiştir (r^2 :0,993-0,999). Geri kazanım değerleri %89-114 aralığında, bağıl standart sapma ise gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizler sonucunda sırasıyla %3-19,5 ve 4 tane antibiyotik dışında %20'nin altında tespit edilmiştir (Juan-Borrás vd 2015).

Yu ve Hu (2012) tarafından yapılan bir çalışmada süt ve süt tozunda 6 tane sülfonamidin analizi yapılmıştır. Analizde karıştırma çubuğu sorptif ekstraksiyon sistemi ve HPLC-MS/MS (Kuadropol-uçuş zamanlı/Q-TOF) cihazı kullanılmıştır. Gradyent elüsyon ile yapılan analizin süresi 30 dakikadır. Kalibrasyon grafiği 0,1-2000 ppb aralığındaki konsantrasyonda çizilmiş olup doğrusal aralık olarak 1 tanesi için 0,2-200 ppb, diğerleri için ise 2-500 ppb aralığı belirlenmiştir (r^2 :0,9922-0,9981). Bağıl standart sapma %20'nin altında, LOD değerleri süt ve süt tozu için sırasıyla 0,9-10,5 ppb ve 2,7-31,5 ppb aralığında tespit edilmiştir. Geri kazanım ise sütte %87-120, süt tozunda %68-115 olarak elde edilmiştir.

Antibiyotiğin yemlerine katılarak hayvanlara verilmesi antibiyotiğin uygulanma yollarından bir tanesidir ve yaygın olarak uygulanmaktadır. Buna bağlı olarak Lopes vd (2012) tarafından yemlerde yapılan bir çalışmada 13 tane sülfonamid grubu antibiyotiğin analizi yapılmıştır. Antibiyotiklerin yemlerden ekstraksiyonu için QuEChERS yöntemi uygulanmıştır ve bunu izleyen analiz aşamasında HPLC-MS/MS (üçlü kuadropol) cihazı kullanılmıştır. Gradyent elüsyon kullanılan analizin süresi 18 dakikadır. Metotta matriks uyumlu kalibrasyon kullanılarak 0-75 ppb aralığında doğrusallık elde edilmiştir (r^2 >0,9864). Doğruluğun ölçütü olarak kullanılan geri kazanım değeri %86-106,8 aralığında ve kesinlik ölçütü olarak kullanılan tekrarlanabilirliğin sayısal ifadesi olan bağıl standart sapma ise %19,4'ün altında tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 4,2 ppb ve 7,1 ppb değerlerinin altında hesaplanmıştır.

Sülfonamid grubu antibiyotiklerin metabolitlerinin de analiz edildiği çalışmalar incelendiğinde, Kishida ve Furusawa (2004) tarafından sütte yapılan bir çalışmada sülfamonometoksin ve sülfadimetoksin antibiyotikleri ve N₄-asetil metabolitleri analiz edilmiştir. Bu çalışmada, ekstraksiyon işleminde etanol-asetik asit karışımı kullanıldıktan sonra ekstraktlar HPLC cihazı (PDA dedektör) ile analiz edilmiştir. İzokratik elüsyonun kullanıldığı analizin süresi 30 dakikadır. LOQ değerleri 9-25 ppb aralığında tespit edilmiştir. Aynı antibiyotik ve metabolitlerinin tavuk ürünlerinde (et, karaciğer) analizi HPLC cihazı (PDA dedektör) kullanılarak yapılmıştır (Kishida ve Furusawa 2005). Bu iki sülfonamid grubu antibiyotiğin ve N₄-asetil metabolitlerinin yumurtadan doymuş amonyum sülfat çözeltisinde ultrasonik homojenizatör ile ekstraksiyonundan sonra HPLC cihazı (PAD dedektör) ile analizinin yapıldığı bir çalışma mevcuttur. Kalibrasyon grafiği 0,1-2 ppm aralığında 0,998'in üzerinde bir korelasyon katsayısı ile elde edilmiştir. Bu çalışmada geri kazanım değerleri %91'in

üzerinde hesaplanmıştır (%RSD=%4). LOD ve LOQ değeri sırasıyla 0,03 ppm'in ve 0,08 ppm'in altında belirlenmiştir (Kishida 2007).

Li vd (2013) tarafından et ürünlerinde 16 tane sülfonamid grubu antibiyotiğin ve 4 tane N₄-asetil metabolitinin analizi için geliştirilen yöntemde, analitler asetonitrilin kullanıldığı ultrasonik inkübasyonu izleyen katı faz ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edildikten sonra UPLC-MS/MS (üçlü kuadrupol) cihazı ile analiz edilmiştir. Gradyent elüsyonun kullanıldığı analizin süresi 16 dakikadır. Matriks uyumlu kalibrasyon 1-200 ppb aralığında yapılmıştır ($r^2>0,9983$). Geri kazanım değerleri %3,5-9,2 aralığında bağıl standart sapma ile %68,3-104 aralığında elde edilmiştir. LOD ve LOQ değeri sırasıyla 0,1-0,3 ppb ve 0,35-1 ppb aralığında hesaplanmıştır. Sun vd (2013) tarafından su ürünlerinde 4 tane sülfonamid grubu antibiyotiğin ve N₄-asetil metabolitinin tespit edilmesine yönelik bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, basınçlı sıvı ekstraksiyon işlemi için 70 °C sıcaklıkta ve 10,3 MPa basınçta asetonitril kullanılmıştır. Analitlerin analizi kapiler elektroforez ile yapılmıştır. Doğrusallık 0,2-100 ppm aralığında belirlenmiştir ($r^2>0,9995$). Geri kazanım değerleri karideste %0,6-3,6 aralığında bağıl standart sapma ile %83-114 aralığında, sardalyada %1-3,6 aralığında bağıl standart sapma ile %83-108 aralığında ve hamside (ançuez) %1,2-3,9 aralığında bağıl standart sapma ile %84-116 aralığında elde edilmiştir. LOQ değeri N₄-asetilsülfamerazın için 370 ppb ve N₄-asetilsülfametoksazol için 1076 ppb olarak diğerleri için ise 26,4-39,6 ppb aralığında hesaplanmıştır.

Bu çalışmalara ilave olarak, bebek mamalarında sülfonamid grubu antibiyotiklerin kalıntılarının tespit edilmesi için geliştirilen metotlar da literatürde yer almaktadır. Bu çalışmalardan biri, Gentili vd (2004) tarafından yapılan et ve bebek mamalarında bulunabilecek 13 tane sülfonamid grubu antibiyotiğin analiz edilmesidir. Bu araştırmada basınçlı sıvı ekstraksiyon yöntemi ve HPLC-MS/MS (üçlü kuadrupol) cihazı kullanılmıştır. Ekstraksiyon aşamasında 160 °C sıcaklıkta ve 100 atm basınçta su kullanılmıştır. Gradyent elüsyon kullanılan analizin süresi 20 dakikadır. Matriks uyumlu kalibrasyon doğrusal olarak 0-25 ppb aralığında çizilmiştir ($r^2>0,9986$). Geri kazanım değerleri %10'un altında bağıl standart sapma ile %70-101 aralığında elde edilmiştir. Sırasıyla et ve bebek gıdalarında LOD değerleri 0,6-2,6 ppb ve 0,4-7,8 ppb, LOQ değerleri ise 0,4-1,7 ppb ve 1,2-5,1 ppb olarak tespit edilmiştir. Bebek mamalarında yapılan diğer bir çalışmada, farklı gruplarda yer alan kontaminantların analizi yapılmıştır. Analizi yapılan bu kontaminantlar arasında 16 tane sülfonamid grubu antibiyotik de bulunmaktadır. Asetonitril ile ekstraksiyonu yapılan örnekler UPLC-MS/MS (üçlü kuadrupol) ile analiz edilmiştir. Gradyent elüsyon ile yapılan analizin süresi 12 dakikadır. Matriks uyumlu yapılan kalibrasyonda iyi korelasyon katsayısı ile doğrusallık elde edilmiştir ($r^2>0,990$). Sülfonamid grubu antibiyotikler için geri kazanım değerleri %2-13 bağıl standart sapma ile %77-111 aralığında elde edilmiştir. LOQ değeri de 0,1-0,5 ppb olarak tespit edilmiştir (Zhan vd 2013).

Aguilera-Luiz vd (2012) tarafından et ve süt tozu içeren bebek mamalarında yapılan bir çalışmada 5 tane sülfonamid grubu antibiyotiğinde bulunduğu gruptaki antibiyotiklerin analizi yapılmıştır. Bu çalışmada ekstraksiyon için seyrelt ve enjekte et (diluet and shoot) sıvı faz ekstraksiyonu ve QuEChERS yönteminin ilk aşaması ayrı olarak kullanılmıştır ve filtreden (Millex-GN naylon) geçirilen ekstraktlar UPLC-MS/MS cihazı (üçlü kuadrupol) ile analiz edilmiştir. Gradyent elüsyon kullanılarak

yapılan analizin süresi 9,5 dakikadır. Analiz sonuçlarına göre, seyrel ve enjekte et işleminde geri kazanım değerlerinin matriksten kaynaklanan girişim unsurlarının sonucunda üst sınır olan %120'den daha yüksek çıkmasından dolayı bu işlemin her iki matriks için ideal olmadığı ve QuEChERS yönteminde daha iyi geri kazanımların elde edildiği, ayrıca yüksek konsantrasyonda (250 ppb) ilave edilen standart karışımın düşük konsantrasyona (25 ppb) kıyasla daha iyi sonuç verdiği ve bu yüzden eser miktarda kalıntı analizi için bu yöntemin uygun olmadığı belirtilmiştir. Matriks uyumlu yapılan kalibrasyonda 5-100 ppb aralığında 0,990'un üzerinde korelasyon katsayısı ile doğrusallık tespit edilmiştir. Genel olarak %20'nin altında bağıl standart sapma ile et bazlı bebek mamalarında %90-120, süt tozu bazlı bebek mamalarında ise %74-120 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla et bazlı bebek mamalarında 0,2-0,5 ppb ve 0,7-1,7 ppb, süt tozu bazlı bebek mamalarında 0,2-2 ppb ve 0,7-6,7 ppb aralığında bulunmuştur.

Literatürde gıdalarda sülfonamid grubu antibiyotik kalıntı analizi için orbitrap analizörünün kullanıldığı 2011-2015 yılları arasında yapılan 9 tane çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan sadece Abdallah vd (2014) tarafından yapılan çalışmada sülfonamid grubu antibiyotiklerin analizi üzerinde durulmuştur. Diğerleri ise sülfonamid grubunun da içinde olduğu farklı gruptaki antibiyotiklerin et, balık, bal ve süt gibi gıdalarda (Kaufmann vd 2011, Romero-González vd 2011, Gómez-Pérez vd 2012, Aguilera-Luiz vd 2013, Kaufmann vd 2014, Cepurnieks vd 2015) veya pestisit gibi farklı kalıntı grupları ile antibiyotiklerin aynı analiz yöntemi ile bebek mamalarında tespit edildiği (Jia vd 2014, Gómez-Pérez vd 2015) çalışmalardır.

Abdallah vd (2014) tarafından yapılan çalışmada domuz, sığır, koyun ve tavuk dokularında (et, böbrek, karaciğer) 22 tane sülfonamid grubu antibiyotiğin ve 2 tane metabolitin (N₄-asetilsülfadimetoksin ve N₄-asetilsülfametazin) analizi yapılmıştır. Ekstraksiyon işleminde QuEChERS yöntemi uygulanmıştır. HPLC sisteminde gradiyent elüsyon kullanılarak yapılan analizin süresi 30 dakikadır. Kütle spektrometresi olarak doğrusal iyon tuzağı-orbitrap hibrit cihazı (LTQ Orbitrap Velos, Thermo-Fisher, Almanya) kullanılmıştır. Ekstraksiyon işleminin ilk aşamasında %1 asetik asitli asetonitril, ikinci aşamasında PSA ve susuz MgSO₄ uygulanmıştır. Son olarak, ekstrakt kromatografik analize girmeden önce naylon filtreden (0,22 µm) geçirilmiş ve santrifüj edildikten (13500 rpm'de 10 dk) sonra cihaza enjekte edilmiştir. HPLC'de Zorbax Eclipse XDB-C₈ (3,5 µm x 2.1 x 100 mm) kolonu kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C, akış hızı 200 µL/dk ve enjeksiyon hacmi 5 µL'dir. Hareketli faz olarak %0,01 formik asit/su (A) ve %0,01 formik asit/metanol (B) uygulanmıştır. Kütle spektrometresi kısmında analit tespiti için cihazın çözünürlüğü 60,000'e ayarlanmıştır ve 100-1000 Da kütle aralığında tarama yapılmıştır. Matriks uyumlu kalibrasyonda 50-200 ppb aralığında 0,990'ın üzerinde korelasyon katsayısı ile doğrusallık elde edilmiştir. Geri kazanım değerleri, farklı günlerde yapılan tekrarlar da %23'ün ve gün içinde yapılan tekrarlar da %15'in altında bağıl standart sapma ile %88-112 aralığında tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 3-26 ppb ve 11-88 ppb aralığında belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan 10 farklı markaya ait 47 tane bebek gıdası Antalya’da bulunan marketlerden temin edilmiştir. Ürünler; bebek sütü (0-6 ay), devam sütü (6.aydan itibaren), devam sütü (1-3 yaş), organik sütlü meyveli tahıl bazlı, sütlü bisküvili, 5 tahıllı sütlü pirinç tanecikli, sütlü tam tahıllı kuş üzümlü, sütlü pirinçli, sütlü 7 tahıllı elmalı, sütlü ballı irmikli, sütlü meyveli 8 tahıllı, 8 tahıllı sütlü, sütlü pirinçli, sütlü ballı irmikli, sütlü meyveli pirinçli, muzlu pirinçli sütlaç, muhallebi, sütlü tahıllı, sütlü armutlu muhallebi olmak üzere devam sütü içeren ve organik sebzeli ve tavuklu erişte, makarnalı hindili domates çorbası, tavuklu sebzeli çorba, kerevizli tavuk çorbası olmak üzere hayvansal ürün içeren bebek gıdalarıdır. Bebek ve devam sütleri dışında süt içeren ürünler %28,7-54,8 oranında süt; hayvansal ürün içeren gıdalar ise %8-10,2 oranında et içermektedir.

Çalışma kapsamında kullanılan sülfakloropiridazin, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametoksazol, sülfametoksipiridazin, sülfamonometoksin, sülfapiridin, sülfakinoksalin ve sülfatiazol standartları Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından; sülfamoksol, N-asetilsülfadiazin, N-asetilsülfamerazin, N-asetilsülfametazin, N-asetilsülfametoksazol ve N-asetilsülfapiridin standartları Toronto Research Chemicals (Kanada) firmasından temin edilmiştir. Standartların saflık dereceleri ve saklama koşulları Çizelge 3.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Standartların saflık derecesi ve depolama sıcaklığı

Standart	Saflık (%)	Saklama sıcaklığı (°C)
N-asetilsülfadiazin	97,0	+4
N-asetilsülfamerazin	98,0	+4
N-asetilsülfametazin	98,0	+4
N-asetilsülfametoksazol	98,0	+4
N-asetilsülfapiridin	98,0	+4
Sülfakloropiridazin	99,6	+20
Sülfadiazin	99,3	+20
Sülfadimetoksin	99,9	+4
Sülfamerazin	98,8	+20
Sülfametazin	99,7	+20
Sülfametoksazol	99,9	+20
Sülfametoksipiridazin	99,8	+4
Sülfamonometoksin	95,6	+20
Sülfamoksol	98,0	+4
Sülfapiridin	99,5	+20
Sülfakinoksalin	96,0	+20
Sülfatiazol	99,9	+20

Standart çözelti hazırlama, ekstraksiyon ve kromatografik analiz aşamalarında metanol (Sigma-Aldrich, Almanya), asetonitril (Sigma-Aldrich, Almanya), aseton (Sigma-Aldrich, Almanya), formik asit (Sigma-Aldrich, Almanya), asetik asit (Sigma-Aldrich, Almanya), oksalik asit dihidrat (Sigma-Aldrich, Almanya), amonyum format (Sigma-Aldrich, Almanya), amonyum asetat (Merck, Almanya) kimyasalları kullanılmıştır. Kimyasallar LC-MS sistemlerinde kullanılmaya uygun analitik saflıktadır. Ultra saf su Milli-Q (Millipore, Fransa) sistemi ile elde edilmiştir. Naylon filtre (0,45 µm) Millipore (İrlanda) firmasından ve QuEChERS ekstraksiyon kitleri Agilent (ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

Her bir antibiyotiğin stok çözeltisi, derişimi 1000 ppm olacak şekilde çözünürlüklerine bağlı olarak sadece metanolde veya metanol ve aseton karışımında hazırlanmıştır ve -18 °C'de amber renkli tüplerde muhafaza edilmiştir. Araştırmada kullanılan antibiyotiklerin tamamını içeren 5 ppm'lik standart karışım metanol ile hazırlanmıştır ve analizler bu karışım kullanılarak yapılmıştır.

3.2.2. Ekstraksiyon yöntemleri

Bebek gıdaları, QuEChERS ve ASE yöntemleri ile 2 farklı şekilde ekstraksiyon işlemine tabi tutularak analiz edilmiştir.

3.2.2.1. QuEChERS yöntemi

Bebek gıdalarının QuEChERS yöntemine göre ekstraksiyonu için AOAC 2007.01 (2007) yöntemi uygulanmıştır. Bebek gıdaları toz ürünler ve kavanoz mamaları olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır.

Toz ürünlerin ekstraksiyon aşamasında, 5 g numune 50 mL'lik santrifüj tüpüne tartılarak üzerine 10 mL ultra saf su ilave edilmiştir ve 30 s elle çalkalanmıştır. Sonra, üzerine 15 mL %1'lik asetik asit içeren asetonitril ilave edilerek tekrar 30 s elle çalkalanmıştır. Daha sonra, 1.5 g susuz sodyum asetat ve 6 g susuz magnezyum sülfat toz karışımı ilave edilmiştir ve 1.5 dk elle çalkalanmıştır. Tüpler, 20 °C'de 4000 rpm'de 5 dk santrifüj (Eppendorf 5810R, Almanya) edilmiştir. Tüpler santrifüj işleminden sonra -18 °C'de bir gece bekletilmiştir. Ekstraktların temizleme (clean-up) aşaması için, 4 mL ekstrakt içerisinde 150 mg PSA (primer sekonder amin), 150 mg C18 ve 900 mg susuz magnezyum sülfat toz karışımı bulunan 15 mL'lik tüplere aktarılmıştır ve tüpler 1.5 dk elle çalkalanmıştır. Tüpler, 20 °C'de 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra 0.8 mL ekstrakt viallere aktarılarak analiz edilmiştir.

Kavanoz mamalarının ekstraksiyon aşaması için 15 g numune 50 mL'lik santrifüj tüpüne tartılmıştır. Üzerine 15 mL %1'lik asetik asit içeren asetonitril ilave edilerek tekrar

30 s elle çalkalanmıştır. Daha sonra, 1,5 g susuz sodyum asetat ve 6 g susuz magnezyum sülfat toz karışımı ilave edilmiştir ve 1,5 dk elle çalkalanmıştır. Tüpler, 20 °C’de 4000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Tüpler santrifüj işleminden sonra -18 °C’de bir gece bekletilmiştir. Ekstraktların temizleme aşaması için, 4 mL ekstrakt içerisinde 150 mg PSA, 150 mg C18 ve 900 mg susuz magnezyum sülfat toz karışımı bulunan 15 mL’lik tüplere aktarılmıştır ve tüpler 1,5 dk elle çalkalanmıştır. Tüpler, 20 °C’de 4000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra 0,8 mL ekstrakt viallere aktarılarak analiz edilmiştir.

3.2.2.2. Hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonu

Hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonu ASE 350 (Dionex, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toz ürünlerin ve kavanoz mamaların ekstraksiyon aşaması için 5 g numune 10 mL’lik paslanmaz çelikten yapılmış ekstraksiyon hücrelerine tartılmıştır. Hücre kapakları sıkı bir şekilde kapatıldıktan sonra hücreler cihaza yerleştirilmiştir. Ekstraksiyon işleminde kullanılan parametreler Çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. ASE parametreleri

Basınç	1500 psi
Sıcaklık	70 °C
Çözgen	%1 asetik asit/asetonitril:metanol (4:1)
Statik süresi	5 dk
Yıkama (Flush) hacmi	%60
Döngü sayısı	3

Ekstraksiyon prosesi 6 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada çözgen hücre içerisine doldurulmaktadır (1 dk). İkinci aşamada içerisinde örnek ve çözgen bulunan hücre ekstraksiyon sıcaklığına kadar ısıtılmaktadır (5 dk). Üçüncü aşamada statik süresi boyunca örnek çözgene maruz kalmaktadır (5 dk). Dördüncü aşamada bir sonraki döngüye geçmeden önce ayarlanan yıkama hacmine bağlı olarak belirli miktarda çözgen hücrenin altında bulunan toplama kaplarına boşaltılırken taze çözgen de hücreye ilave edilmektedir (10 sn). Beşinci aşamada ekstraksiyon işlemi bittikten sonra hücrenin içerisindeki ekstrakt azot gazı aracılığıyla toplama kabına iletilmektedir ve sonra ekstraktın toplama kabına iletildiği hat çözgen ile yıkanmaktadır (1 dk). Son aşamada sistemin basıncı 0 psi’ye düşürülerek sistem bir sonraki ekstraksiyon için hazır hale gelmektedir (1 dk).

Toplama kaplarından 15 ml’lik tüplere 10 mL ekstrakt aktarıldıktan sonra tüpler -18 °C’de bir gece bekletilmiştir. Tüpler, +4 °C’de 4000 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra ekstrakt 0,45 µm’lik naylon filtreden geçirilmiştir. Daha sonra 0,8 mL ekstrakt viallere aktarılarak analiz edilmiştir.

3.2.3. Ultra yüksek performans sıvı kromatografisi

Araştırmada Accela Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak kromatografik ayırım Hypersil Gold aQ (100 mm x 2,1 mm, 1,9 µm, Thermo Scientific, ABD) kolonu ile yapılmıştır. Hareketli faz bileşimleri aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra fazlar sonikatörde 10 dk bekletilmiştir (degas).

Hareketli faz (A): 0,5 mM oksalik asit ve 1 mM amonyum format /su

Hareketli faz (B): 0,2 mM oksalik asit/metanol

Kolon akış hızı 0,5 mL/dk, kolon sıcaklığı 30 °C ve enjeksiyon hacmi 5 µL'dir. Gradyent elüsyon kullanılarak yapılan analizin süresi 10 dakikadır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Hareketli faz oranları

Dakika	A fazı (%)	B fazı (%)	
0	100	0	}
1	100	0	
6	25	75	
6,1	0	100	}
8	0	100	
9	100	0	}
10	100	0	

Analitlerin tespit edilmesi

Kolonun yıkanması

Kolonun şartlandırılması

3.2.4. Kütle spektrometresi

Analizin kütle spektrometresi ile yapılan kısmında Orbitrap Exactive (Thermo Scientific, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Analizler pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. Cihazın kütle kalibrasyonu için kafein (m/z 195), Met-Arg-Phe-Ala amino asitlerinin asetat tuzu (MRFA, m/z 524) ve Ultramark 1621 (m/z 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822) çözeltilerinin karışımından oluşan pozitif iyon mod kalibrasyon çözeltisi kullanılmıştır. Cihazın kalibrasyonu ve ayarlama (tune) işlemi kullanım rehberinde belirtildiği gibi yapılmıştır (Anonymous 2009b). Cihazın ayarlama işlemi yapılırken elde edilen ekran görüntüsü Ek-1'de verilmiştir. Cihazda Exactive Tune 2.0 ve Xcalibur 2.1 yazılımı kullanılmıştır. Analitlere ait kromatogramlar 5 ppm kütle aralığında (toleransında) ve analit kütleleri virgülden sonra 5 ondalıklı olarak değerlendirilmiştir. Analizörde tespit yapılırken cihazın kontrol panelinde belirtilen tarama (scan) ve iyon kaynağı (HESI) parametrelerinin değerleri Çizelge 3.4'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. Kontrol panelindeki parametrelerin değerleri

Tarama panelindeki parametreler		HESI panelindeki parametreler	
Tarama aralığı (m/z)	150-400	Sheath gaz akış hızı	40
Parçalanma	HCD gas on	Auxiliary gaz akış hızı	10
Çözünürlük	Ultra high	Sprey voltajı (kV)	4
Polarite	Positive	Kapiler sıcaklığı (°C)	250
Mikrotarama	1	Kapiler voltajı (V)	60
Kilit kütle	Off	Tube lens voltajı (V)	120
AGC*	Balanced	Skimmer voltajı (V)	20
Maksimum enjeksiyon süresi (ms)	20	Isıtıcı sıcaklığı(°C)	350

*Ultra high (100000)

*Automatic gain control (1x10⁶)

3.2.5. Metot validasyonu

Metot validasyonu, Avrupa Birliği Komisyon Kararı'na (No:2002/657/EC) uygun olarak yapılmıştır (Anonymous 2002).

3.2.5.1. Doğrusallık ve ölçüm aralığı

Ölçüm aralığının belirlenmesi, metodun uygulama aralığının belirlenmesi açısından önemlidir. Doğruluk ve kesinlik çalışmaları bu aralığı kapsayacak konsantrasyonlarda yapılmaktadır. Doğrusallık, kalibrasyon eğrisinde ölçülen analit konsantrasyonunun ve ölçüm cihazından elde edilen yanıtın doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır. Her bir analit için matriks uyumlu kalibrasyon grafiği altı farklı konsantrasyonda (0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 µg/kg) hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için iki tekrarlı okuma yapılmıştır. Elde edilen sonuçların doğrusallığı, korelasyon katsayısının karesi (r^2) hesaplanarak değerlendirilmiştir.

3.2.5.2. Seçicilik

Seçicilik, analiz için uygulanan metodun, analiti örnek matriksindeki diğer bileşiklerden ayırt edebilme yeteneğidir. Seçicilik, kör numunelerin ve belirli konsantrasyonda analitleri içeren zenginleştirilmiş numunelerin analizi sonucunda elde edilen kromatogramların karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Kromatogramlarda analitlerin alıkonma zamanlarında olası girişim unsurlarının olup olmadığı kontrol edilmiştir (Kaklamanos vd 2013).

3.2.5.3. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)

Tespit limiti, zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilebilen fakat değeri tam olarak ölçülemeyen en düşük analit konsantrasyonudur. LOD'nin belirlenmesi için örnek körü üzerine antibiyotik standart karışımından cihazda görülebildiği ve tekrarlanabilirliğinin yapılabildiği en düşük konsantrasyonda analitler ilave edilerek aynı gün içerisinde 10 ayrı analiz yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda elde edilen değerlerin

standart sapması hesaplanmış ve bu değerin 3 katı LOD değeri olarak belirtilmiştir. Tayin limiti ise, kabul edilebilir doğrulukta ve kesinlikte ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonudur. LOQ, LOD'nin tespit edilmesi için yapılan analizler sonucunda hesaplanan standart sapmanın 10 katı alınarak belirlenmiştir.

3.2.5.4. Doğruluk ve kesinlik

Doğruluk, analiz sonucunda elde edilen verilerin gerçek değere; kesinlik ise ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Doğruluk, laboratuvar örneklerinin doğrusal aralıktaki belirli konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2.5 µg/kg) standart maddeler ile zenginleştirilerek yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda elde edilen değerler; kesinlik ise elde edilen bu değerlerin bağıl standart sapması (%RSD) ile değerlendirilmiştir. Geri kazanım oranı (%R) ve yüzde bağıl standart sapma değerleri sırasıyla 3.1 ve 3.2'deki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%R = \frac{\text{zenginleştirilmiş örneğin cihazda belirlenen konsantrasyonu}}{\text{zenginleştirme konsantrasyonu}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\%RSD = \frac{\text{standart sapma}}{\text{ortalama geri kazanım}} \times 100 \quad (3.2)$$

Kesinliğin, tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik olmak üzere 2 ayrı ölçümü mevcuttur. Tekrarlanabilirlik, aynı gün içerisinde 3 farklı konsantrasyonda yapılan ve her bir konsantrasyonda 6 kez tekrarlanan analiz sonucunda elde edilen değerlerin; tekrarüretilebilirlik ise, tekrarlanabilirlik çalışmasının 3 farklı günde yapılması sonucunda elde edilen değerlerin bağıl standart sapması hesaplanarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. UHPLC’de Metot Geliştirme

Metot oluşturma aşaması ilk önce Ultra Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (UHPLC) kısmında gerçekleştirilmiştir. UHPLC’de metot geliştirmenin ilk aşaması kromatografik modun veya tekniğin seçimidir. Bu çalışmada ters-faz kromatografi kullanılmıştır. Burada sabit faz apolar, hareketli faz ise polar özelliğe sahiptir. Bu yöntem polar ve iyonik analitlerin analizi için oldukça uygundur. Literatürde antibiyotik analizi için yapılan çalışmalarda genel olarak analitlerin ayrımı için ters-faz kromatografi uygulanmıştır. Kromatografik yöntem seçildikten sonra analitlerin iyi bir şekilde ayrımını sağlayacak koşulların seçimi, metot geliştirmenin diğer aşamasıdır. Kromatografik ayırmalarda kolon dolgu maddesinin, partikül boyutunun, kolon uzunluğunun, akışın gradiyent veya izokratik olmasının, hareketli fazın akış hızının, sıcaklığın ve enjeksiyon hacminin etkileri vardır (Niessen 2006).

Ters-faz kromatografide analitin iki faz arasındaki dağılımı, analitin polaritesine bağlı olarak adsorpsiyon-desorpsiyon şeklinde dönüşümlü olarak değişmektedir. Sabit fazın analitlerin tutulmasına ve ayrılmasına etkisinin araştırıldığı çalışmalarda genel olarak antibiyotiklerin C₁₈ dolgu materyalinin olduğu sabit fazda iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (Frenich vd 2014). Bu çalışmada kullanılan kolonun (Hypersil GOLD, Thermo Scientific, ABD) özelliği, 18 karbonlu hidrokarbondan (C₁₈) oluşan apolar sabit faz üzerine polar bileşiklerin ilave edilmesidir (endcapped). Böylece polar bileşiklerin tutulmasında daha yüksek verim elde edilmesine ilave olarak bu özellikteki bileşiklerin kuyruk oluşumu önlenmekte ve düzgün pik şekilleri elde edilmektedir. Ayrıca analizde yüksek oranda su fazı içeren hareketli fazların (%100’e kadar) kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu kolon ile en fazla 1250 bar basınçta, 60 °C sıcaklıkta ve pH 2-9 aralığında çalışılmaktadır (Anonymous 2013). LC’de metot geliştirme aşamasında kullanılan hareketli faz bileşimi, akış hızı ve kolon sıcaklığı parametrelerinin değerleri kolonun bu özellikleri dikkate alınarak belirlenmiştir. Literatür çalışmalarında kolon partikül çapının azaltılmasının (<2 µm), kolon etkinliğini arttırarak piklerin daha keskin ve simetrik olmasını sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca yapılan bir çalışmada, 50 ve 100 mm uzunlukta aynı dolgu materyaline (C₁₈) sahip iki kolonun ayırma kapasitesi incelendiğinde, 100 mm uzunluğundaki kolon ile daha iyi sonuçların elde edildiği tespit edilmiştir (She vd 2010).

Hareketli faz kromatografik ayrımın iyi bir şekilde sağlanması için önemlidir. Bu duruma ilave olarak, analit iyonizasyonu ve kütle spektrometresinin duyarlılığı açısından da analizde etkili olmaktadır (Blasco ve Picó 2007). Kromatografik ayırmalarda kullanılan hareketli fazın seçiminde viskozite önemli bir parametredir. Düşük viskoziteli sıvılar belirli akış hızında yüksek viskoziteli sıvılara göre daha düşük basınç oluşturmaktadır. Sıvı kromatografisinde yaygın olarak kullanılan su, metanol ve asetonitrilin viskoziteleri sırasıyla 1, 0.6 ve 0.37 mPA.s’dir. Suyun viskozitesi baz alınarak, 1’den büyük viskozite değerine sahip sıvılar sistemde yüksek basınca neden olduklarından dolayı sıvı kromatografisi için uygun değildir (Meyer 2010). Hareketli fazın akış hızının belirlenmesinde pik şeklinin ve sinyal seviyesinin (NL) yanısıra fazın sistemde oluşturduğu basınç da göz önünde bulundurulmuştur.

Analizde hareketli faz için kullanılacak organik sıvılar belirlendikten sonra kromatografik ayırma gradyent veya izokratik elüsyondan hangisinin kullanılacağı belirlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde gradyent elüsyonun izokratik elüsyona göre analit ayırımlarında daha verimli olduğu belirlenmiştir (Wang vd 2006). Bu yüzden, bu çalışmada gradyent elüsyon kullanılmıştır. Analizde gradyent elüsyon kullanıldığında su-organik faz oranları iyonizasyonda oldukça önemlidir. Organik sıvıların ESI’de iyonizasyonu iletkenliklerine ve yüzey gerilimlerine bağlı olarak azalmakta veya artmaktadır. Yüzey gerilimi yüksek olan sıvıların iyonizasyonda stabil sprey oluşturması ve yüklü damlacıklardan buharlaşarak uzaklaşması oldukça zor olmaktadır. Bu yüzden, yüzey gerilimi metanol veya asetonitrile göre daha yüksek olan suyun hareketli fazda %70-80 oranından fazla kullanılması duyarlılığı azaltmaktadır. Ancak, yüksek oranda organik faz kullanılması da duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır. Çünkü saf organik çözücülerin iletkenlikleri oldukça düşüktür. Hareketli fazda belirli oranlarda suyun kullanılması damlacık oluşumunu iyileştirmektedir (Blasco ve Picó 2007). Bu çalışmada kullanılan hareketli faz oranları bu bilgiler dikkate alınarak belirlenmiştir. Ayrıca ters-faz kromatografide başlangıç profili genel olarak %90’ın üzerinde su fazı ile başlayıp zamanla elüsyon asetonitrilin veya metanolün gradyent olarak su fazı ile karışması ile devam etmektedir (Wang ve Turnipseed 2012).

Sülfonamid grubu antibiyotikler amfoterik yapıda bileşikler olduklarından dolayı pH değerinin düşük olduğu koşullarda bileşik moleküler formundan katyonik (+) formuna, pH değerinin yüksek olduğu koşullarda ise anyonik (-) formuna dönüşmektedir (Carda-Broch ve Berthod 2004). Hareketli faz ile ilişkili olarak pik şeklini ve/veya kütle spektrometresi kısmında analitin iyonizasyonunu iyileştirmek amacıyla hareketli faz asetik asit, formik asit, amonyum asetat ve amonyum format gibi katkıları ilave edilerek hazırlanmaktadır (Frenich vd 2014). Asetik asit (CH_3COOH) ve formik asit (HCOOH) bu amaçla en yaygın kullanılan düşük molekül ağırlıklı, uçucu organik asitlerdir ve hareketli fazda genel olarak %0,1-0,3 konsantrasyon aralığında bulunmaktadır. Bu asitlerin yaygın kullanılmasının başlıca 2 sebebi vardır. Bunlardan birincisi, birçok kromatografik ayırmanın analit tutulması ve pik şekli açısından asidik koşullarda daha iyi gerçekleşmesidir. İkincisi ise birçok kütle spektrometresi ölçümünün pozitif iyon modunda yapılmasıdır. Bu asitler pozitif modda moleküllere proton ilavesi sonucunda moleküler iyon $[\text{M}+\text{H}]^+$ oluşmasına olanak sağlamaktadır (Emmert 2006). Asitlerin yanı sıra, analitlerin asitlere duyarlı olduğu veya düşük pH’da ayırımının sağlanamadığı ve nötral koşulların gerekli olduğu durumlarda bu asitlerin yerine amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) ve amonyum format (HCOONH_4) gibi uçucu tuzları hareketli faza ilave edilmektedir. Ancak asitlerle kıyaslandığında bu tuzların kullanımında bazı sınırlamalar mevcuttur. Bunlardan bir tanesi bu tuzların organik çözücülerde çözünürlüğünün düşük olmasıdır; diğeri ise gradyent akışta pH değişimlerine neden olmasıdır. Bu tuzların suda çözünürlüğü oldukça iyidir, metanolde orta düzeyde ve asetonitrilde ise oldukça düşüktür. Bu özellikleri hareketli fazın asetonitril seçildiği koşullarda sistemde sorunlara neden olmaktadır (Emmert ve Leitner 2006). Genel olarak ESI sisteminin kullanıldığı durumlarda bu tuzların en fazla 10 mM konsantrasyonda kullanılmaları iyonizasyon kaynağının etkinliği açısından önemlidir (Kromidas 2008).

Kromatografide yaygın olarak kullanılan organik asitlerin veya tuzlarının yanı sıra oksalik asidin ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) de hareketli faza ilave edildiği çalışmalar literatürde

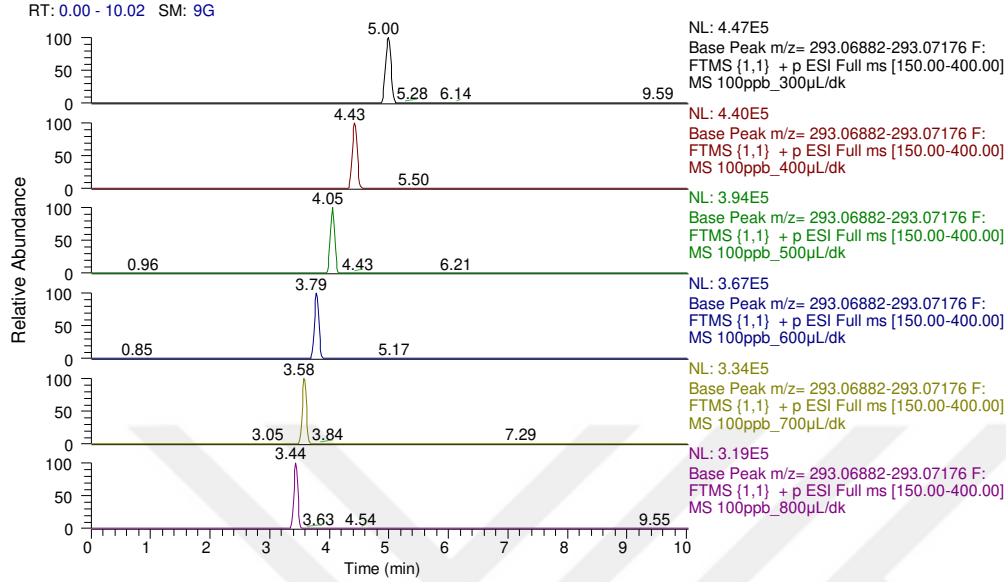
mevcuttur. Bu çalışmalardan bir tanesinde ette farklı gruplardaki antibiyotik analizinde sulu hareketli faza formik asite (%0,2) ilave olarak 0,1 mM oksalik asit ilave edilmiştir (Granelli vd 2009). Koesukwiwat vd (2007) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise sütte farklı grup antibiyotiklerin analizinde iki hareketli fazda 1 mM oksalik asit kullanılmıştır. Genel olarak oksalik asidin düşük uçuculuk özelliğinden dolayı ESI-MS sistemlerinde hareketli faza ilave edilmesi tercih edilmemektedir. Ancak bu asidin düşük konsantrasyonlarda ve spreyin doğrudan analizörün girişi ile aynı doğrultuda tutulmadığı durumlarda kullanılması ile rutin analizlerde iyon kaynağının tıkanması engellenebilmektedir.

Bu kısımda akış hızı, kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi değerlerinin belirlenmesinin yanısıra su ve sıvı faz olmak üzere iki hareketli fazın bileşimindeki değişimlerin analitlerin cihazda gösterdiği sinyal büyüklüğü üzerine etkisi incelenmiştir. Analitlerin 5 ppm'lik standart karışımı metanol ile 100 ppb'ye seyreltilmiştir. Analizler bu konsantrasyonda yapılmıştır. UHPLC cihazında metot geliştirme aşamasında başlangıç parametreleri olarak Granelli vd (2009) tarafından LC-MS/MS cihazı kullanılarak geliştirilen hareketli faz bileşimleri, akış hızı, kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi değerleri baz alınmıştır. Bu değerler; hareketli faz (A) 0,1 mM oksalik asit/su (pH:3,89), hareketli faz (B) %0,2 formik asit/MeCN (pH:2,50), kolon akış hızı 0,3 mL/dk, kolon sıcaklığı 40 °C ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Kütle spektrometresinde kullanılan parametreler ise sheath gaz akış hızı 50 birim, auxiliary gaz akış hızı 20 birim, sprey voltajı 4 kV, kapiler sıcaklığı 275 °C, kapiler voltajı 60 V, tube lens voltajı 120 V, skimmer voltajı 20 V ve ısıtıcı (heater) sıcaklığı 350 °C'dir.

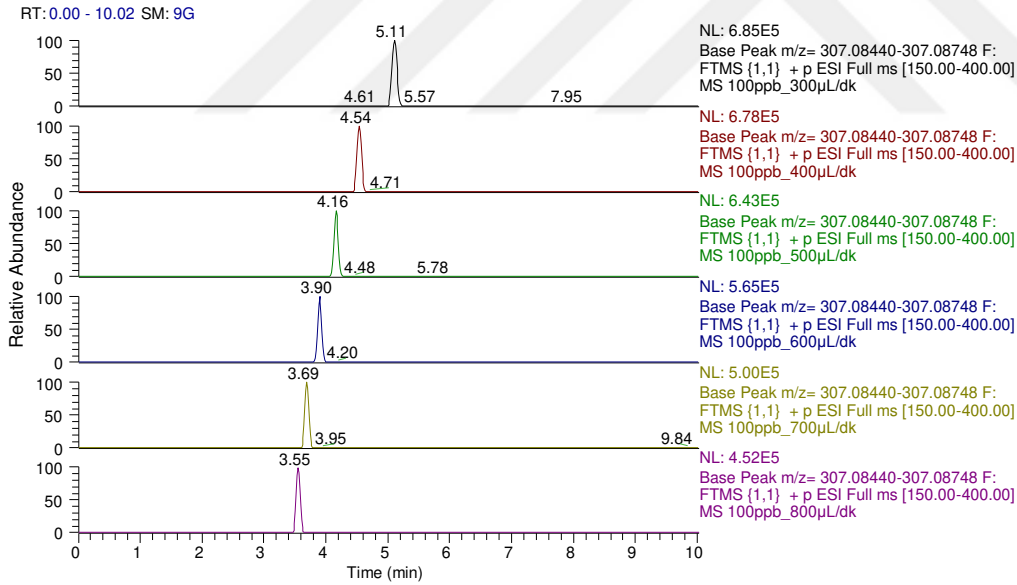
4.1.1. Akış hızını belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları

Çalışma kapsamında kullanılan her bir antibiyotiğin farklı akış hızlarında (0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 ve 0,8 mL/dk) belirlenen sinyal seviyeleri ve pik şekilleri tespit edilmiştir. Literatürde genel olarak iyonizasyon veriminin akış hızı düştükçe arttığı belirtilmektedir. Bu artışın başlıca nedeni ise düşük akış hızında spreyde daha küçük yüklü damlacıkların oluşmasıdır. Bu damlacıklardan çözücünün uzaklaşması daha kolay olduğu için analizöre giren yüklü partiküllerin miktarı artmaktadır (Page vd 2007). Yapılan bu çalışmada analitlerin sinyal seviyelerinin yüksek akış hızında (0,7 ve 0,8 mL/dk) düştüğü tespit edilmiştir. Akış hızı aynı zamanda analitlerin kolonda etkili bir şekilde ayrımı ve keskin pik şekillerinin elde edilmesi açısından da önemlidir. Pik şeklinin düzgün olması miktar belirleme çalışmalarında dikkate alınmaktadır. Kromatografide ideal koşullarda pik şekilleri genellikle Gaussian eğrilerine benzemektedir ve simetriktir. Ancak çalışma sırasında birçok pikin önünde (fronting) genişleme veya arkasında kuyruk (tailing) oluşumundan dolayı simetrik olmadığı gözlemlenmiştir. Kolonda meydana gelen bant genişlemesi analitlerin kolonda kalma süresi ve hareketli fazın akış hızı ile bağlantılıdır. Pikin arkasında oluşan kuyruk analitin sabit faz ile arasındaki adsorpsiyon, önünde oluşan genişleme ise kolonun fazla yüklenmesi veya analitin kolondaki kimyasal reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (Dong 2006). Şekil 4.1-4.16 incelendiğinde düşük akış hızlarında (0,3 ve 0,4 mL/dk) özellikle sülfadiazin, sülfamerazin, sülfapiridin ve sülfatiazol analitlerinde piklerin önünde genişleme veya arkasında kuyruk oluşumu belirlenmiştir. Düşük akış hızlarında bu analitlerin piklerinin geniş olması sabit faz ile daha fazla etkileşime girdiklerini göstermektedir. Ayrıca kromatogramda yanyana pik veren sülfametoksipiridazin ve

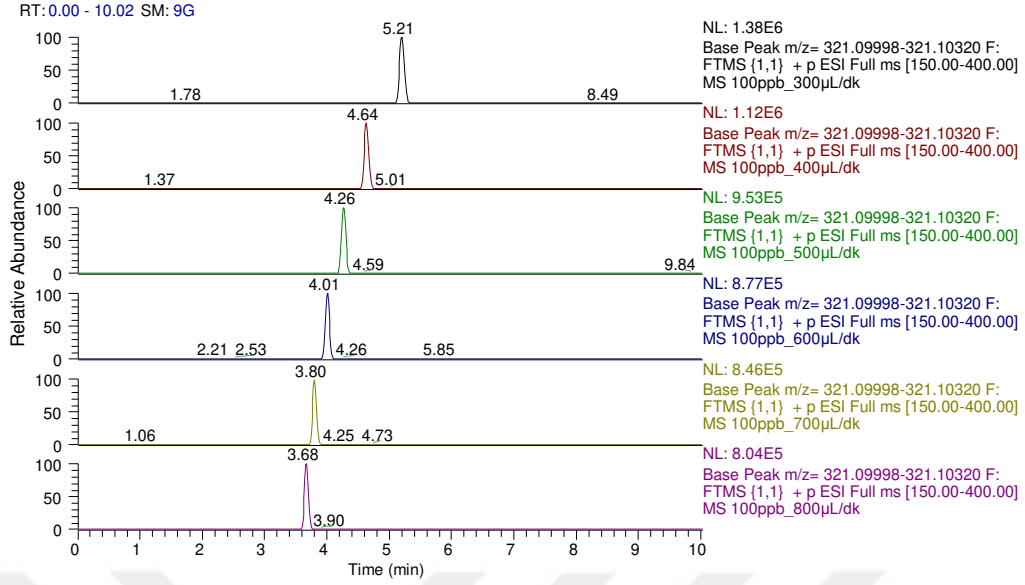
sülfamometoksin analitlerinin ayrımı akış hızı düştükçe kötüleşmektedir (Şekil 4.12). Sonuçlar incelendiğinde 0,6 mL/dk akış hızının hem analitlerin vermiş olduğu sinyal seviyesi hem de pik şekilleri açısından en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir.



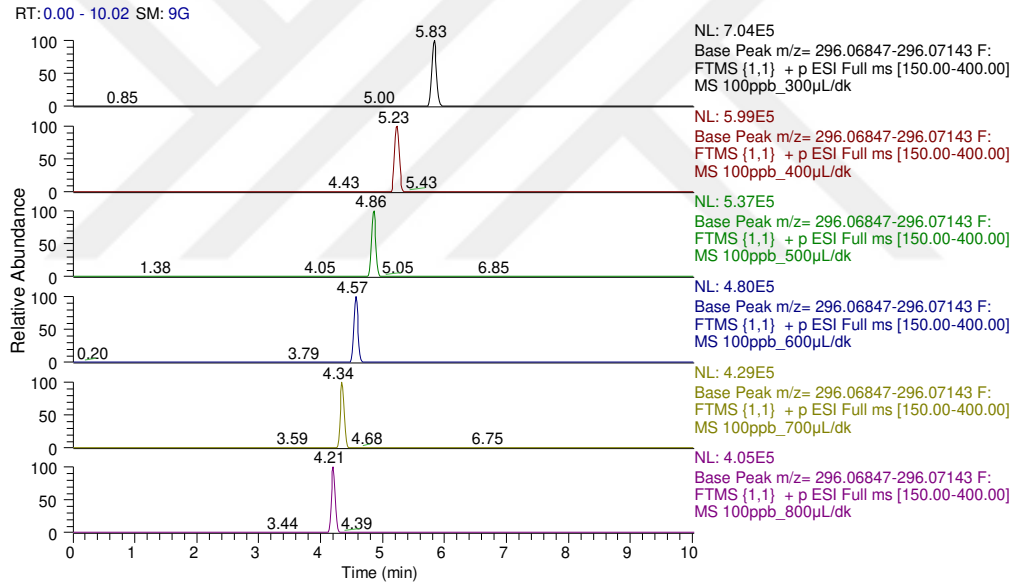
Şekil 4.1. N-asetilsülfadiazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



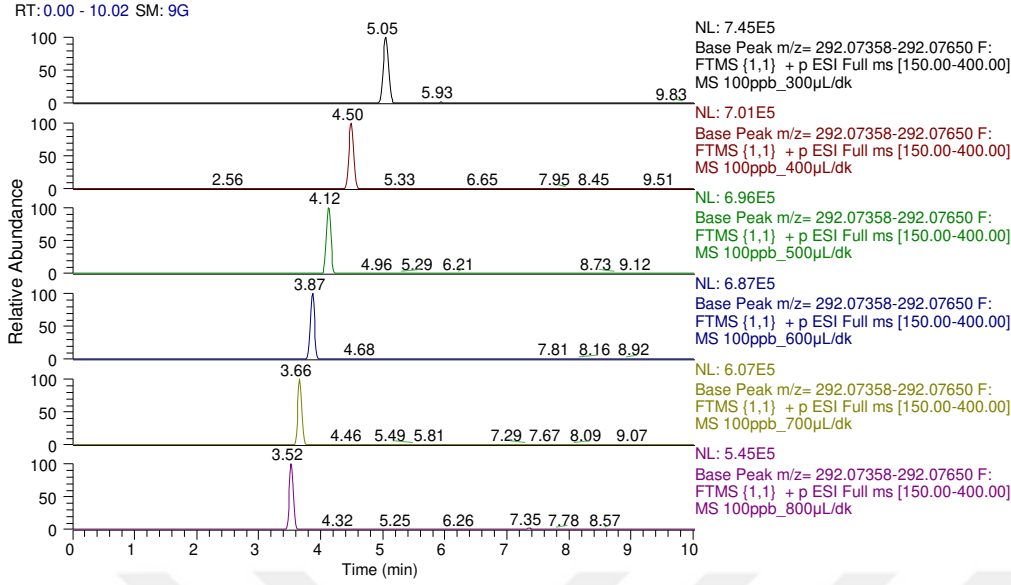
Şekil 4.2. N-asetilsülfamerazini için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



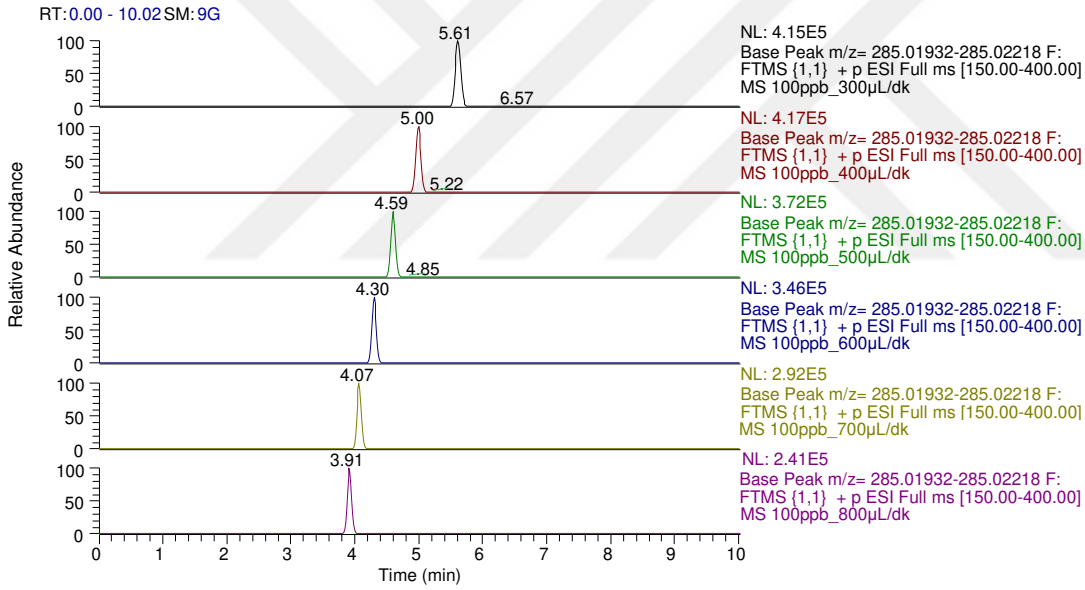
Şekil 4.3. N-asetilsülfametazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



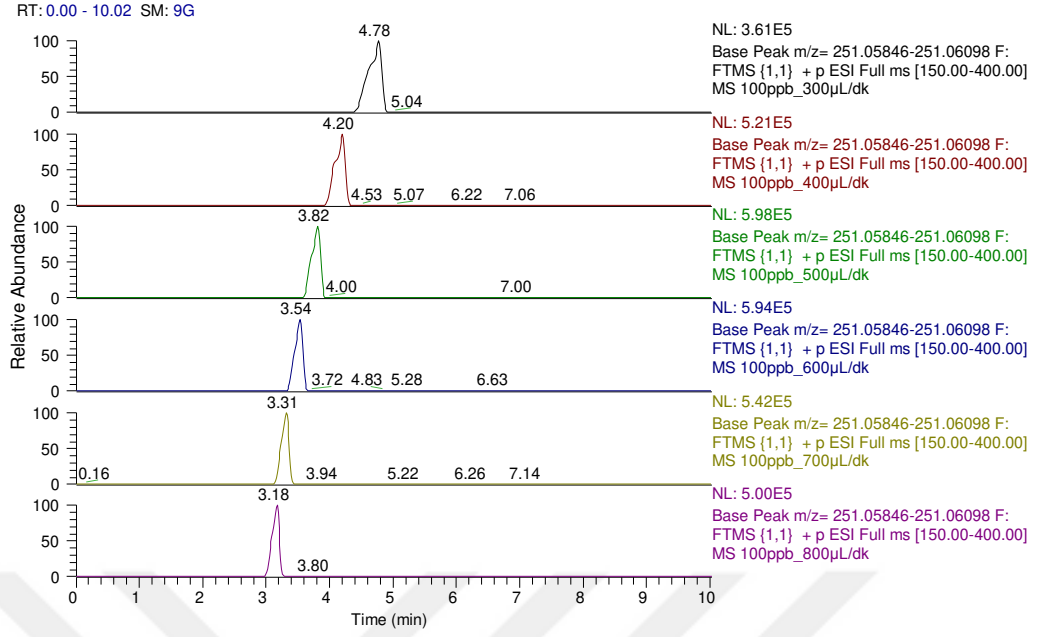
Şekil 4.4. N-asetilsülfametoksazol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



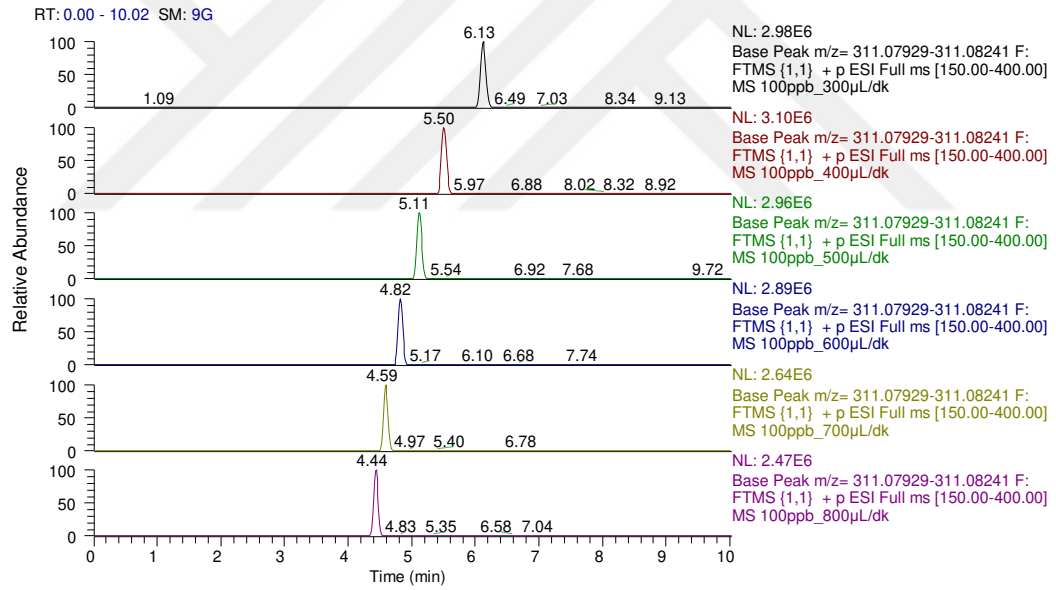
Şekil 4.5. N-asetilsülfapiridin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



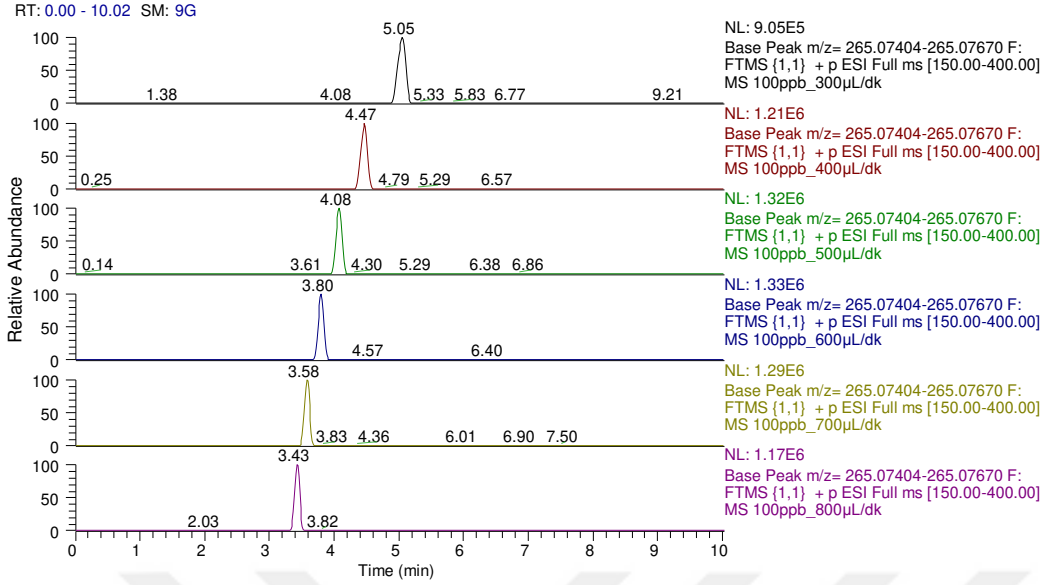
Şekil 4.6. Sülfakloropiridazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



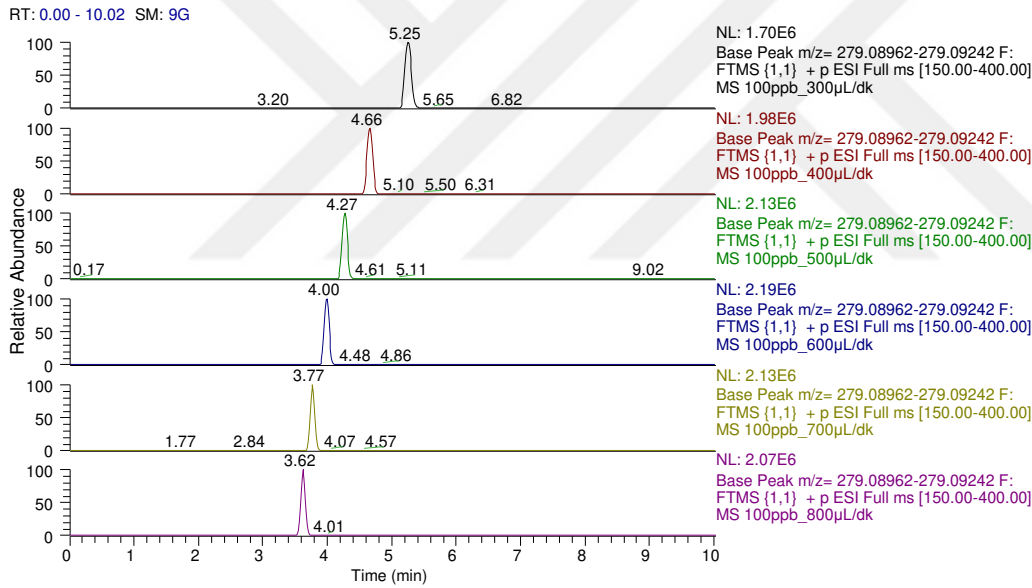
Şekil 4.7. Sülfadiazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



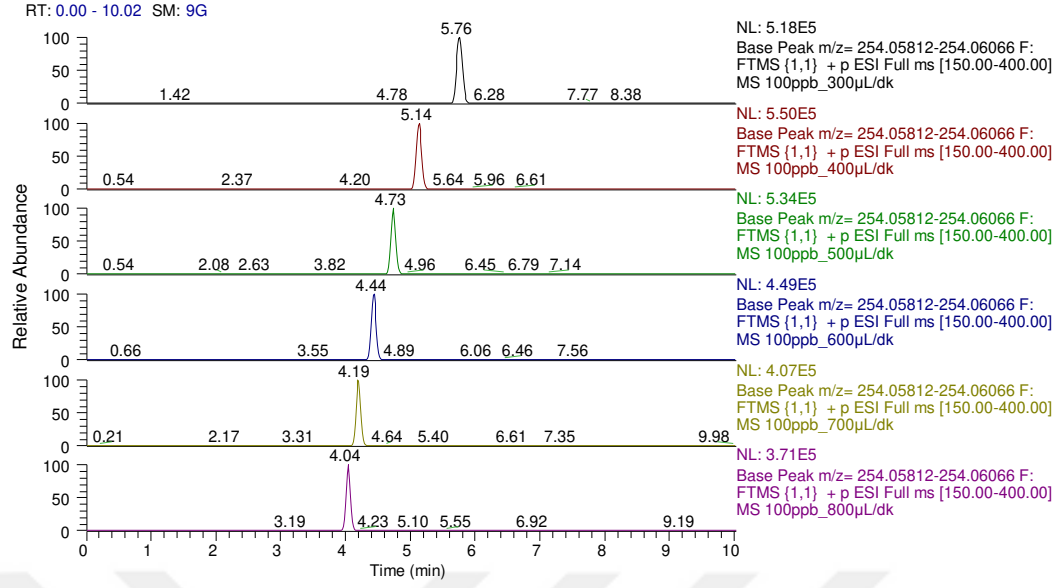
Şekil 4.8. Sülfadimetoksin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



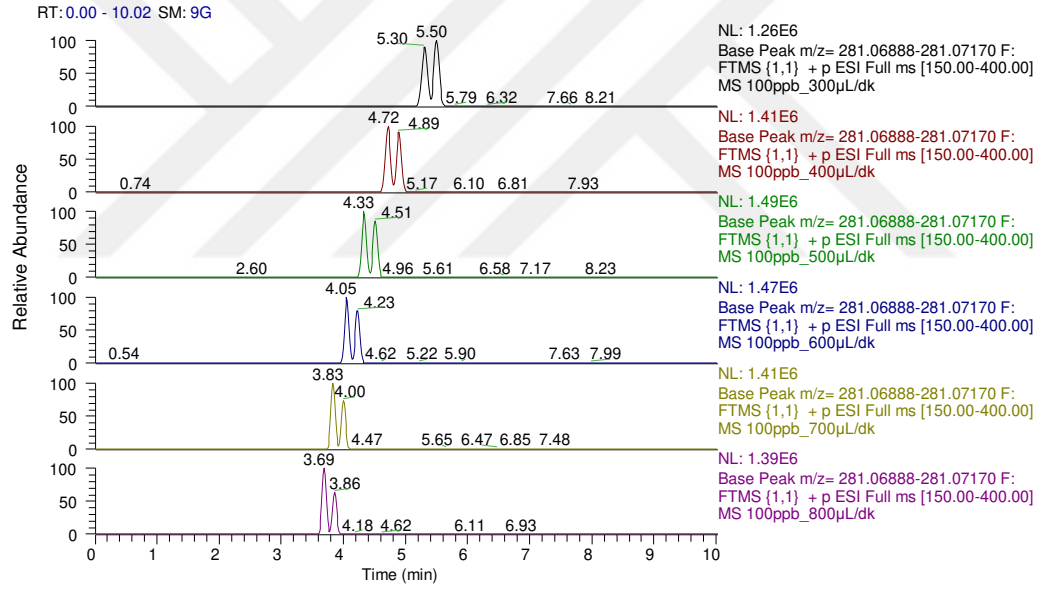
Şekil 4.9. Sülfamerazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



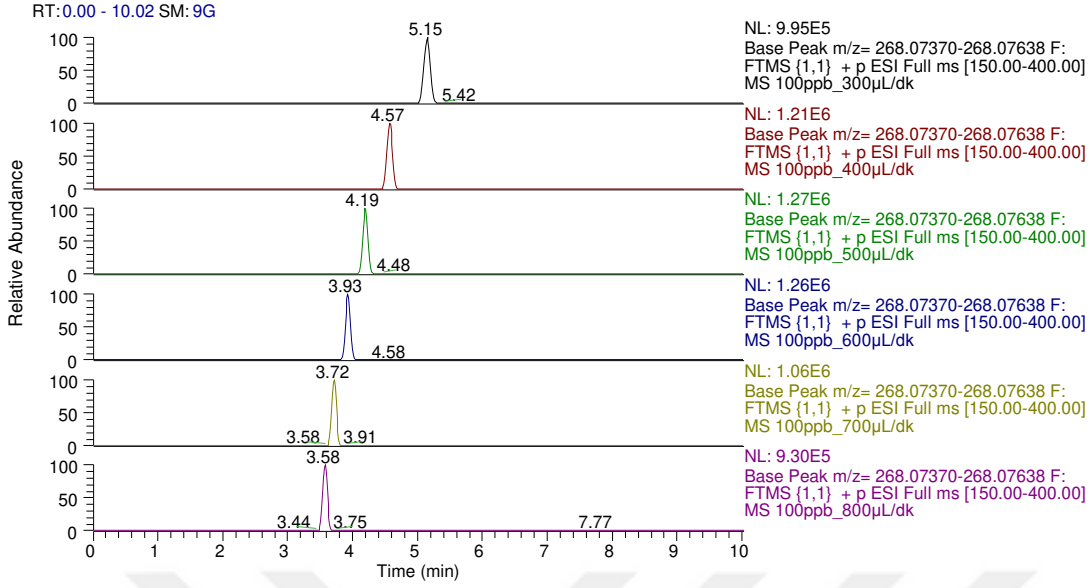
Şekil 4.10. Sülfametazin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



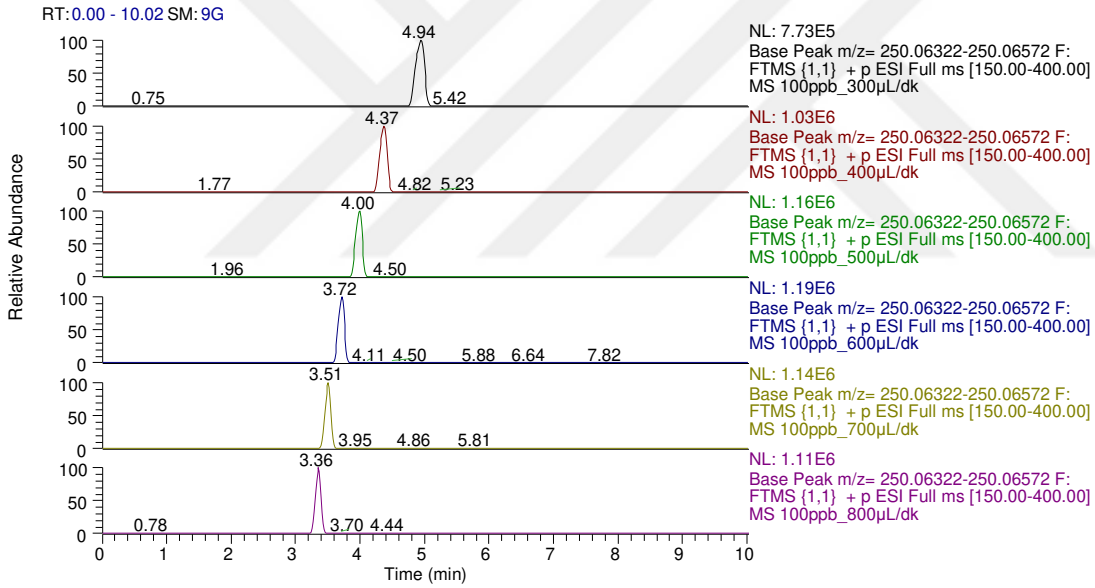
Şekil 4.11. Sülfametoksazol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



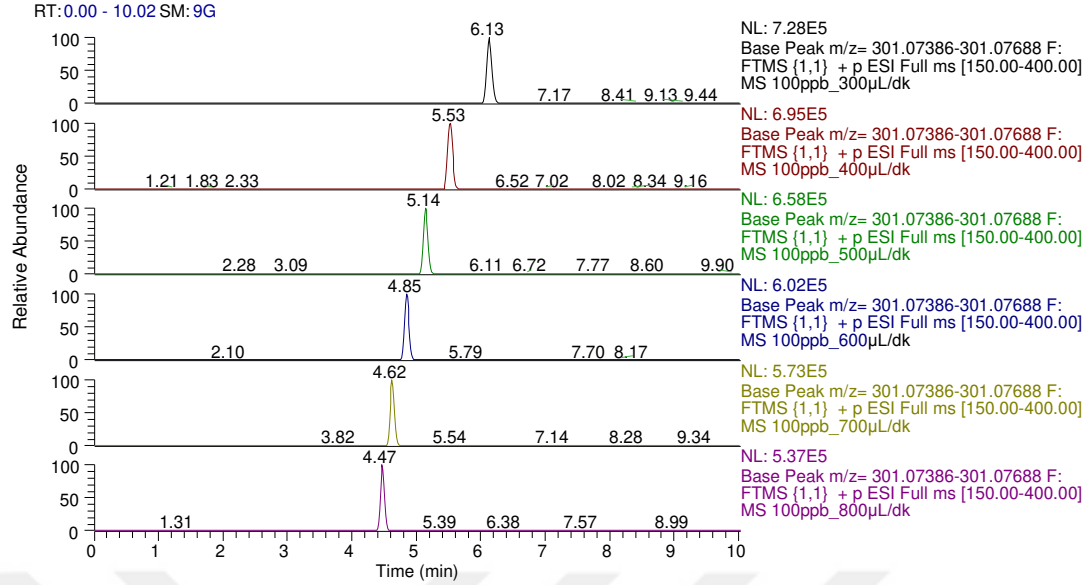
Şekil 4.12. Sülfametoksipiridazin-Sülfamonometoksin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



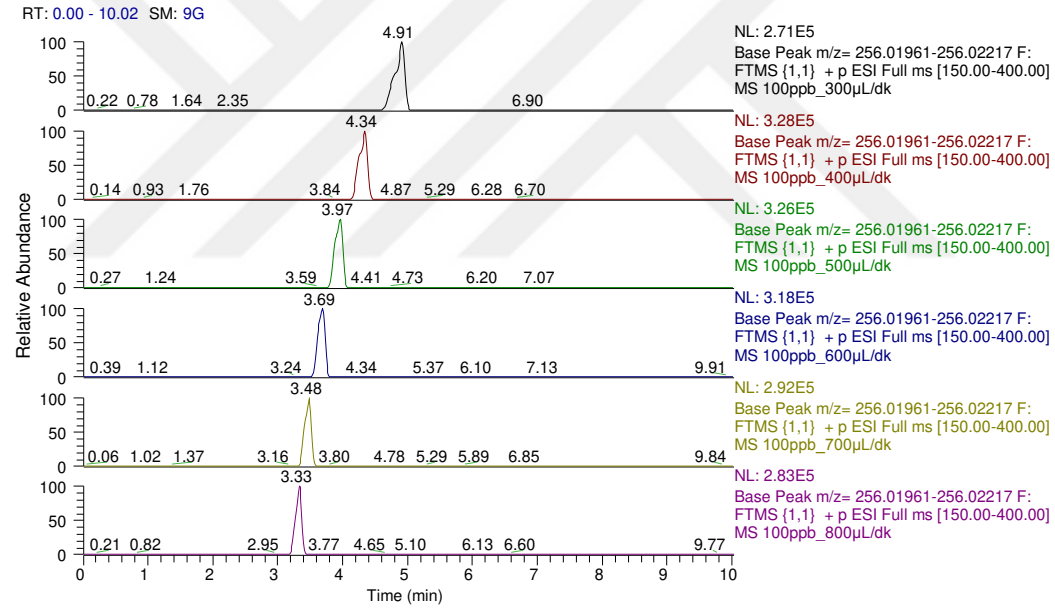
Şekil 4.13. Sülfamoksol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



Şekil 4.14. Sülfapiridin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar



Şekil 4.15. Sülfakinoksalin için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar

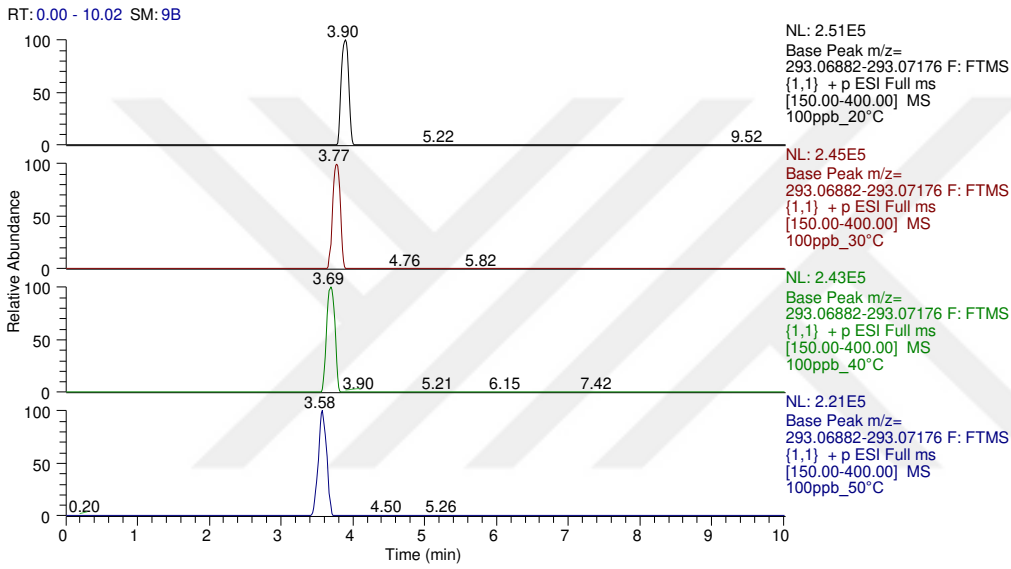


Şekil 4.16. Sülfatiazol için farklı akış hızlarına ait kromatogramlar

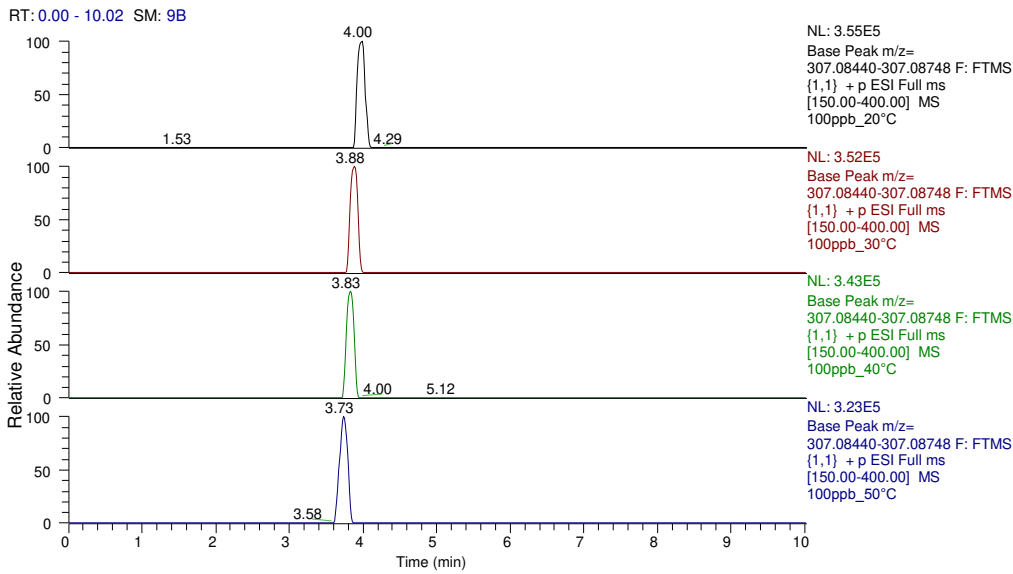
4.1.2. Kolon sıcaklığını belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları

Hareketli faz akış hızı 0,6 mL/dk olarak belirlendikten sonra farklı kolon sıcaklıklarının (20, 30, 40 ve 50 °C) sinyal seviyesi ve pik şekli üzerine etkisi incelenmiştir. Kolon sıcaklığı analit ile durgun faz arasındaki etkileşimi, hareketli fazın viskozitesini ve durgun faz yapısının hareketli faz içerisinde çözünmesini etkilediğinden dolayı kromatografik ayrımlar üzerine doğrudan etki etmektedir. Kromatografik analizde yüksek sıcaklıkların kullanılması sıcaklığa duyarlı bileşiklerin yapısının olumsuz etkilenmesine neden olduğu gibi hareketli fazda baloncuk oluşumuna ve kromatogramda hayalet veya negatif piklerin görünmesine de neden olmaktadır.

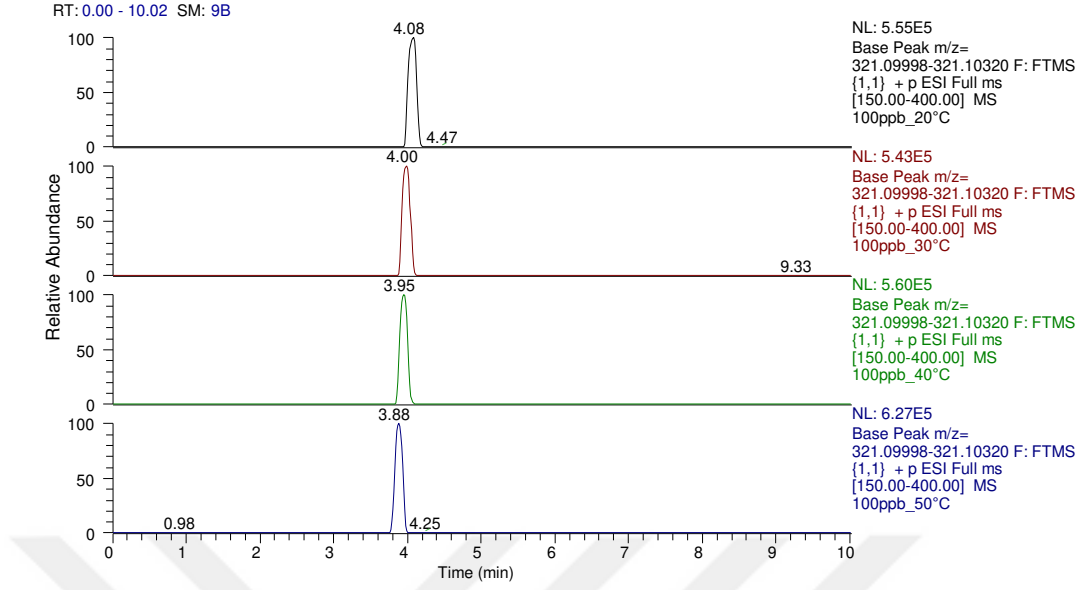
Bunlara ilaveten sıcaklık artışı pik çözünürlüğünü düşürmektedir. Ayrıca 50 veya 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda sabit fazın yapısında çözünmeler olabilmekte ve buna bağlı olarak kolonun kullanım ömrü azalmaktadır (Kromidas 2000). Şekil 4.17-4.32 incelendiğinde sıcaklık artışının analitlerin sinyal seviyesini düşürdüğü ve özellikle sülfadiazin, sülfamoksol, sülfapiridin ve sülfatiazol analitlerinin kromatogramdaki pik şekillerinin 40 °C'de ve üzerinde bozulduğu tespit edilmiştir. Sülfametoksipiridazin ve sülfamonometoksin piklerinin ayrımı da sıcaklık arttıkça azalmaktadır (Şekil 4.28). Kolon sıcaklığının artışı analitlerin elüsyonunu hızlandırmasına rağmen ayırma etkinliğinin düşmesine neden olmuştur. Analiz sonuçları incelendiğinde 20 veya 30 °C sıcaklıklarda yapılan analizlerin hem sinyal seviyesi hem de pik şekli açısından en iyi sonuçları verdiği tespit edilmiştir. Analitler 30 °C'de kolonda daha erken tespit edildiği için analiz süresini kısaltmak amacıyla bu sıcaklıkta analizlere devam edilmiştir.



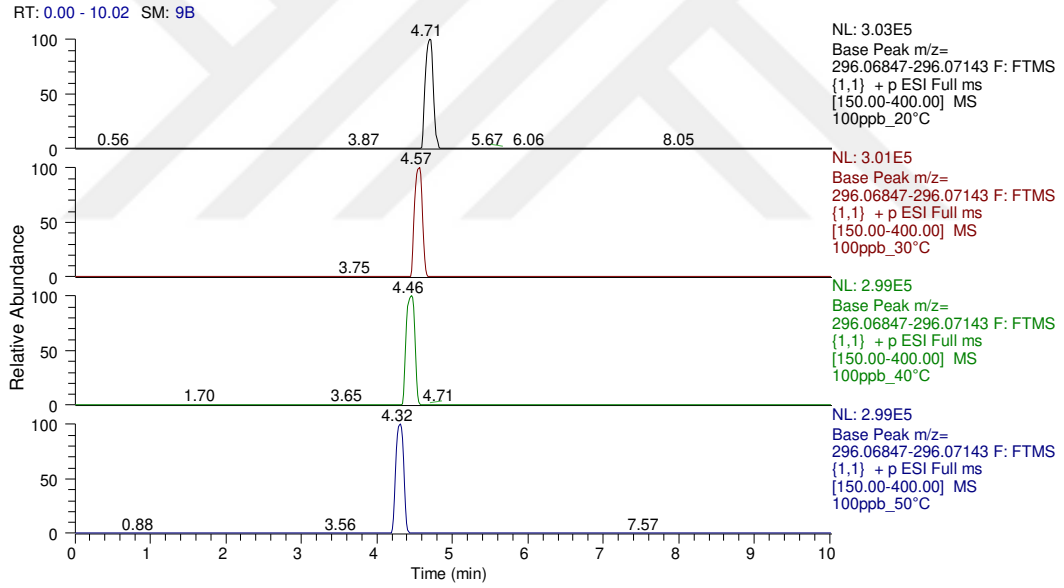
Şekil 4.17. N-asetilsülfadiazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



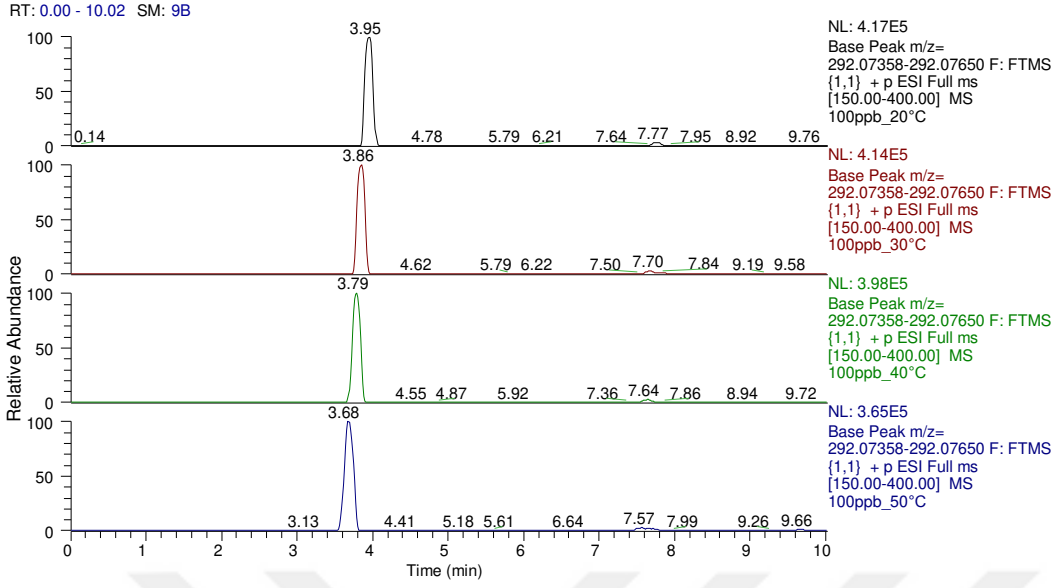
Şekil 4.18. N-asetilsülfamerazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



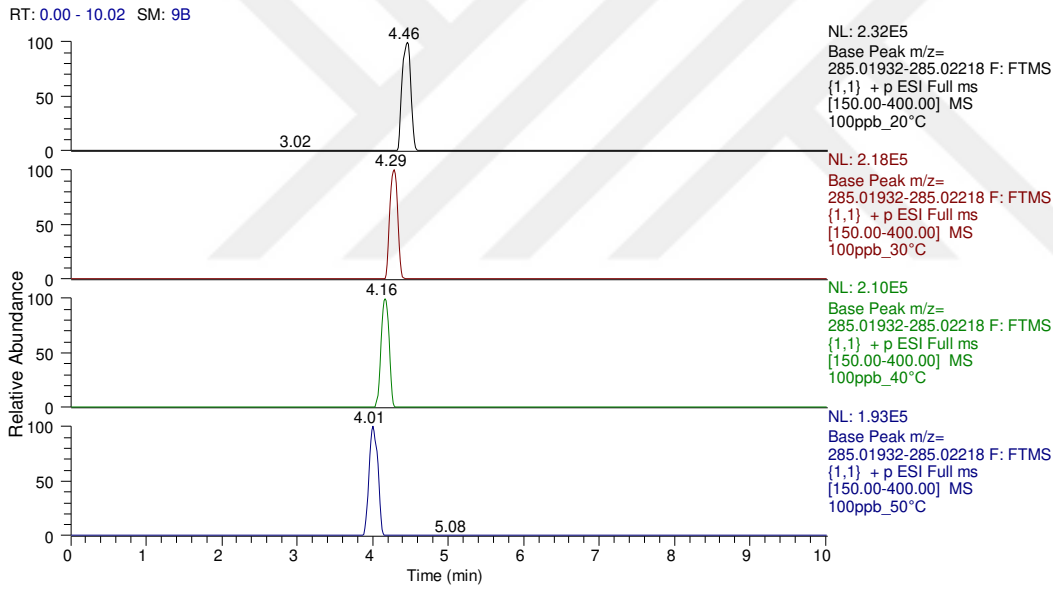
Şekil 4.19. N-asetilsülfametazın için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



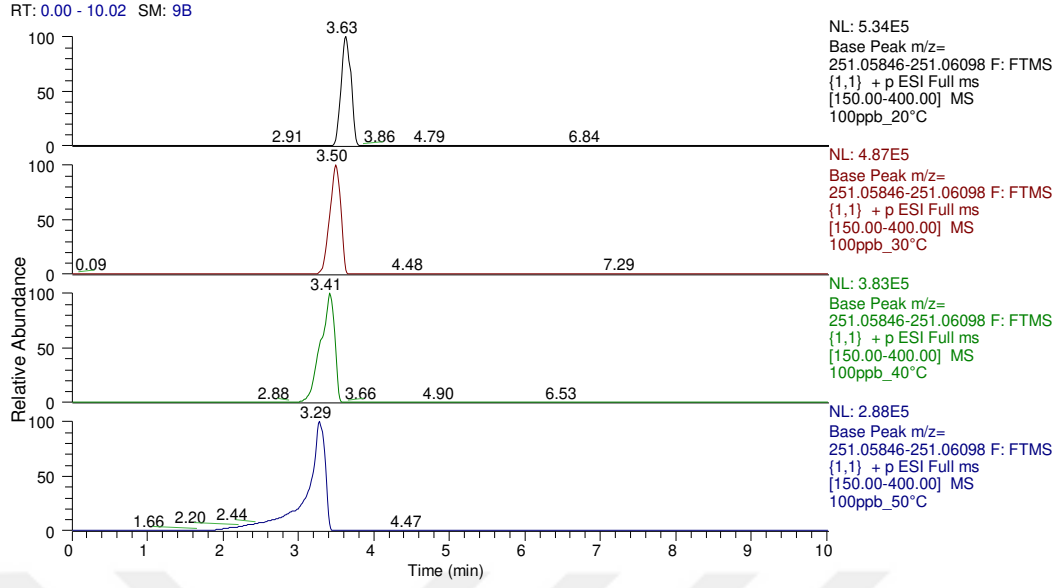
Şekil 4.20. N-asetilsülfametoksazol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



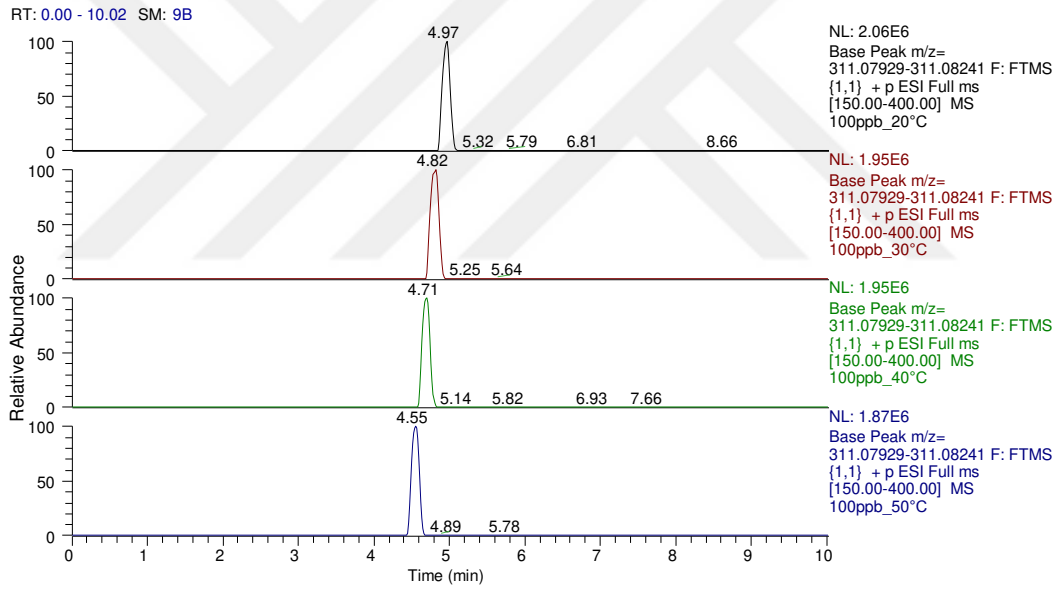
Şekil 4.21. N-asetilsülfapiridin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



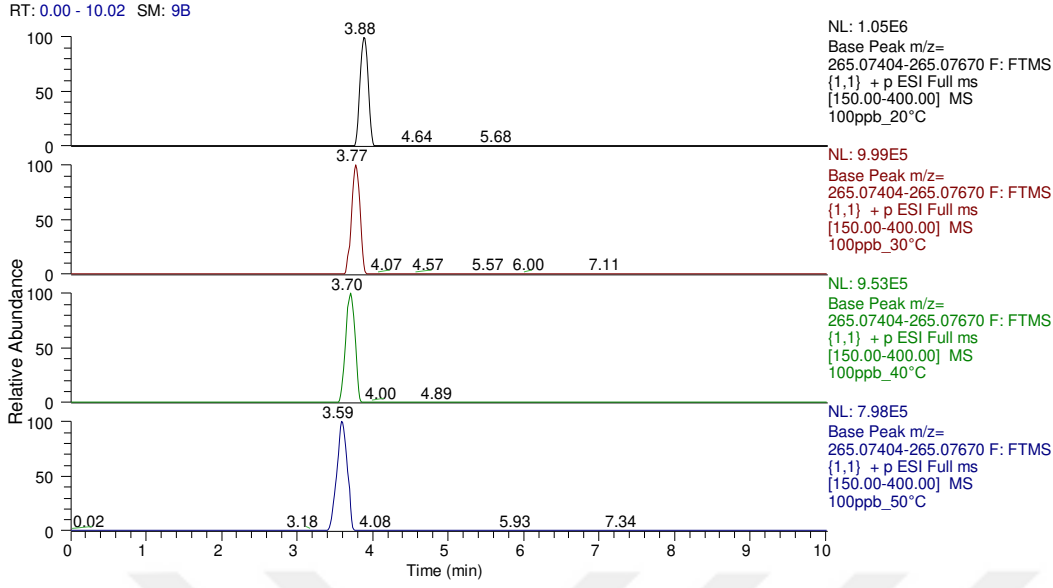
Şekil 4.22. Sülfakloropiridazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



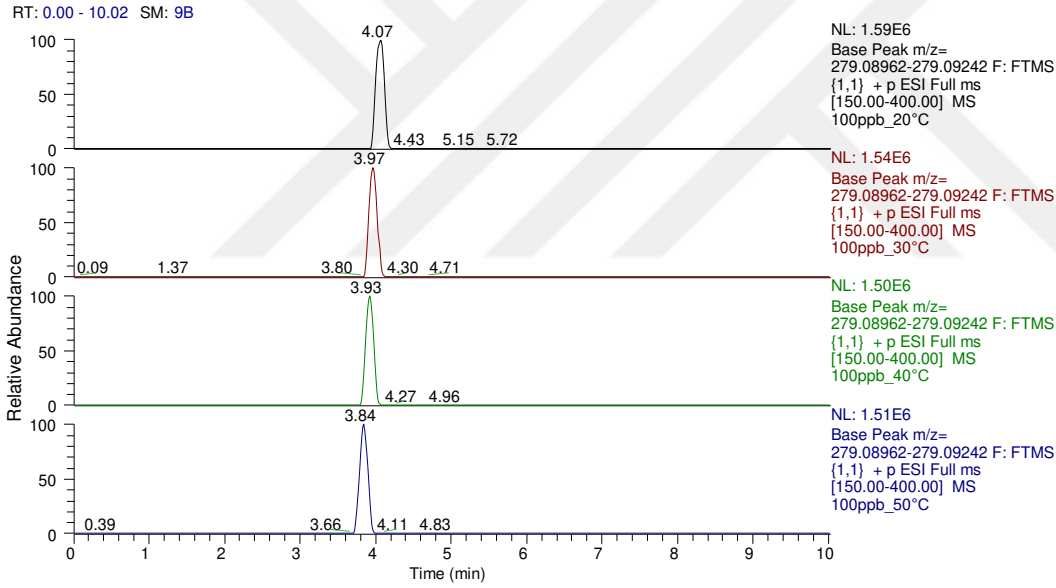
Şekil 4.23. Sülfadiazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



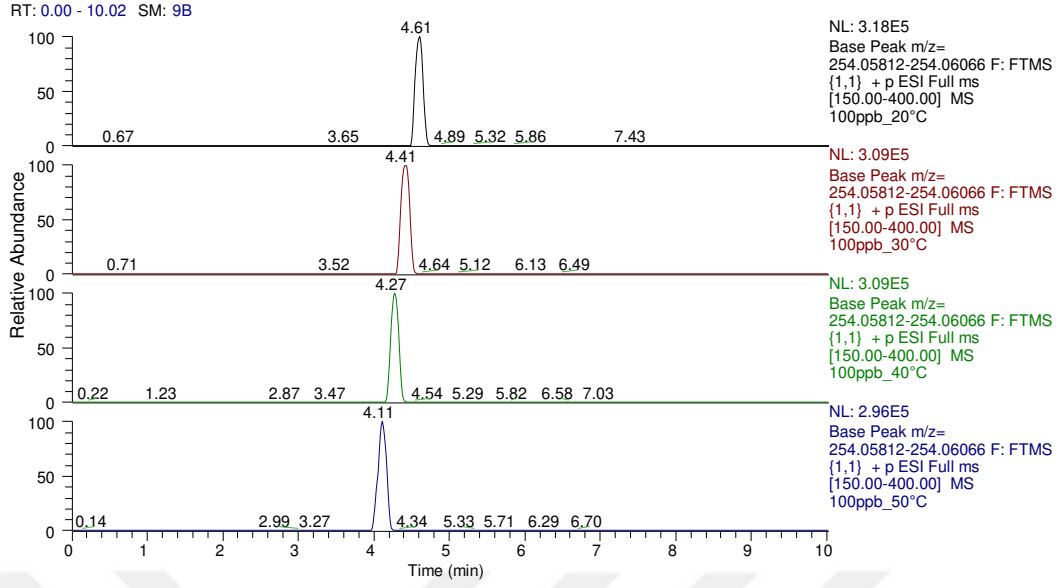
Şekil 4.24. Sülfadimetoksin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



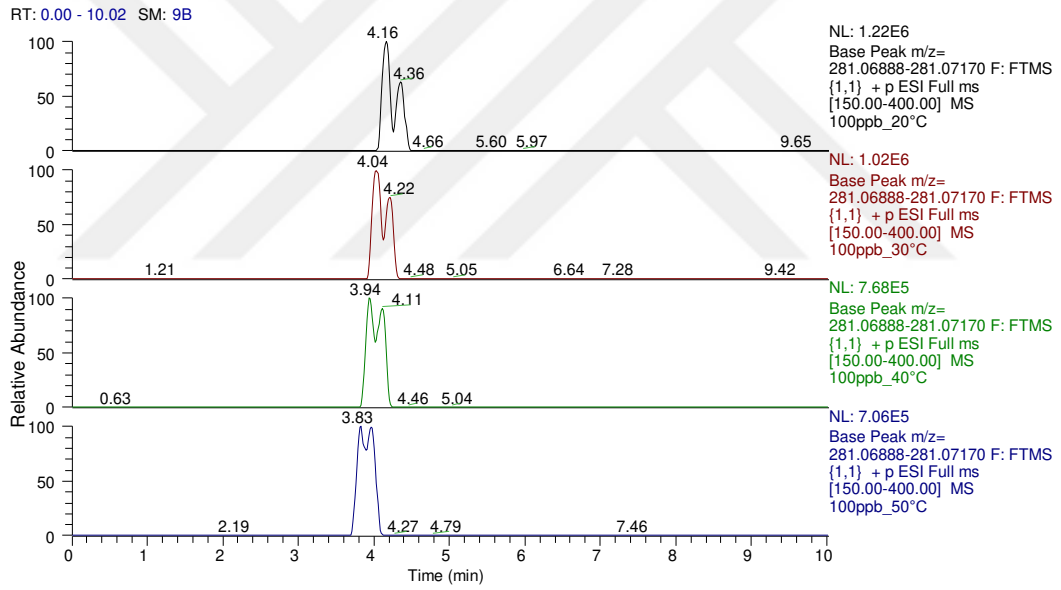
Şekil 4.25. Sülfamerazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



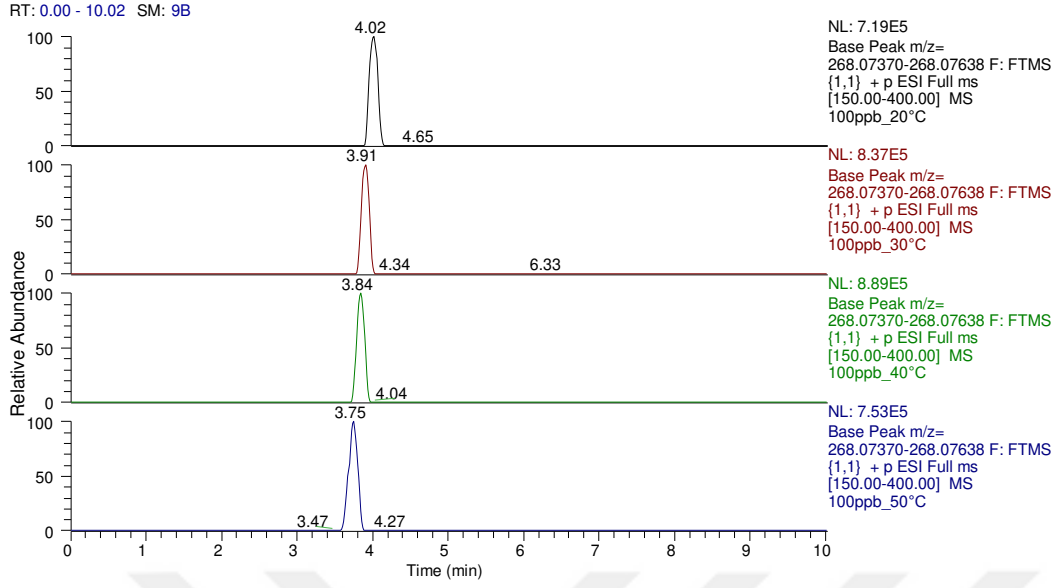
Şekil 4.26. Sülfametazin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



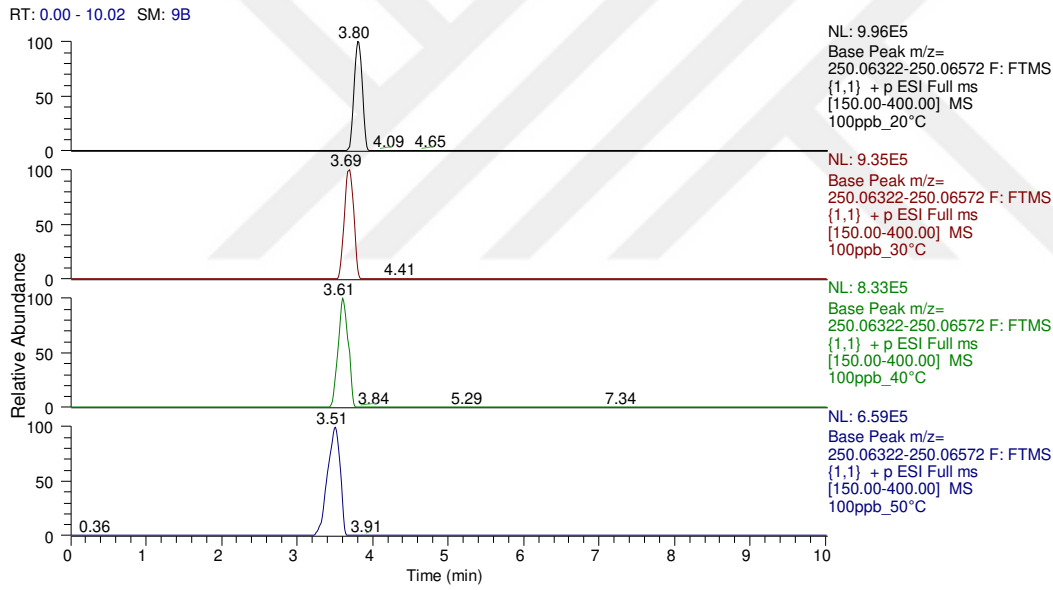
Şekil 4.27. Sülfametoksazol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



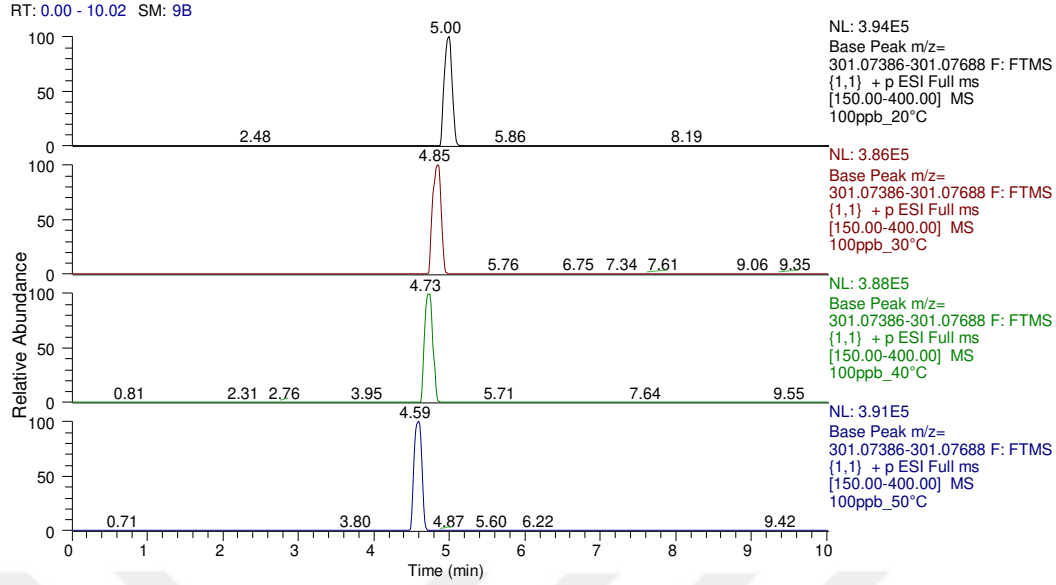
Şekil 4.28. Sülfametoksipiridazin-Sülfamonometoksin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



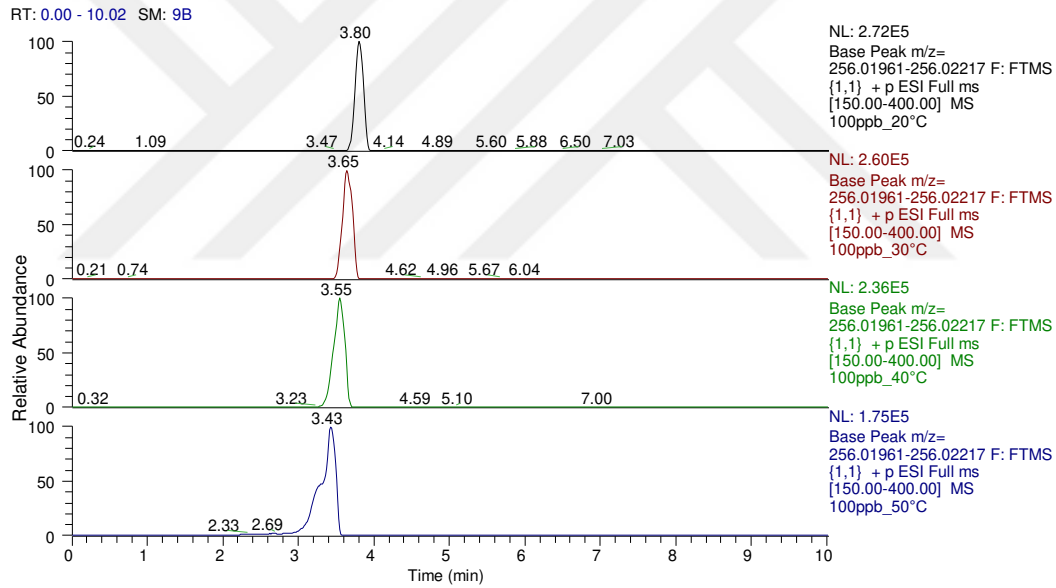
Şekil 4.29. Sülfamoksol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



Şekil 4.30. Sülfapiridin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar



Şekil 4.31. Sülfakinoksalin için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar

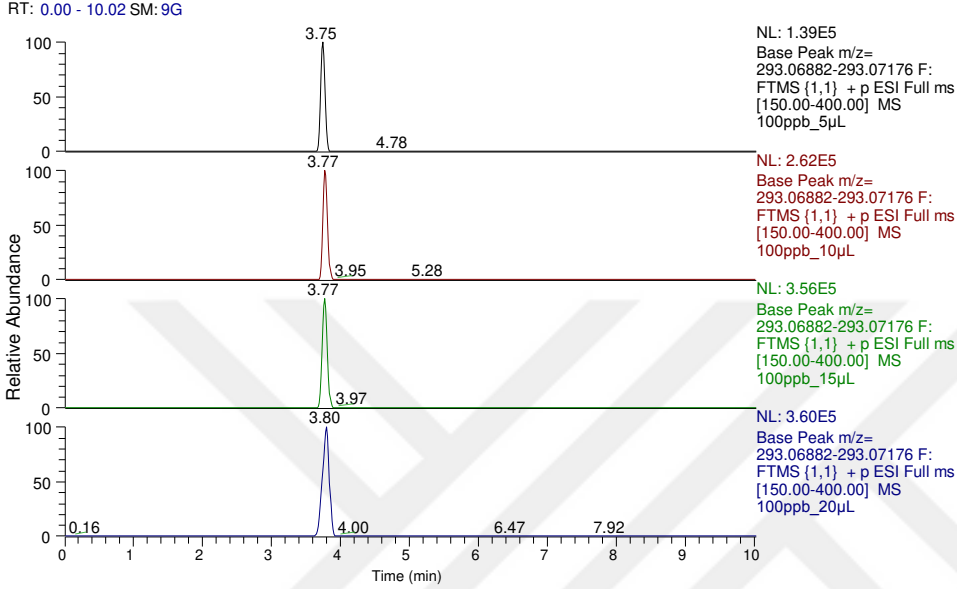


Şekil 4.32. Sülfatiazol için farklı sıcaklıklara ait kromatogramlar

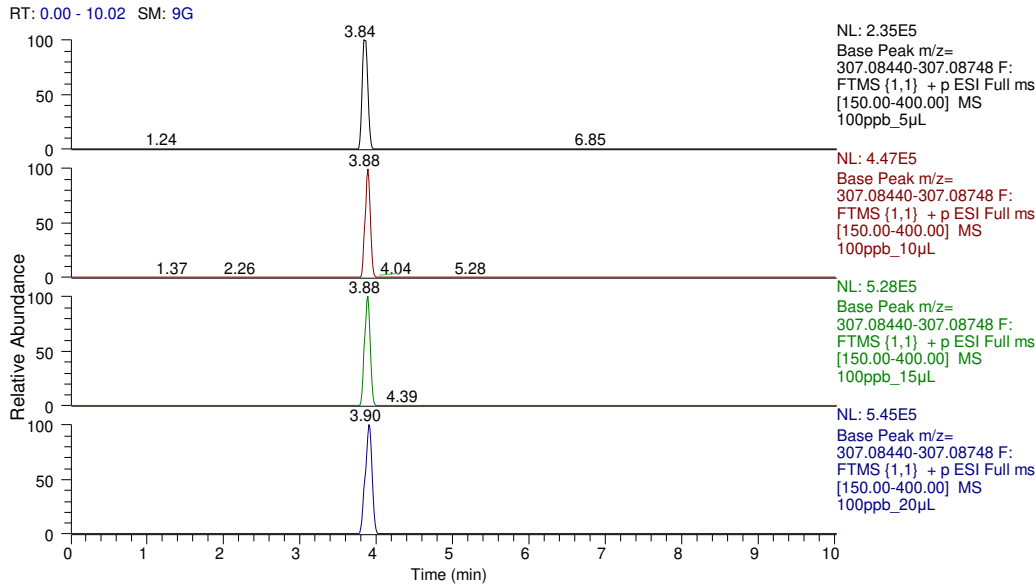
4.1.3. Enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan analizlerin sonuçları

0,6 mL/dk akış hızı ve 30 °C kolon sıcaklığı seçildikten sonra enjeksiyon hacminin (5, 10, 15 ve 20 µL) analitlerin pik şekli üzerine etkisi incelenmiştir. Kromatografik ayırmalarda kolona enjekte edilen miktar bant genişlemesi, pikin önünde genişleme veya arkasında kuyruk oluşumu açısından önemlidir. Gereğinden fazla örnek hacminin kullanılması sonucunda pikler genişlemekte ve asimetric olmaktadır; aynı zamanda analitlerin tespit zamanı değişmektedir (Meyer 2010). Şekil 4.33-4.48 incelendiğinde enjeksiyon hacmi arttıkça pik şekillerinde bozulmalar ve tespit zamanlarında değişimler belirlenmiştir. Ayrıca kromatogramda yanyana pik veren sülfametoksipiridazin ve sülfamonometoksin analitlerinin ayrımı enjeksiyon hacmi

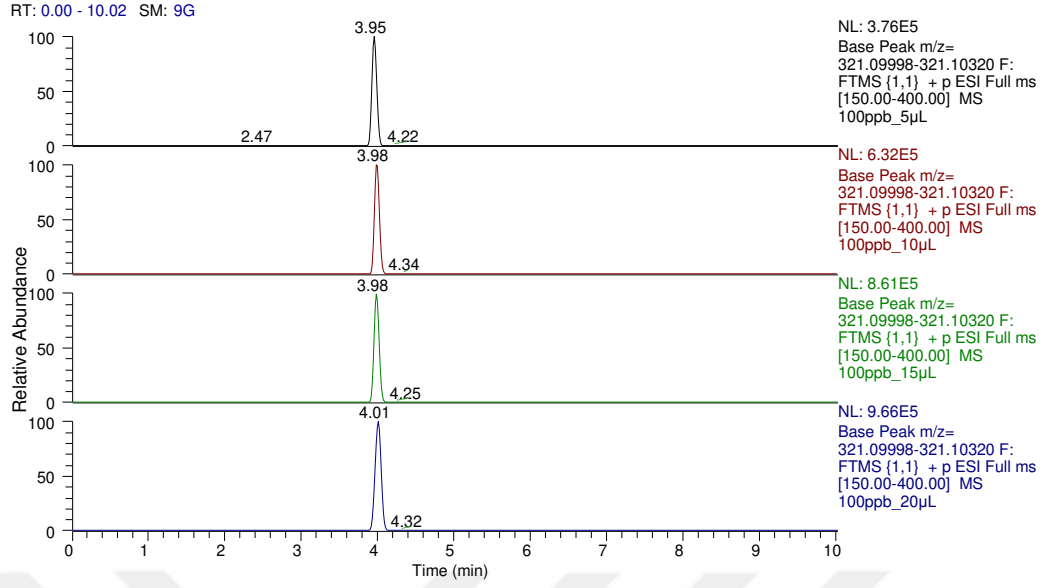
arttıkça kötüleşmektedir (Şekil 4.44). Enjeksiyon hacminin 5 μ L seçilmesi hem pik şekilleri hem de buna bağlı olarak miktar tayininde doğru sonuçların elde edilmesi açısından önemlidir. Analitlerin düşük enjeksiyon hacminde de oldukça yüksek sinyal değerlerine ulaşması fazla örnek miktarının kullanılmasını önlemektedir. Bu durum aynı zamanda kütle spektrometresinde analizörde oluşacak kirliliğin azaltılması açısından da önemlidir.



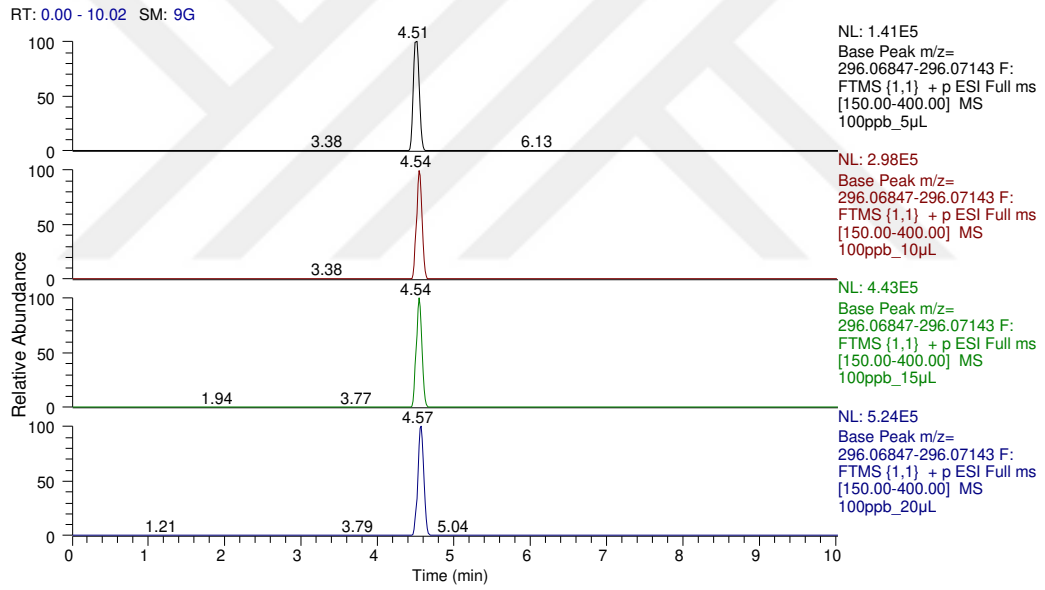
Şekil 4.33. N-asetilsülfadiazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



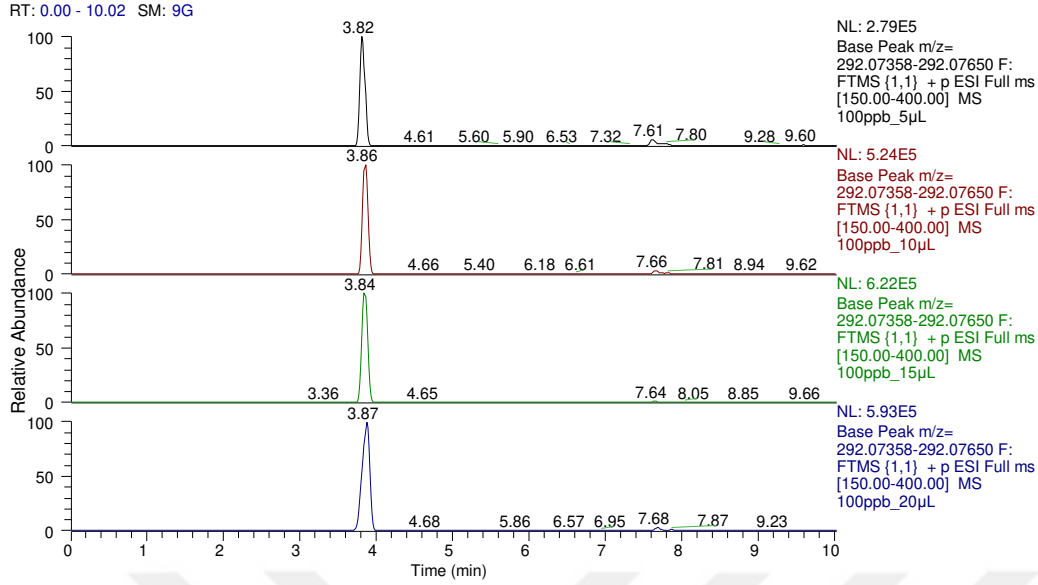
Şekil 4.34. N-asetilsülfamerazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



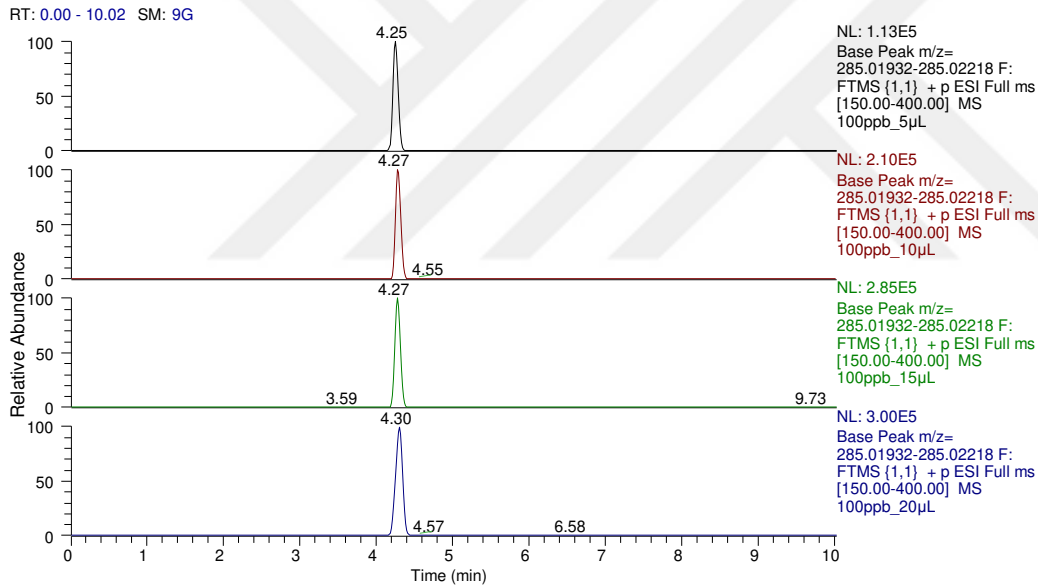
Şekil 4.35. N-asetilsülfametazinin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



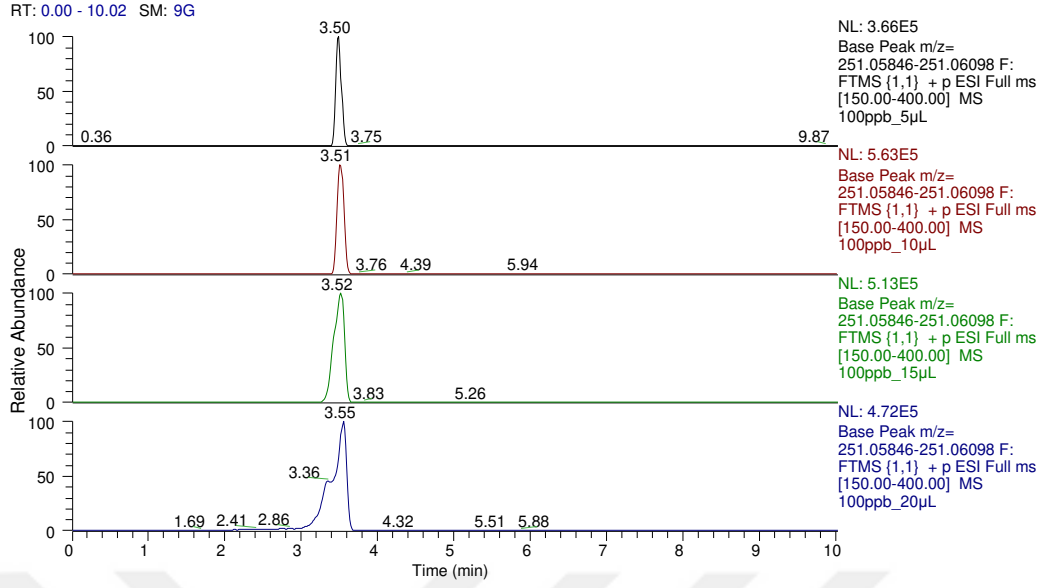
Şekil 4.36. N-asetilsülfametoksazol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



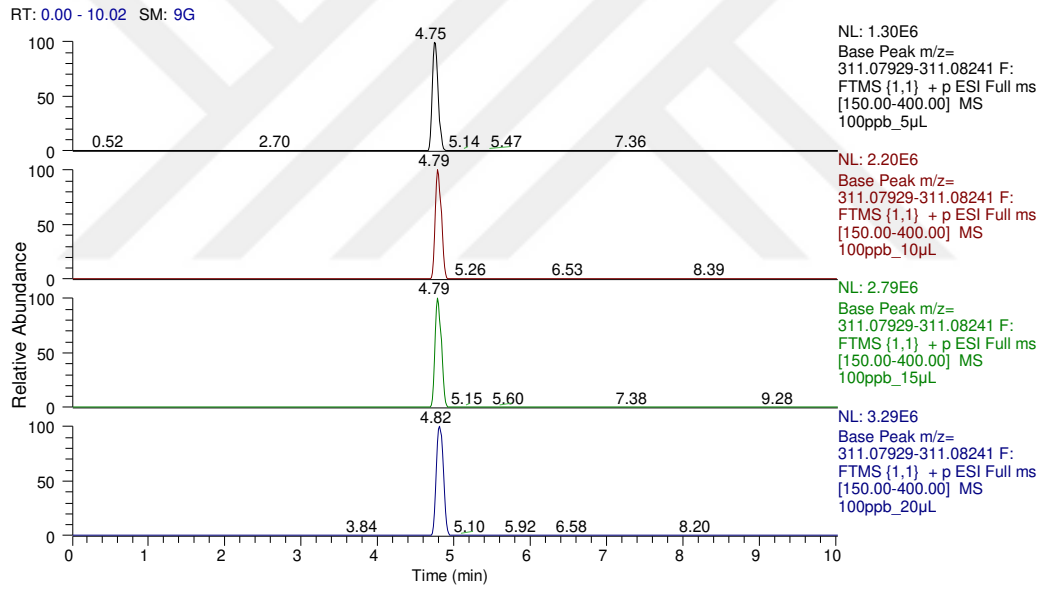
Şekil 4.37. N-asetilsülfapiridin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



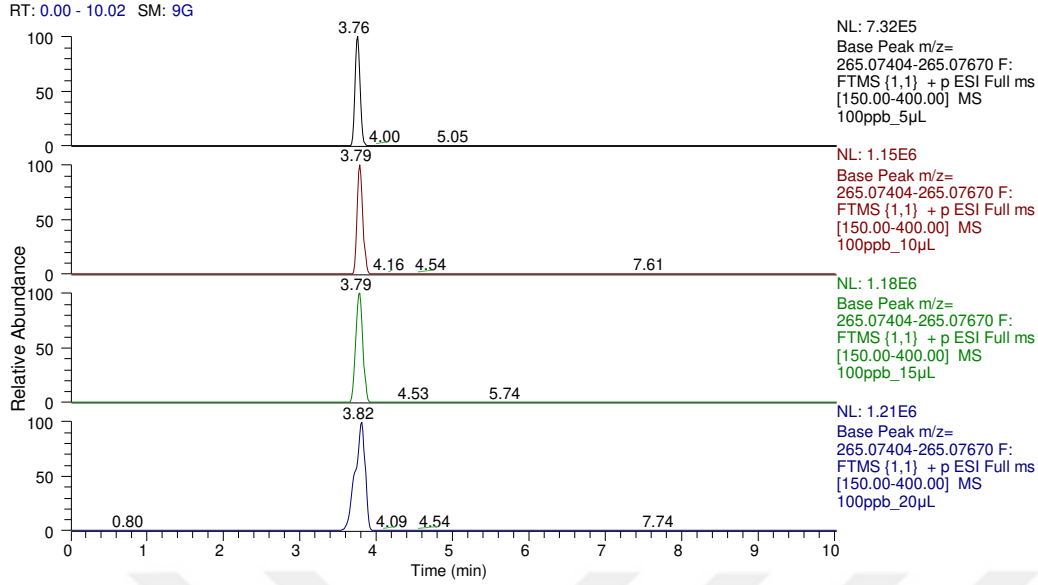
Şekil 4.38. Sülfakloropiridazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



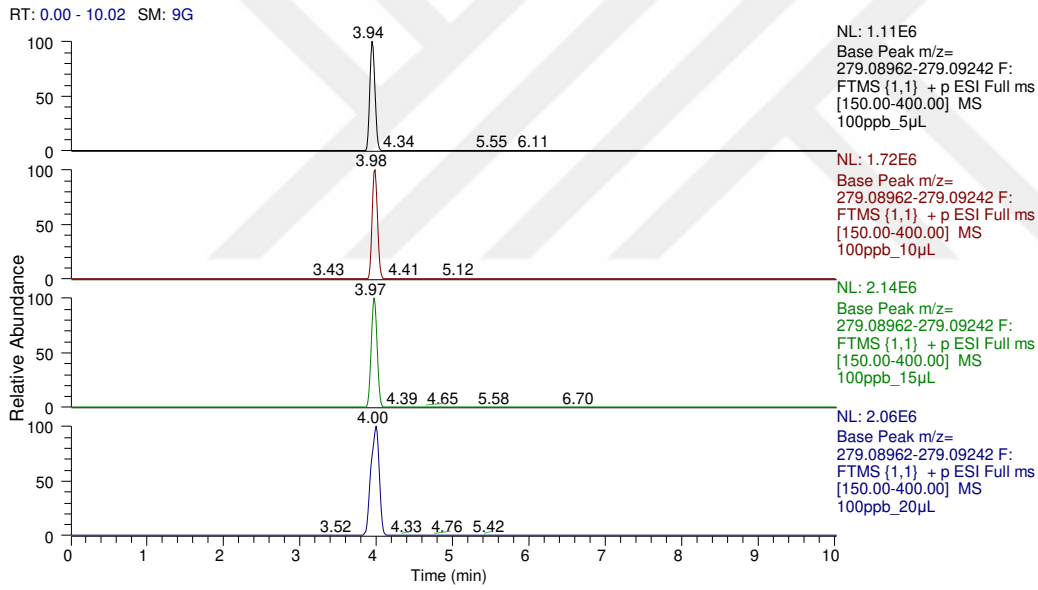
Şekil 4.39. Sülfadiazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



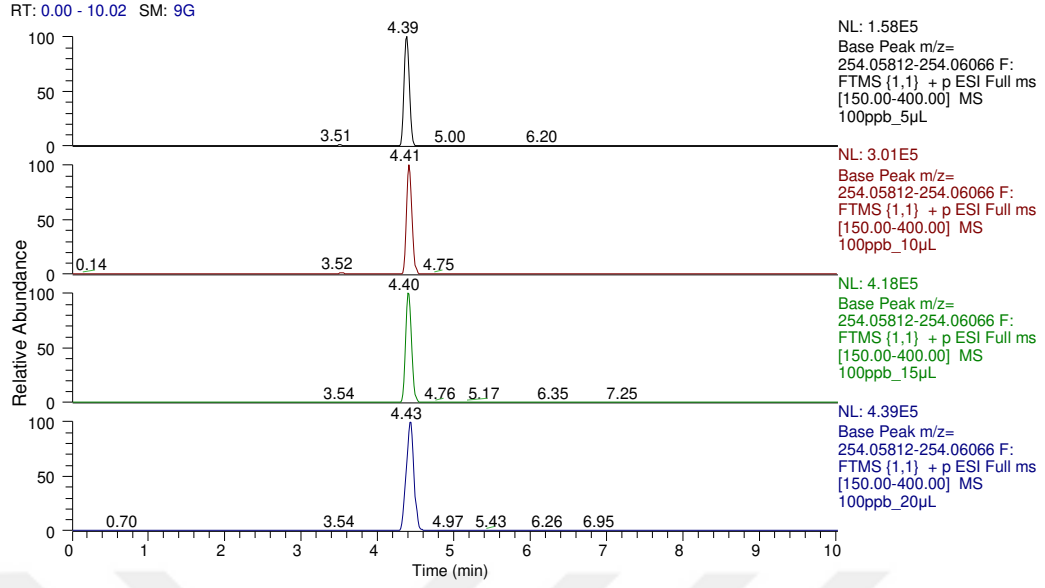
Şekil 4.40. Sülfadimetoksin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



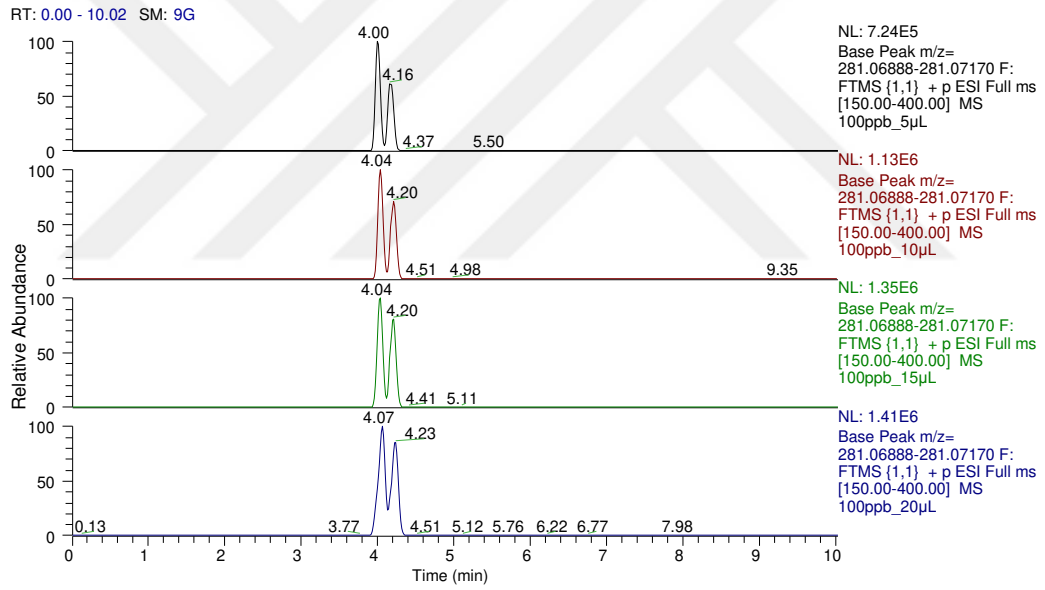
Şekil 4.41. Sülfamerazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



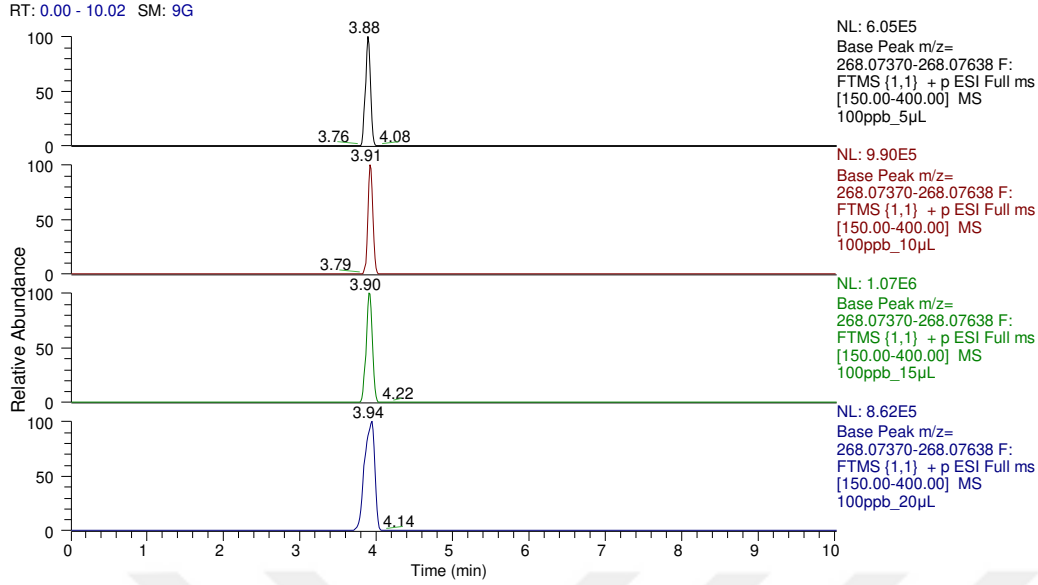
Şekil 4.42. Sülfametazin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



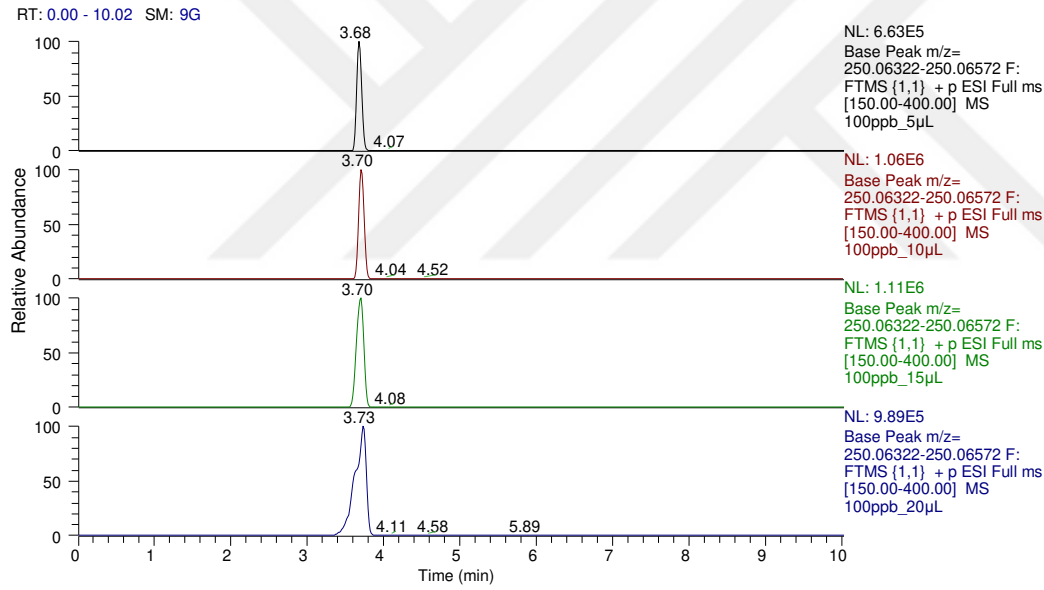
Şekil 4.43. Sülfametoksazol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



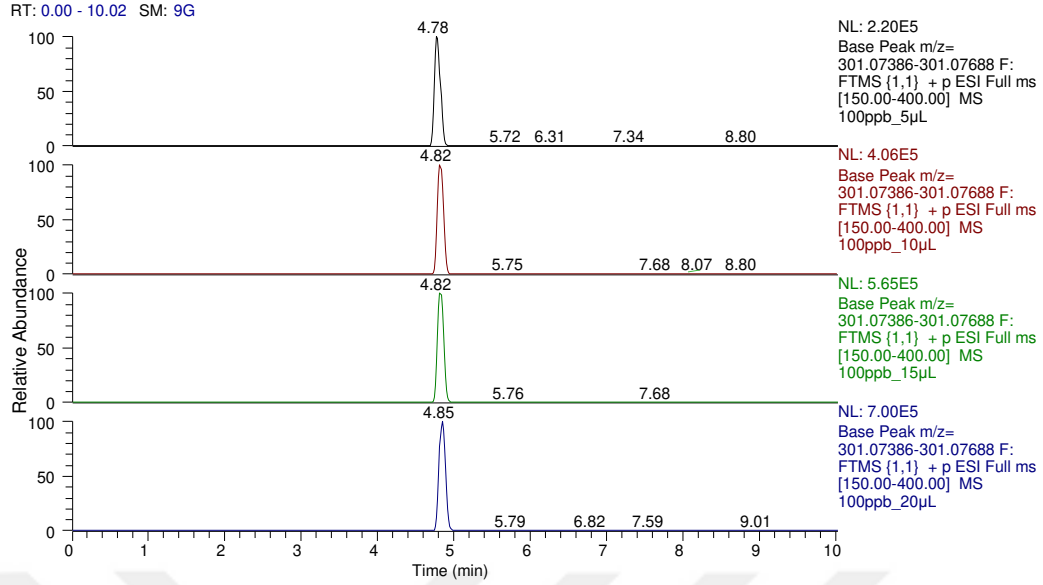
Şekil 4.44. Sülfametoksipiridazin-Sülfamonometoksin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



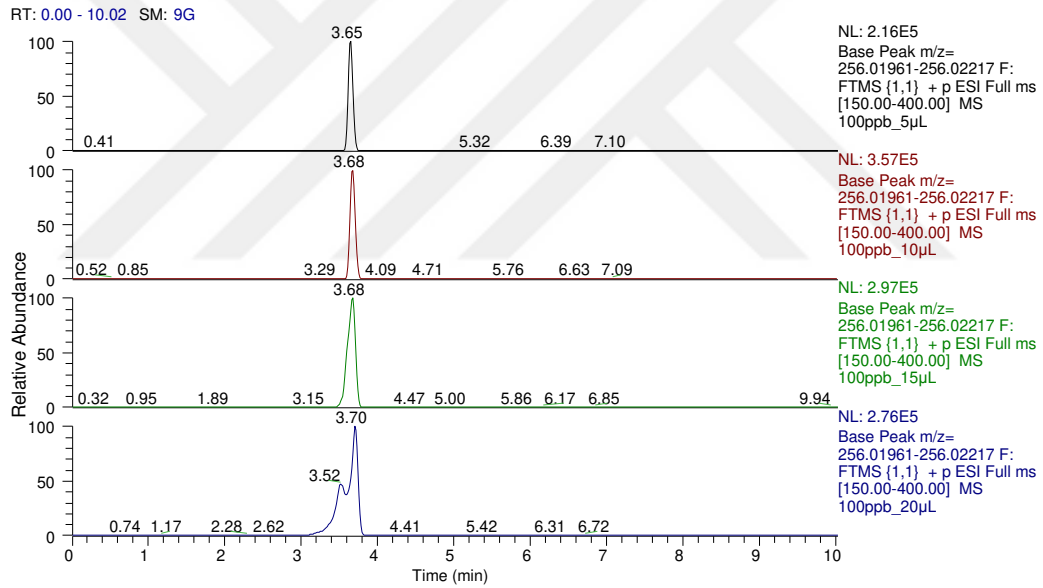
Şekil 4.45. Sülfamoksol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



Şekil 4.46. Sülfapiridin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



Şekil 4.47. Sülfakinoksalin için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar



Şekil 4.48. Sülfatiazol için farklı enjeksiyon hacmine ait kromatogramlar

4.1.4. Hareketli faz B'de asetonitril (MeCN) veya metanol (MeOH) kullanılmasının analiz sonuçlarına etkisi

Ters-faz kromatografide iyonize olan analitlerin tutulması büyük ölçüde onların iyonizasyon ve çözünme durumlarına bağlı olarak değişmektedir. Bu özellikleri hareketli fazın pH'sına, iyonik şiddetine, hareketli fazda kullanılan sıvıların özelliklerine ve faza ilave edilen katkıların pKa'sına bağlı olarak ESI sisteminde analitin iyonlaşması üzerinde etkili olmaktadır. Ters-faz kromatografide yaygın olarak kullanılan organik sıvılar asetonitril ve metanoldür. Bu sıvıların viskozite, yüzey gerilimi ve dielektrik sabiti gibi fiziksel özellikleri analizin seçiciliğini oldukça

etkilemektedir. Ayrıca organik fazın seçiminde ekstraksiyon çözgeni ve hareketli fazın sulu kısmı ile karışabilir özellikte olması dikkate alınmalıdır (Peri-Okonny 2001).

Bu aşamada hareketli faz A (0,1 mM oksalik asit/su) sabit tutulup B fazında asetonitril (%0,2 formik asit, pH: 2,01) yerine metanolün (%0,2 formik asit, pH: 2,50) kullanılmasının piklerin sinyal büyüklüğüne ve şekline etkisi incelenmiştir. Çizelge 4.1’de belirtildiği üzere metanol kullanılarak yapılan analizlerde analitlerin tespiti asetonitrile göre daha geç olmuştur.

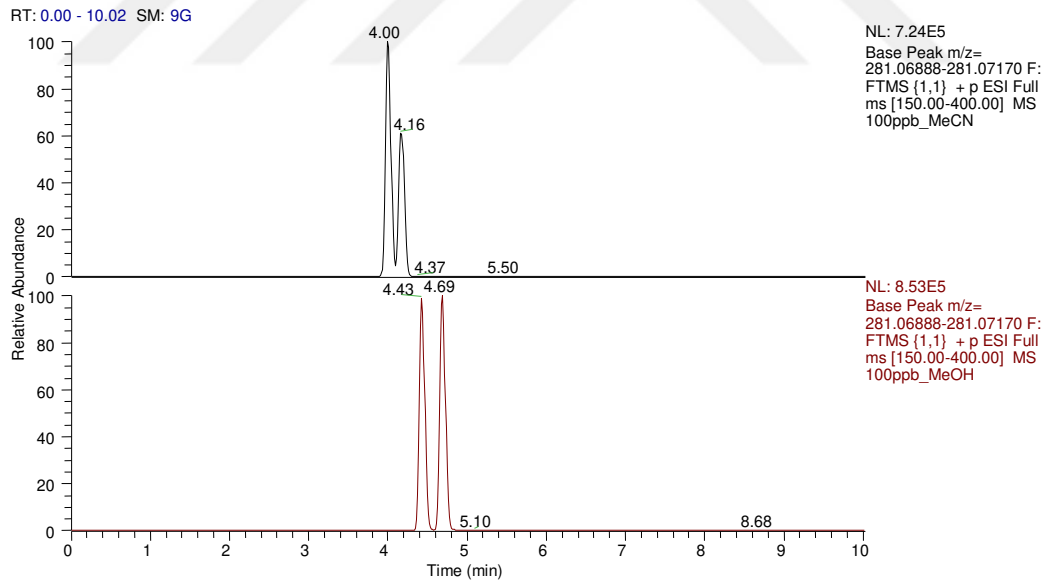
Çizelge 4.1. Analitlerin MeCN ve MeOH’daki tespit zamanı ve sinyal seviyesi

Analit		Tespit zamanı (RT, dk)	Sinyal seviyesi (Ortalama±Std Sapma)
N-asetilsülfadiazin	MeCN	3,75	1,61 E5±0,30
	MeOH	4,22	3,02 E5±0,47
N-asetilsülfamerazin	MeCN	3,84	2,55 E5±0,28
	MeOH	4,46	4,63 E5±0,46
N-asetilsülfametazin	MeCN	3,95	4,06 E5±0,42
	MeOH	4,68	7,96 E5±0,40
N-asetilsülfametoksazol	MeCN	4,51	1,65 E5±0,34
	MeOH	5,18	1,64 E5±0,06
N-asetilsülfapiridin	MeCN	3,82	2,93 E5±0,19
	MeOH	4,39	5,67 E5±0,71
Sülfakloropiridazin	MeCN	4,25	1,23 E5±0,14
	MeOH	4,58	2,61 E5±0,28
Sülfadiazin	MeCN	3,50	3,68 E5±0,03
	MeOH	3,65	5,89 E5±0,87
Sülfadimetoksin	MeCN	4,75	1,30 E6±0,01
	MeOH	5,35	9,84 E5±0,17
Sülfamerazin	MeCN	3,76	7,22 E5±0,14
	MeOH	4,01	8,32 E5±0,28
Sülfametazin	MeCN	3,94	1,08 E6±0,05
	MeOH	4,32	9,72 E5±0,06
Sülfametoksazol	MeCN	4,39	1,68 E5±0,13
	MeOH	4,62	1,75 E5±0,10
Sülfametoksipiridazin	MeCN	4,00	7,13 E5±0,16
	MeOH	4,43	8,45 E5±0,12
Sülfamonometoksin	MeCN	4,16	5,78 E5±0,28
	MeOH	4,69	8,50 E5±0,12
Sülfamoksol	MeCN	3,88	6,17 E5±0,16
	MeOH	4,26	7,38 E5±0,13
Sülfapiridin	MeCN	3,68	6,50 E5±0,19
	MeOH	3,90	7,84 E5±0,45
Sülfakinoksalin	MeCN	4,78	2,46 E5±0,36
	MeOH	5,51	4,37 E5±1,29
Sülfatiazol	MeCN	3,65	2,32 E5±0,23
	MeOH	3,84	4,30 E5±0,66

*Akış hızı 0,6 mL/dk, kolon sıcaklığı 30 °C, enjeksiyon hacmi 5 µL

Analitlerin tespit zamanında en fazla 0,7 dk'lık bir kayma tespit edilmiştir. Bu durumun nedeninin metanolün viskozitesinin asetonitrile göre daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak pik alanları incelendiğinde, analitlerin çoğunlukla metanolde daha yüksek sinyal verdiği belirlenmiştir. Ayrıca Şekil 58'de görüldüğü üzere kromatogramda yanyana pik veren sülfametoksipiridazin ve sülfamonometoksin analitlerinin ayrımı metanolde daha iyi sağlanmıştır.

Literatürde sülfonamidlerin kromatografik ayrımında hareketli faz olarak çoğunlukla asetonitrilin kullanıldığı, ancak metanolün de tercih edildiği çalışmaların mevcut olduğu belirlenmiştir. Kromatografik analizlerde asetonitrilin daha çok tercih edilmesinin başlıca nedeni düşük viskozitesinden dolayı kolonda düşük basınç oluşturmastır. Metanol kullanımında ise sulu faz ile özellikle %40-50 oranında karışımında en yüksek basınç değeri gözlenmektedir. Buna karşın, asetonitrile kıyasla hem fiyatı daha ucuzdur hem de daha az toksiktir. Ayrıca metanolün polaritesinin daha yüksek olması hareketli faza ilave edilen katkıların (tampon) sistemdeki akış hatlarında çökmesini engellemektedir (García-Alvarez-Coque vd 2015). Aguilera-Luiz vd (2008) tarafından yapılan çalışmada da hareketli faz olarak asetonitril kullanıldığında analitlerin kolonda metanole göre daha kısa sürede tutulduğu ancak metanol kullanıldığında duyarlılığın daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak, Kowalski vd (2011) ve Jia vd (2014) tarafından yapılan çalışmada hareketli faz olarak asetonitril yerine metanolün kullanılmasının sülfonamidlerin analizinde ayrımın duyarlılığını ve kalitesini arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.49. Sülfametoksipiridazin ve sülfamonometoksin'in iki hareketli faz (MeCN-MeOH) kullanılarak elde edilen kromatogramları

Hem sinyal seviyesi hem de ayırma gücü açısından analizlere metanol kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir. Hareketli fazda metanol kullanıldığında metotta kullanılan kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi değerleri değiştirilmemiştir. Ancak metanolün yüksek akış hızında sistemde yüksek basınca neden olmasından

dolayı akış hızı 0,6 mL/dk'dan 0,5 mL/dk'ya düşürülmüştür. Sistemde 0,6 mL/dk akışta basınç en fazla 900 bar'a çıkarken; 0,5 mL/dk akışta basınç 720 bar'a çıkmaktadır. Kolonun kullanım ömrünü uzatmak açısından analizlerde 0,5 mL/dk akış hızının kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.5. Hareketli faz A (0,1 mM oksalik asit/su, pH:3,89) sabit tutularak, hareketli faz B'de (metanol) farklı konsantrasyonda formik asit kullanılımasının analiz sonuçlarına etkisi

İyonize olabilen analitlerin kromatografik ayrımında hareketli fazın pH değeri iyonizasyon düzeyini ve seçiciliği etkilemektedir. Zayıf asidik veya bazik özellikteki sülfonamid grubu antibiyotiklerin pozitif yük kazanmaları için bulundukları ortamda düşük pH değerlerine ihtiyaçları vardır. Analitlerin iyonlaşması için hareketli fazın pH değerinin analitlerin pKa değerinden daha düşük olması gerekmektedir. Bu yüzden hareketli faz bileşiminin cihazın duyarlılığı açısından oldukça büyük etkisi vardır (Forti ve Scortichini 2009). Hareketli faz B'de farklı konsantrasyonlarda (%0, 0.05, 0.1 ve 0.2) formik asit kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.2'de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 4.95, 2.95, 2.70 ve 2.50'dir. Konsantrasyon sınırlarının seçiminde kolonun kullanımında tavsiye edilen pH aralığı göz önünde bulundurularak en fazla %0,2 (pH:2,5) konsantrasyonu kullanılmıştır. Analiz sonuçları incelendiğinde farklı konsantrasyonlarda formik asit kullanımının pik şekilleri üzerine etkisi gözlenmezken; analitlerin %0,1 formik asit konsantrasyonunda genel olarak en yüksek sinyal seviyesini verdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda formik asit ile hazırlanan hareketli fazın analitlerin sinyal seviyesine etkisi

Analit	%0	%0,05	%0,1	%0,2
N-asetilsülfadiazin	3,25E5 ^b ±0,23	3,18E5 ^b ±0,08	3,70E5 ^a ±0,06	3,34E5 ^b ±0,01
N-asetilsülfamerazin	4,61E5 ^c ±0,15	4,58E5 ^c ±0,02	5,30E5 ^a ±0,05	5,00E5 ^b ±0,06
N-asetilsülfametazin	9,76E5 ^a ±0,33	8,77E5 ^b ±0,18	9,23E5 ^b ±0,44	8,31E5 ^b ±0,10
N-asetilsülfametoksazol	2,50E5 ^a ±0,08	2,13E5 ^b ±0,06	2,04E5 ^b ±0,03	1,60E5 ^c ±0,00
N-asetilsülfapiridin	6,34E5 ^b ±0,26	5,93E5 ^b ±0,07	6,90E5 ^a ±0,04	6,34E5 ^b ±0,24
Sülfakloropiridazin	2,11E5 ^c ±0,11	2,42E5 ^b ±0,01	2,80E5 ^a ±0,04	2,79E5 ^a ±0,04
Sülfadiazin	6,08E5 ^c ±0,28	6,24E5 ^{bc} ±0,08	6,68E5 ^a ±0,01	6,56E5 ^{ab} ±0,08
Sülfadimetoksin	1,23E6 ^a ±0,04	1,04E6 ^b ±0,01	1,03E6 ^b ±0,04	9,92E5 ^b ±0,06
Sülfamerazin	9,68E5 ^a ±0,35	8,75E5 ^b ±0,22	8,86E5 ^b ±0,03	8,55E5 ^b ±0,06
Sülfametazin	1,18E6 ^a ±0,06	1,01E5 ^b ±0,01	1,04E6 ^b ±0,03	9,67E5 ^b ±0,02
Sülfametoksazol	1,86E5±0,07	1,86E5±0,02	1,86E5±0,09	1,81E5±0,02
Sülfametoksipiridazin	1,03E6 ^a ±0,04	9,05E5 ^b ±0,13	9,15E5 ^b ±0,16	8,52E5 ^b ±0,01
Sülfamonometoksin	1,08E6 ^a ±0,04	9,10E5 ^b ±0,14	9,18E5 ^b ±0,17	8,57E5 ^b ±0,02
Sülfamoksol	8,41E5 ^a ±0,42	7,67E5 ^b ±0,04	7,94E5 ^a ±0,22	7,49E5 ^b ±0,03
Sülfapiridin	9,47E5 ^a ±0,42	8,53E5 ^b ±0,15	8,45E5 ^b ±0,17	8,15E5 ^b ±0,02
Sülfakinoksalin	4,58E5 ^c ±0,16	5,00E5 ^b ±0,13	5,31E5 ^a ±0,01	5,31E5 ^a ±0,04
Sülfatiazol	4,16E5 ^b ±0,21	4,34E5 ^b ±0,10	4,99E5 ^a ±0,08	4,80E5 ^a ±0,06

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.1.6. Hareketli faz B (%0,1 formik asit/metanol, pH:2,70) sabit tutularak, hareketli faz A'da (su) farklı konsantrasyonlarda oksalik, formik ve asetik asit kullanımının analiz sonuçlarına etkisi

Hareketli faz B için kullanılan formik asit konsantrasyonu belirlendikten sonra hareketli faz A'da farklı iyonlaştırma ajanlarının (oksalik, formik ve asetik asit) ve bunların konsantrasyonlarının piklerin şekline ve sinyal seviyesine etkisi araştırılmıştır.

4.1.6.1. Oksalik asit

Hareketli faz A'da farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.2, 0.5 ve 1 mM) oksalik asit kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.3'de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 3.89, 3.69, 3.31 ve 3.00'tür. Analitlerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hareketli fazla yapılan analiz sonuçları incelendiğinde pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Konsantrasyon farkının analitlerin sinyal seviyesi üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olduğu ve sinyal seviyesinin genel olarak 0,5 mM konsantrasyonda en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda oksalik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi

Analit	0,1mM	0,2mM	0,5mM	1mM
N-asetilsülfadiazin	4,26E5 ^b ±0,17	4,58E5 ^b ±0,04	6,09E5 ^a ±0,11	3,25E5 ^c ±0,13
N-asetilsülfamerazin	4,99E5 ^c ±0,09	7,25E5 ^a ±0,00	6,60E5 ^b ±0,39	5,04E5 ^c ±0,13
N-asetilsülfametazin	9,75E5±0,01	1,05E6±0,04	1,13E6±0,11	1,10E6±0,01
N-asetilsülfametoksazol	2,56E5 ^b ±0,09	3,06E5 ^a ±0,08	3,18E5 ^a ±0,24	2,66E5 ^b ±0,07
N-asetilsülfapiridin	6,54E5 ^b ±0,03	8,30E5 ^a ±0,04	6,05E5 ^c ±0,04	3,34E5 ^d ±0,13
Sülfakloropiridazin	2,93E5 ^c ±0,04	2,95E5 ^c ±0,06	5,25E5 ^a ±0,13	3,72E5 ^b ±0,18
Sülfadiazin	6,22E5 ^a ±0,01	6,33E5 ^a ±0,04	5,48E5 ^b ±0,09	3,78E5 ^c ±0,12
Sülfadimetoksin	9,78E5 ^b ±0,01	9,92E5 ^b ±0,07	1,17E6 ^{ab} ±0,13	1,30E6 ^a ±0,05
Sülfamerazin	8,01E5 ^b ±0,04	8,91E5 ^a ±0,01	9,15E5 ^a ±0,13	6,34E5 ^c ±0,23
Sülfametazin	9,39E5 ^{ab} ±0,06	9,80E5 ^{ab} ±0,06	1,06E6 ^a ±0,07	8,82E5 ^b ±0,49
Sülfametoksazol	2,06E5±0,06	2,22E5±0,16	2,15E5±0,16	2,01E5±0,04
Sülfametoksipiridazin	8,54E5 ^c ±0,06	9,09E5 ^b ±0,02	1,03E6 ^a ±0,02	7,22E5 ^d ±0,31
Sülfamonometoksin	8,59E5 ^c ±0,06	9,15E5 ^b ±0,02	1,06E6 ^a ±0,02	7,24E5 ^d ±0,25
Sülfamoksol	7,28E5 ^c ±0,06	8,19E5 ^b ±0,07	9,07E5 ^a ±0,20	7,26E5 ^c ±0,14
Sülfapiridin	7,61E5 ^b ±0,01	8,09E5 ^a ±0,03	7,51E5 ^b ±0,04	4,71E5 ^c ±0,23
Sülfakinoksalin	4,59E5 ^c ±0,03	6,88E5 ^b ±0,12	7,06E5 ^{ab} ±0,04	7,83E5 ^a ±0,65
Sülfatiazol	5,14E5 ^a ±0,01	5,06E5 ^a ±0,09	4,54E5 ^b ±0,10	2,56E5 ^c ±0,23

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.1.6.2. Formik asit

Hareketli faz A'da farklı konsantrasyonlarda (%0.01, 0.02, 0.05 ve 0.1) formik asit kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.4'de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 3.16, 2.96, 2.82 ve 2.60'tır. Analitlerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hareketli fazla yapılan

analiz sonuçları incelendiğinde pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Konsantrasyon farkının analitlerin sinyal seviyesi üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olduğu ve sinyal seviyesinin en düşük konsantrasyonda (%0,01) en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda formik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi

Analit	%0,01	%0,02	%0,05	%0,1
N-asetilsülfadiazin	1,82E5 ^a ±0,04	1,67E5 ^b ±0,03	1,66E5 ^b ±0,09	1,38E5 ^c ±0,01
N-asetilsülfamerazin	2,11E5 ^a ±0,03	1,94E5 ^b ±0,03	1,89E5 ^b ±0,02	1,63E5 ^c ±0,08
N-asetilsülfametazin	3,14E5 ^a ±0,08	3,02E5 ^a ±0,10	3,06E5 ^a ±0,10	2,46E5 ^b ±0,02
N-asetilsülfametoksazol	1,60E5 ^a ±0,01	1,58E5 ^a ±0,03	1,62E5 ^a ±0,13	1,20E5 ^b ±0,04
N-asetilsülfapiridin	2,81E5 ^a ±0,06	2,69E5 ^{ab} ±0,09	2,53E5 ^b ±0,06	2,19E5 ^c ±0,01
Sülfakloropiridazin	1,28E5 ^a ±0,04	1,23E5 ^a ±0,06	1,20E5 ^a ±0,07	1,04E5 ^b ±0,03
Sülfadiazin	1,77E5±0,04	1,59E5±0,08	1,76E5±0,04	1,72E5±0,08
Sülfadimetoksin	3,47E5 ^a ±0,00	3,34E5 ^a ±0,16	3,38E5 ^a ±0,13	2,81E5 ^b ±0,02
Sülfamerazin	2,50E5 ^a ±0,00	2,31E5 ^{ab} ±0,09	2,37E5 ^{ab} ±0,12	2,22E5 ^b ±0,08
Sülfametazin	3,32E5 ^a ±0,10	3,09E5 ^{ab} ±0,08	2,94E5 ^b ±0,17	2,83E5 ^b ±0,04
Sülfametoksazol	2,22E5 ^a ±0,05	2,25E5 ^a ±0,07	2,08E5 ^a ±0,08	1,71E5 ^b ±0,01
Sülfametoksipiridazin	2,75E5 ^a ±0,11	2,66E5 ^{ab} ±0,07	2,48E5 ^{bc} ±0,06	2,30E5 ^c ±0,04
Sülfamonometoksin	2,79E5 ^a ±0,09	2,68E5 ^{ab} ±0,07	2,54E5 ^{bc} ±0,07	2,35E5 ^c ±0,04
Sülfamoksol	2,95E5 ^a ±0,03	2,91E5 ^a ±0,04	2,99E5 ^a ±0,11	2,64E5 ^b ±0,06
Sülfapiridin	2,58E5±0,02	2,38E5±0,02	2,46E5±0,04	2,69E5±0,24
Sülfakinoksalin	1,79E5 ^a ±0,08	1,83E5 ^a ±0,08	1,76E5 ^a ±0,01	1,52E5 ^b ±0,01
Sülfatiazol	1,85E5 ^a ±0,06	1,68E5 ^{bc} ±0,04	1,74E5 ^{ab} ±0,01	1,58E5 ^c ±0,05

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.1.6.3. Asetik asit

Hareketli faz A'da farklı konsantrasyonlarda (%0.05, 0.1 ve 0.2) asetik asit kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.5'de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 3.42, 3.25 ve 3.09'dur. Analitlerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hareketli fazla yapılan analiz sonuçları incelendiğinde pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Asetik asit konsantrasyonu arttıkça sinyal seviyesinde artış gözlenmiştir; ancak konsantrasyon farkının 6 analit için istatistiki olarak önemli derecede etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda asetik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi

Analit	%0,05	%0,1	%0,2
N-asetilsülfadiazin	2,83E5 ^b ±0,03	2,96E5 ^b ±0,03	3,29E5 ^a ±0,09
N-asetilsülfamerazin	2,58E5±0,04	2,57E5±0,06	2,78E5±0,18
N-asetilsülfametazin	3,71E5±0,06	3,50E5±0,01	3,68E5±0,12
N-asetilsülfametoksazol	2,04E5±0,01	2,01E5±0,01	2,14E5±0,14
N-asetilsülfapiridin	3,07E5 ^{ab} ±0,02	2,92E5 ^b ±0,09	3,40E5 ^a ±0,19
Sülfakloropiridazin	1,84E5±0,03	1,86E5±0,01	1,94E5±0,21

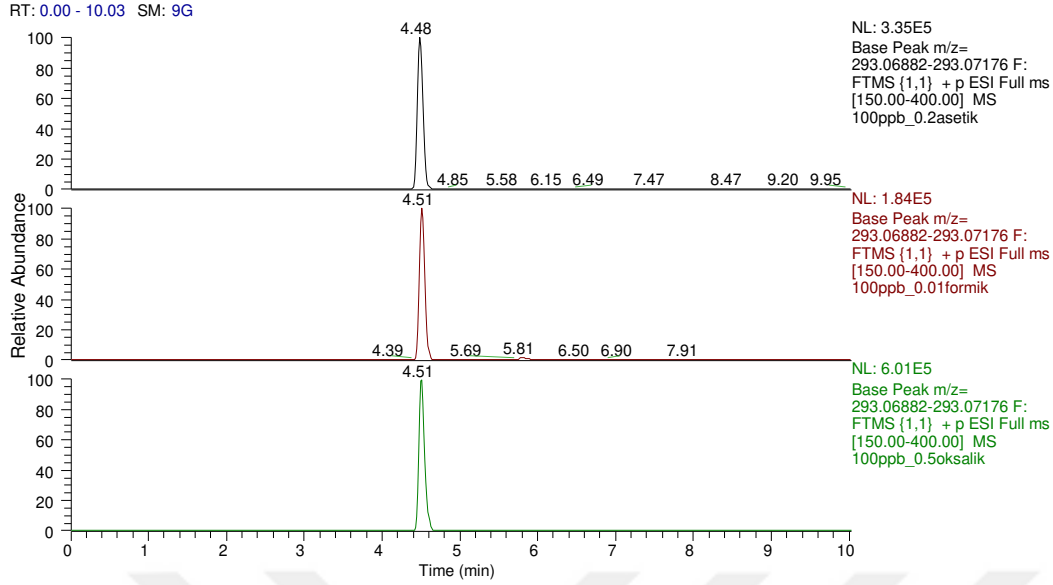
Sülfadiazin	2,14E5 ^c ±0,00	2,20E5 ^b ±0,03	2,47E5 ^a ±0,01
Sülfadimetoksin	3,67E5±0,06	3,36E5±0,05	3,45E5±0,30
Sülfamerazin	2,90E5 ^b ±0,04	2,85E5 ^b ±0,01	3,25E5 ^a ±0,04
Sülfametazin	3,46E5±0,08	3,32E5±0,09	3,60E5±0,42
Sülfametoksazol	2,55E5±0,08	2,31E5±0,07	2,28E5±0,16
Sülfametoksipiridazin	3,17E5 ^b ±0,05	3,08E5 ^b ±0,04	3,56E5 ^a ±0,08
Sülfamonometoksin	3,19E5 ^b ±0,04	3,12E5 ^b ±0,03	3,60E5 ^a ±0,08
Sülfamoksol	3,11E5±0,04	2,95E5±0,13	3,19E5±0,04
Sülfapiridin	2,84E5±0,11	2,93E5±0,04	3,18E5±0,21
Sülfakinoksalin	2,37E5±0,11	2,23E5±0,06	2,40E5±0,17
Sülfatiazol	2,40E5±0,05	2,47E5±0,08	2,73E5±0,18

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

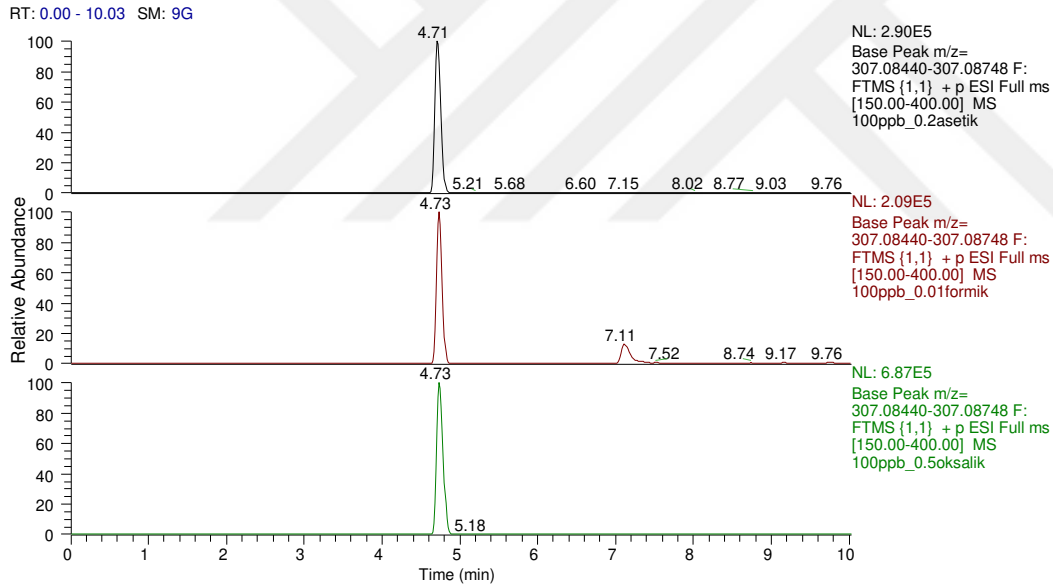
*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.1.6.4. Hareketli faz A'da oksalik, formik ve asetik asit kullanımının sinyal seviyesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması

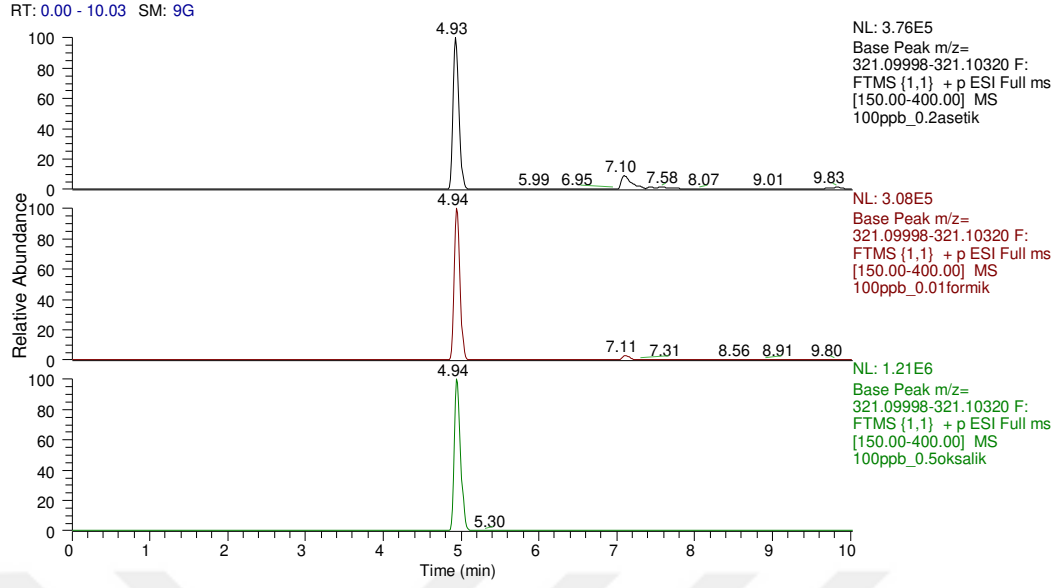
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan asetik asit/su, formik asit/su ve oksalik asit/su ile yapılan analizler sonucunda; analitlerin 0,5 mM oksalik asit/su (p<0,05), %0,01 formik asit/su (p<0,05) ve %0,2 asetik asit/su (p<0,05) konsantrasyonlarında en yüksek pik alanına sahip oldukları tespit edilmiştir. Belirlenen bu konsantrasyonlardaki analit kromatogramları Şekil 4.50-4.65'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, analitlerin en yüksek sinyal seviyesi oksalik asit kullanıldığında, en düşük sinyal seviyesi ise formik asit kullanıldığında tespit edilmiştir. Hafif asidik koşullarda çalışılması sülfonamidlerin kromatografik ayrımını kolaylaştırmakta ve kütle spektrometresinde iyonizasyonunu artırmaktadır. Literatürde sülfonamidlerin analizi için yapılan çalışmalarda pH 3-3,5 aralığında bu analitlerin kolonda iyi bir şekilde ayrıldığı belirtilmiştir (Białk-Bielińska vd 2009, Kung vd 2015). Bu çalışmadaki analiz sonuçları incelendiğinde, genel olarak bu pH aralığında analitlerin yüksek sinyal değeri verdiği tespit edilmiştir. Hareketli fazın pH değeri üç asit için bu aralıkta olmasına rağmen oksalik asit ESI'de analitlerin daha iyi iyonlaşmasını sağlamıştır. Hareketli fazın pH değeri analitin iyonlaşmasına etki ettiği gibi hareketli faza ilave edilen asitlendiriciyi de etkilemektedir.



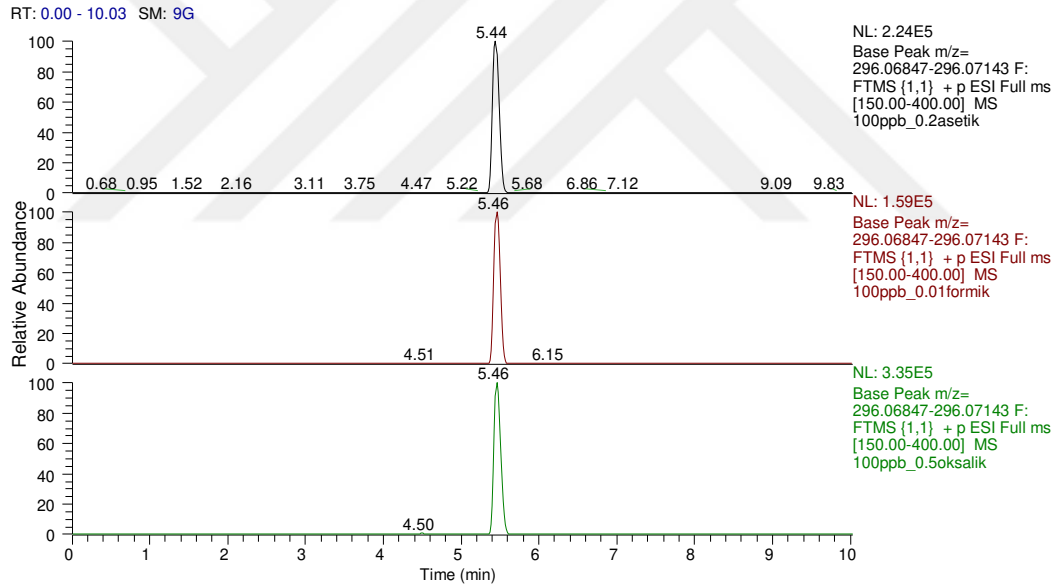
Şekil 4.50. Oksalik, formik ve asetik asidin n-asetilsülfadiazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



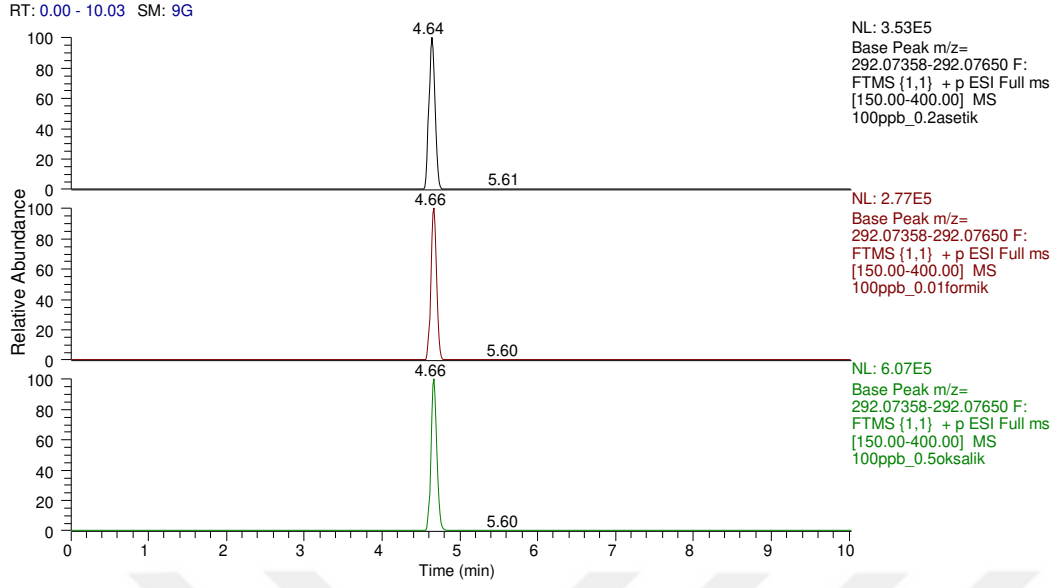
Şekil 4.51. Oksalik, formik ve asetik asidin n-asetilsülfamerazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



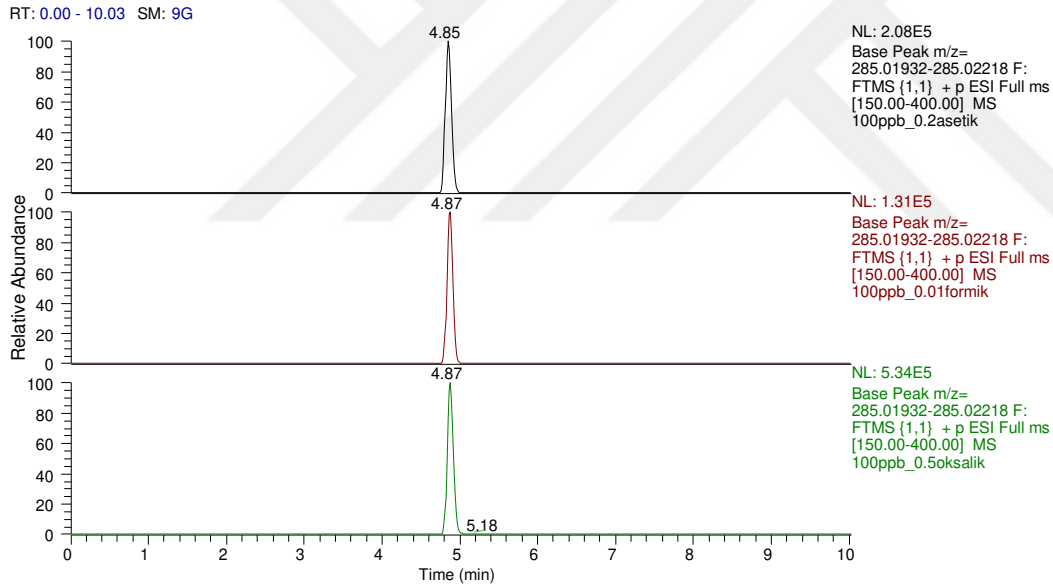
Şekil 4.52. Oksalik, formik ve asetik asidin n-asetilsülfametazın'ın sinyal seviyesi üzerine etkisi



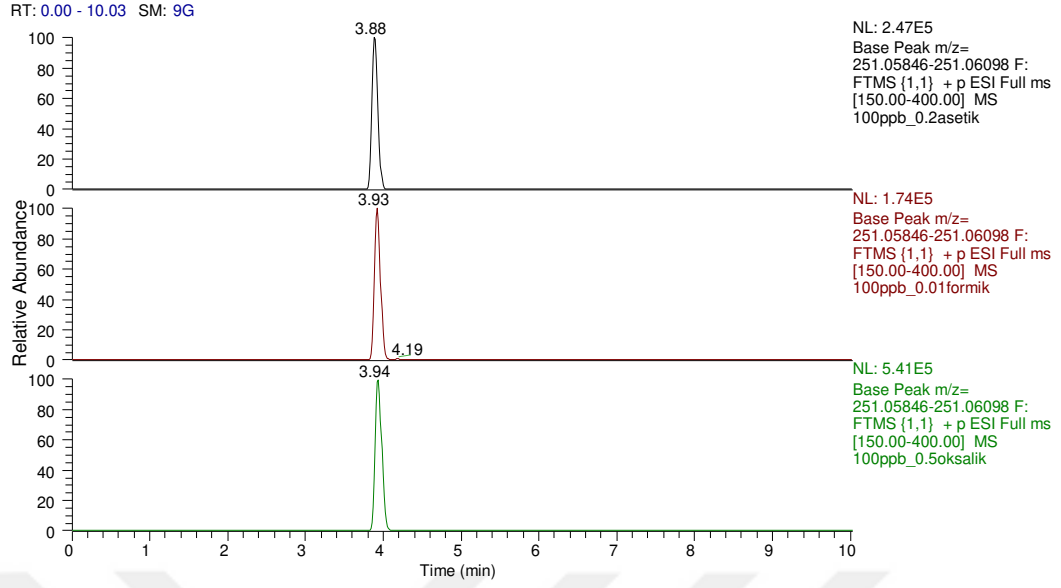
Şekil 4.53. Oksalik, formik ve asetik asidin n-asetilsülfametoksazol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi



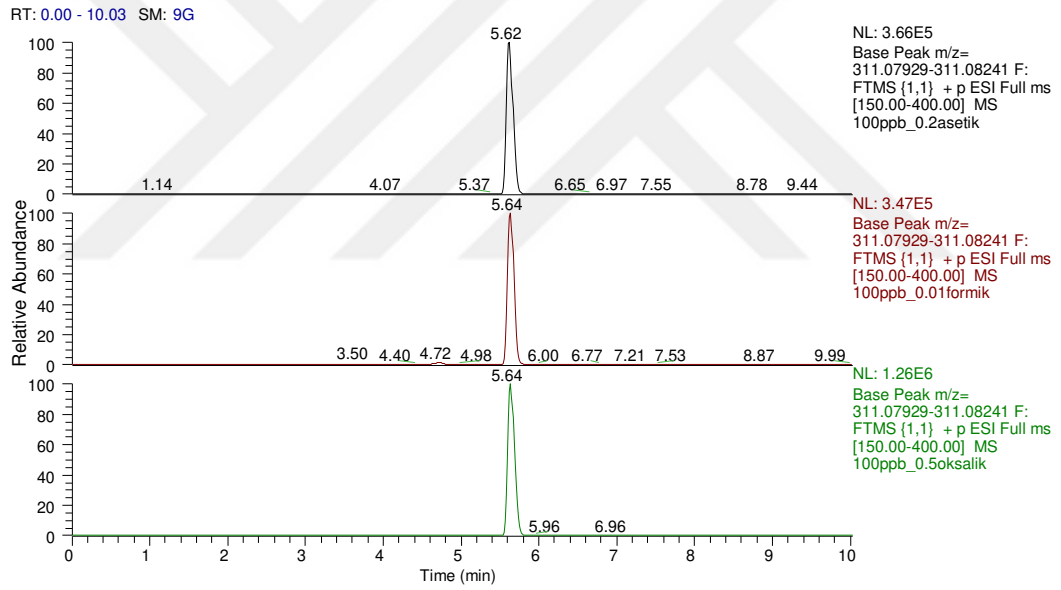
Şekil 4.54. Oksalik, formik ve asetik asidin n-asetilsülfapiridin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



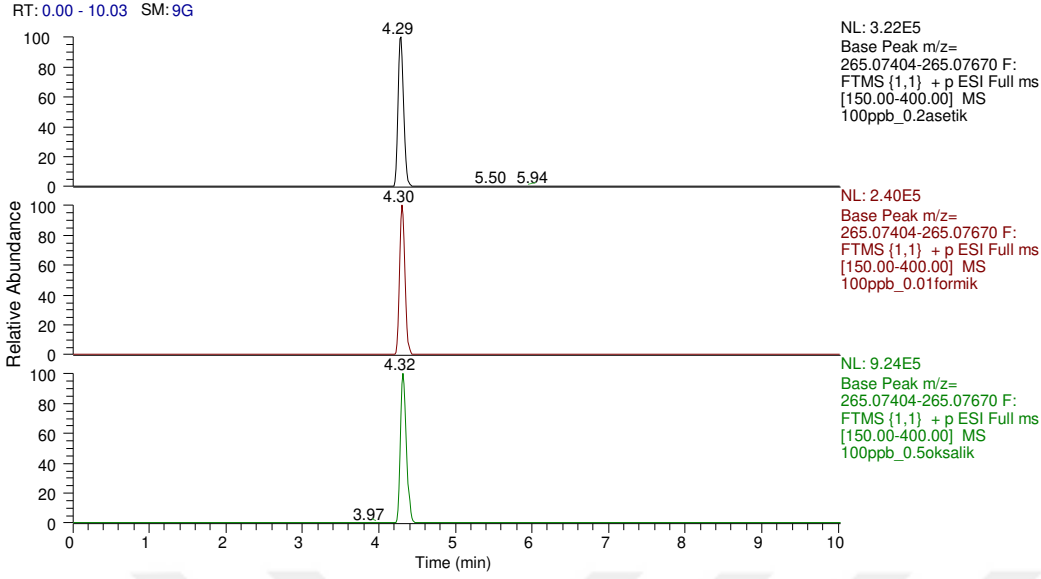
Şekil 4.55. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfakloropiridazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



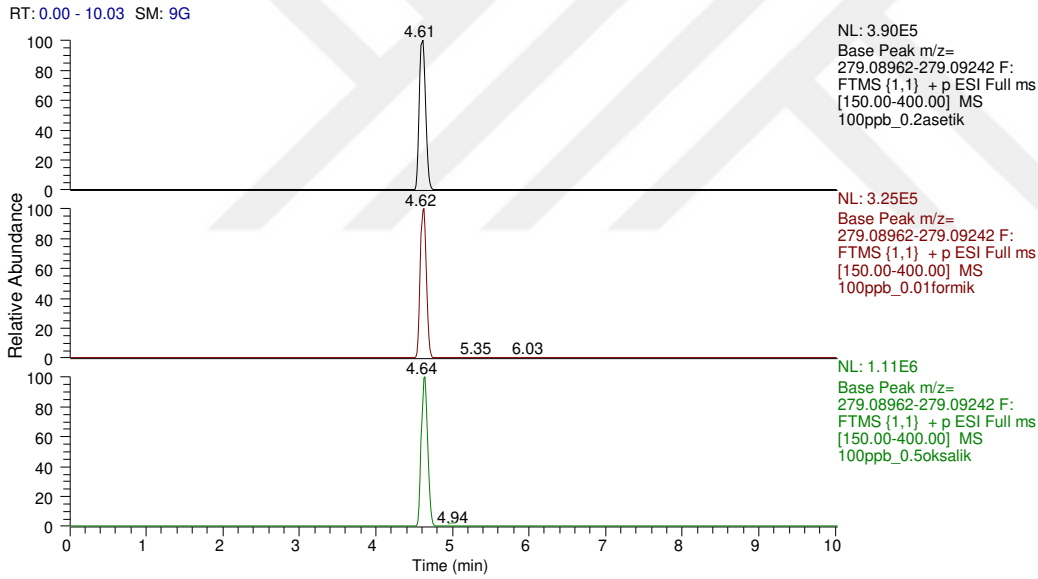
Şekil 4.56. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfadiazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



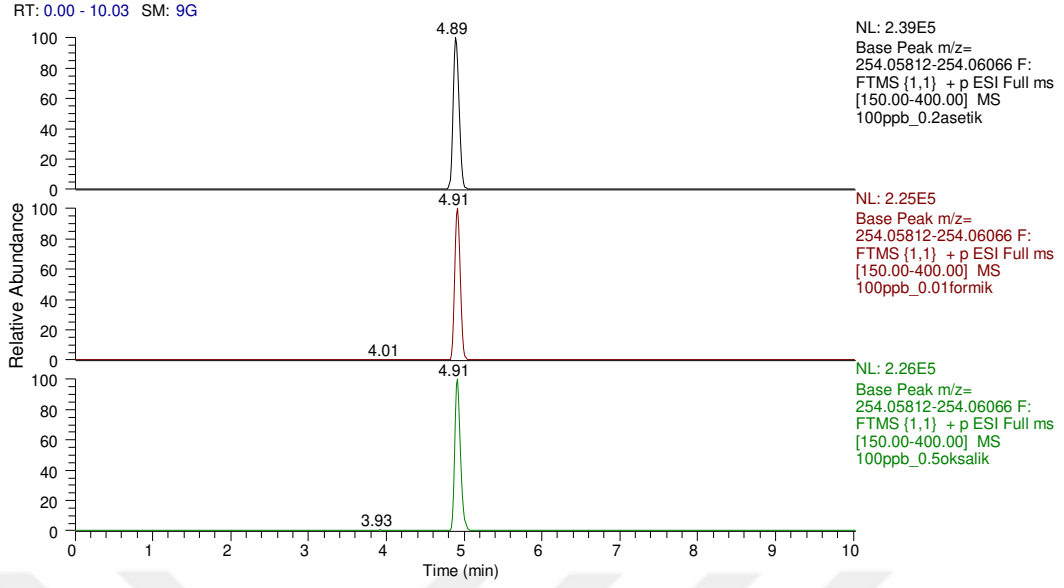
Şekil 4.57. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfadimetoksin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



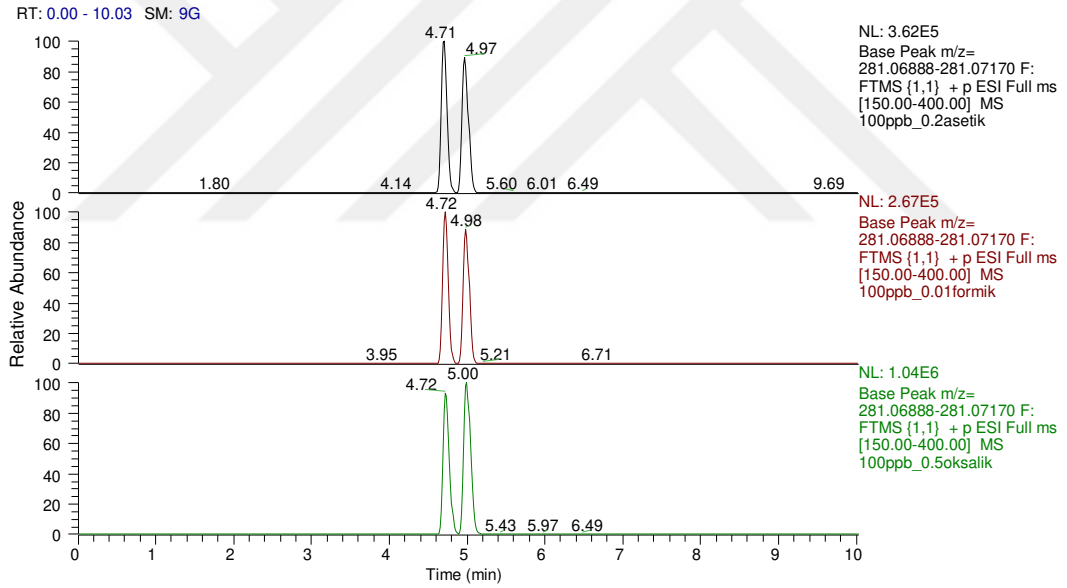
Şekil 4.58. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfamerazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



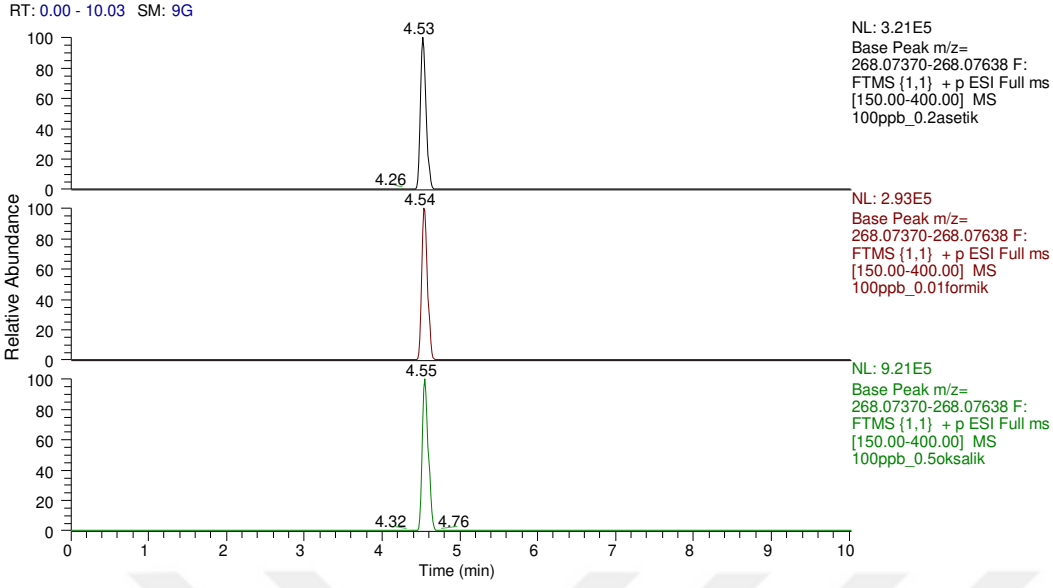
Şekil 4.59. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



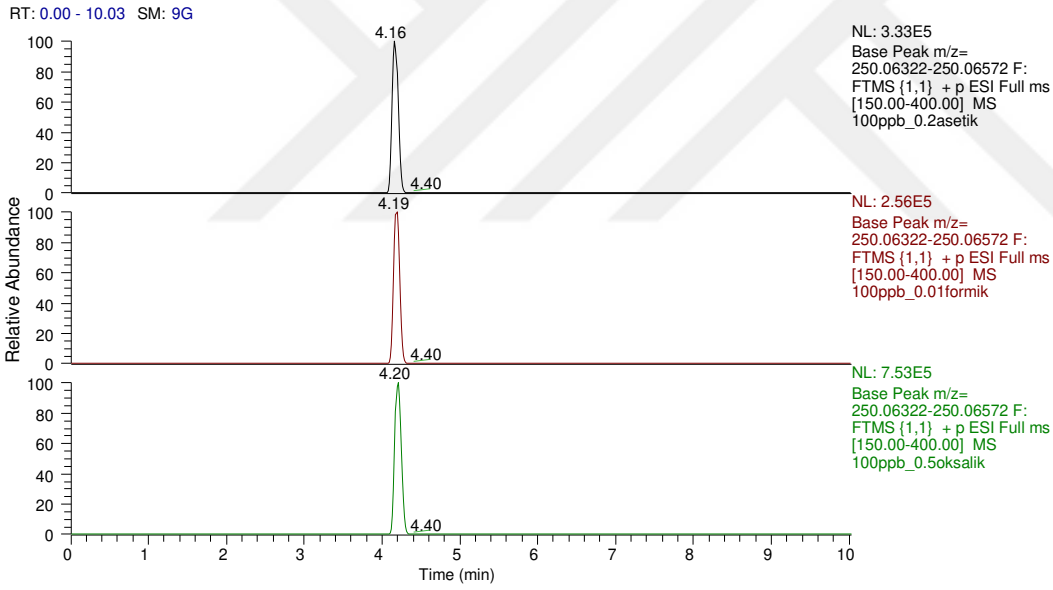
Şekil 4.60. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametoksazol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi



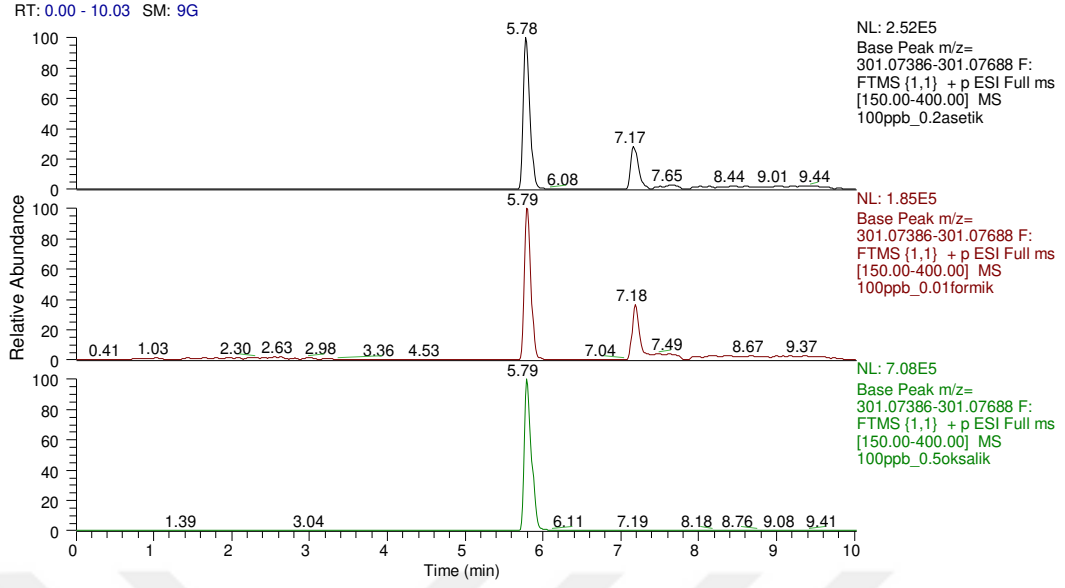
Şekil 4.61. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametoksipiridazin ve sülfamonometoksin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



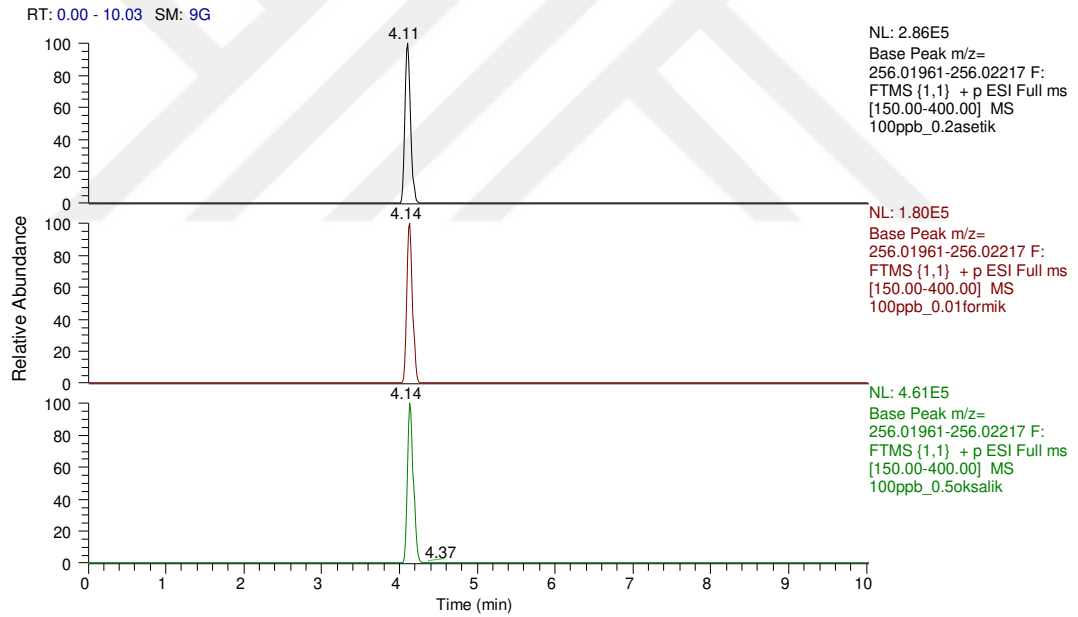
Şekil 4.62. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfamoksol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.63. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfapiridin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.64. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfakinoksalin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.65. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfatiazol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi

4.1.7. Hareketli faz B (%0,1 formik asit/metanol, pH:2,70) sabit tutularak hareketli faz A'da (su) farklı konsantrasyonlarda amonyum format ve amonyum asetat kullanımının analiz sonuçlarına etkisi

4.1.7.1. Amonyum format

Hareketli faz A'da farklı konsantrasyonlarda (1, 5 ve 10 mM) amonyum format kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.6'da belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 6.21, 6.32

ve 6.43'tür. Analitlerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hareketli fazla yapılan analiz sonuçları incelendiğinde pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Konsantrasyon farkının analitlerin sinyal seviyesi üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olduğu ve sinyal seviyesinin genel olarak konsantrasyon arttıkça azaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda amonyum format ilavesinin sinyal seviyesine etkisi

Analit	1mM	5mM	10mM
N-asetilsülfadiazin	2,00E5 ^a ±0,01	1,64E5 ^b ±0,06	1,48E5 ^b ±0,08
N-asetilsülfamerazin	2,04E5 ^a ±0,02	1,72E5 ^b ±0,02	1,55E5 ^c ±0,02
N-asetilsülfametazin	2,62E5 ^a ±0,04	2,41E5 ^{ab} ±0,20	2,21E5 ^b ±0,04
N-asetilsülfametoksazol	2,51E5 ^a ±0,04	1,90E5 ^b ±0,00	1,68E5 ^c ±0,01
N-asetilsülfapiridin	2,17E5 ^a ±0,00	1,93E5 ^b ±0,03	1,89E5 ^b ±0,12
Sülfakloropiridazin	1,15E5 ^a ±0,06	9,92E4 ^b ±0,04	9,11E4 ^b ±0,28
Sülfadiazin	2,38E5±0,14	2,29E5±0,04	2,24E5±0,06
Sülfadimetoksin	3,95E5±0,18	4,21E5±0,11	4,21E5±0,26
Sülfamerazin	3,63E5±0,37	3,48E5±0,21	3,36E5±0,07
Sülfametazin	4,60E5±0,17	4,57E5±0,05	4,51E5±0,08
Sülfametoksazol	2,90E5 ^a ±0,01	2,68E5 ^b ±0,03	2,41E5 ^c ±0,02
Sülfametoksipiridazin	3,87E5 ^b ±0,15	4,22E5 ^a ±0,04	3,98E5 ^{ab} ±0,01
Sülfamonometoksin	3,89E5 ^b ±0,10	4,25E5 ^a ±0,04	4,01E5 ^{ab} ±0,01
Sülfamoksol	3,96E5 ^b ±0,10	4,20E5 ^a ±0,00	4,10E5 ^{ab} ±0,06
Sülfapiridin	3,74E5 ^a ±0,25	3,25E5 ^{ab} ±0,09	3,07E5 ^b ±0,06
Sülfakinoksalin	1,42E5 ^{ab} ±0,06	1,52E5 ^a ±0,01	1,39E5 ^b ±0,01
Sülfatiazol	1,55E5 ^a ±0,03	1,57E5 ^a ±0,05	1,39E5 ^b ±0,04

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.1.7.2. Amonyum asetat

Hareketli faz A'da farklı konsantrasyonlarda (1, 5 ve 10 mM) amonyum asetat kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.7'de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 6.49, 6.57 ve 6.64'tür. Analitlerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hareketli fazla yapılan analiz sonuçları incelendiğinde pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Konsantrasyon farkının analitlerin sinyal seviyesi üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olduğu ve sinyal seviyesinin genel olarak konsantrasyon arttıkça azaldığı tespit edilmiştir.

Amonyum format veya amonyum asetat kullanılarak hazırlanan hareketli faz ile yapılan analizler sonucunda, analitlerin sinyal büyüklüğünün 1 mM konsantrasyonda en yüksek olduğu ve konsantrasyon arttıkça pik alanının azaldığı tespit edilmiştir (p<0,05). Tuzlar ile hazırlanan hareketli fazların, asitler ile hazırlanan hareketli fazlar ile kıyaslandığında pik alanlarının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun temel nedeninin hareketli fazın pH değerinin tuzlar kullanıldığında daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü daha önce de belirtildiği üzere sülfonamid

grubu analitlerin analizinin hafif asidik koşullarda gerçekleşmesi kromatografik ayrımı kolaylaştırmakta ve kütle spektrometresinde iyonizasyonu artırmaktadır.

Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda amonyum asetat ilavesinin sinyal seviyesine etkisi

Analit	1mM	5mM	10mM
N-asetilsülfadiazin	1,10E5 ^a ±0,04	4,71E4 ^b ±0,12	3,01E4 ^c ±0,00
N-asetilsülfamerazin	1,23E5 ^a ±0,08	5,55E4 ^b ±0,12	3,78E4 ^c ±0,10
N-asetilsülfametazin	1,98E5 ^a ±0,06	1,05E5 ^b ±0,01	7,20E4 ^c ±0,25
N-asetilsülfametoksazol	1,53E5 ^a ±0,10	7,13E4 ^b ±0,20	4,10E4 ^c ±0,05
N-asetilsülfapiridin	1,20E5 ^a ±0,00	5,27E4 ^b ±0,06	3,58E4 ^c ±0,16
Sülfakloropiridazin	5,35E4 ^a ±0,41	2,02E4 ^b ±0,08	1,36E4 ^c ±0,08
Sülfadiazin	7,91E4 ^a ±0,21	3,24E4 ^b ±0,07	1,91E4 ^c ±0,01
Sülfadimetoksin	2,16E5 ^a ±0,09	1,07E5 ^b ±0,00	7,01E4 ^c ±0,35
Sülfamerazin	1,56E5 ^a ±0,10	7,19E4 ^b ±0,01	5,04E4 ^c ±0,01
Sülfametazin	2,82E5 ^a ±0,16	1,62E5 ^b ±0,01	1,24E4 ^c ±0,04
Sülfametoksazol	1,36E5 ^a ±0,01	5,55E4 ^b ±0,10	3,28E4 ^c ±0,13
Sülfametoksipiridazin	1,73E5 ^a ±0,11	7,78E4 ^b ±0,08	5,06E4 ^c ±0,18
Sülfamonometoksin	1,70E5 ^a ±0,11	7,73E4 ^b ±0,08	5,01E4 ^c ±0,18
Sülfamoksol	1,83E5 ^a ±0,11	9,78E4 ^b ±0,01	6,94E4 ^c ±0,44
Sülfapiridin	1,24E5 ^a ±0,10	6,01E4 ^b ±0,16	3,91E4 ^c ±0,28
Sülfakinoksalin	2,96E5 ^a ±0,07	1,81E5 ^b ±0,17	1,51E4 ^b ±0,31
Sülfatiazol	6,63E4 ^a ±0,35	2,70E4 ^b ±0,02	1,86E4 ^c ±0,07

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

Tuzlar, ESI’de negatif iyon modunda çalışılacağı zaman bazik ortam oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır (Kromidas 2008). Ancak hareketli fazda tuzların kullanılması kolonda kristalizasyona neden olabilmelerinden dolayı kolonun ayırma kapasitesini düşürebilmektedir. Özellikle yüksek konsantrasyonda kullanılmaları iyon kaynağının tıkanmasına ve iyonizasyon veriminin düşmesine neden olabilmektedir (Yu vd 2011). ESI sistemi ile yapılan çalışmalarda tuz konsantrasyonunun damlacık şeklini ve boyutunu değiştirdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonda tuz kullanımı iyonların oluşumunu ve aktarımını engellemektedir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak damlacık çapındaki artış, spreyin merkezindeki iyon yoğunluğunun azalmasına neden olduğundan dolayı analizöre giren iyon sayısında ve buna bağlı olarak sinyal seviyesinde azalma olmaktadır (Peri-Okonny 2001).

4.1.8. Hareketli faz A (0,5 mM oksalik asit/su; pH:3,31) sabit tutularak B fazında (metanol) oksalik, formik ve asetik asit kullanımının analiz sonuçlarına etkisi

4.1.8.1. Oksalik asit

Hareketli faz B’de farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.2 ve 0.5 mM) oksalik asit kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.8’de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 2.70, 2.46

ve 2.20'dir. Analiz sonuçları incelendiğinde analitlerin pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Ancak konsantrasyon farkının analitlerin sinyal seviyesi üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olduğu ve sinyal seviyesinin genel olarak 0.1 mM konsantrasyonda en düşük değerde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 0,2 ve 0,5 mM konsantrasyonları arasında istatistiki olarak bir fark gözlenmemiştir.

Çizelge 4.8. Farklı konsantrasyonlarda oksalik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi

Analit	0,1mM	0,2mM	0,5mM
N-asetilsülfadiazin	6,35E5 ^b ±0,17	8,16E5 ^a ±0,23	8,63E5 ^a ±0,03
N-asetilsülfamerazin	6,57E5 ^b ±0,23	8,13E5 ^a ±0,23	8,49E5 ^a ±0,16
N-asetilsülfametazin	1,34E6±0,03	1,41E6±0,01	1,40E6±0,03
N-asetilsülfametoksazol	3,14E5 ^b ±0,07	4,44E5 ^a ±0,16	4,63E5 ^a ±0,05
N-asetilsülfapiridin	4,77E5 ^b ±0,24	6,92E5 ^a ±0,24	7,55E5 ^a ±0,34
Sülfakloropiridazin	4,43E5 ^b ±0,24	5,95E5 ^a ±0,26	5,97E5 ^a ±0,11
Sülfadiazin	6,20E5 ^b ±0,18	7,39E5 ^a ±0,25	7,67E5 ^a ±0,25
Sülfadimetoksin	1,47E6±0,04	1,34E6±0,06	1,32E6±0,04
Sülfamerazin	8,72E5 ^b ±0,14	1,02E6 ^a ±0,01	9,83E5 ^a ±0,25
Sülfametazin	1,15E6±0,01	1,14E6±0,01	1,11E6±0,03
Sülfametoksazol	2,07E5 ^b ±0,01	2,83E5 ^a ±0,13	2,95E5 ^a ±0,05
Sülfametoksipiridazin	8,75E5 ^b ±0,49	1,05E6 ^a ±0,02	1,06E6 ^a ±0,01
Sülfamonometoksin	8,80E5 ^b ±0,59	1,10E6 ^a ±0,02	1,11E6 ^a ±0,01
Sülfamoksol	9,40E5±0,18	9,78E5±0,16	9,46E5±0,13
Sülfapiridin	7,68E5 ^b ±0,24	8,65E5 ^a ±0,17	8,58E5 ^a ±0,15
Sülfakinoksalin	9,21E5 ^b ±0,28	1,10E6 ^a ±0,02	1,09E6 ^a ±0,02
Sülfatiazol	5,61E5 ^b ±0,21	6,32E5 ^a ±0,21	6,66E5 ^a ±0,01

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.1.8.2. Formik asit

Hareketli faz B'de farklı konsantrasyonlarda (%0.01, 0.05 ve 0.1) formik asit kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.9'da belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 3.51, 3.04 ve 2.89'dur. Analiz sonuçları incelendiğinde analitlerin pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Ancak konsantrasyon farkının analitlerin sinyal seviyesi üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olduğu ve sinyal seviyesinin hareketli fazda formik asit konsantrasyonu arttıkça genel olarak düştüğü tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı konsantrasyonlarda formik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi

Analit	%0,01	%0,05	%0,1
N-asetilsülfadiazin	6,48E5 ^a ±0,18	5,71E5 ^{ab} ±0,33	5,48E5 ^b ±0,34
N-asetilsülfamerazin	6,89E5±0,13	6,52E5±0,32	6,30E5±0,23
N-asetilsülfametazin	1,28E6±0,04	1,26E6±0,02	1,23E6±0,01
N-asetilsülfametoksazol	3,44E5±0,01	3,40E5±0,06	3,54E5±0,40
N-asetilsülfapiridin	6,18E5 ^a ±0,07	6,17E5 ^a ±0,06	5,71E5 ^b ±0,06

Sülfakloropiridazin	5,12E5±0,14	5,14E5±0,03	4,64E5±0,23
Sülfadiazin	6,91E5 ^a ±0,08	6,58E5 ^b ±0,04	6,20E5 ^c ±0,06
Sülfadimetoksin	1,39E6±0,02	1,30E6±0,01	1,29E6±0,00
Sülfamerazin	9,56E5 ^a ±0,11	8,91E5 ^b ±0,08	8,81E5 ^b ±0,16
Sülfametazin	1,09E6±0,00	1,10E6±0,00	1,03E6±0,04
Sülfametoksazol	2,13E5 ^a ±0,06	2,16E5 ^a ±0,04	1,53E5 ^b ±0,17
Sülfametoksipiridazin	1,00E6 ^a ±0,01	9,99E5 ^{ab} ±0,00	9,61E5 ^b ±0,03
Sülfamonometoksin	1,01E6 ^a ±0,01	1,00E6 ^{ab} ±0,00	9,66E5 ^b ±0,03
Sülfamoksol	9,39E5 ^a ±0,15	9,32E5 ^a ±0,17	8,81E5 ^b ±0,02
Sülfapiridin	8,19E5 ^a ±0,13	8,05E5 ^{ab} ±0,35	7,37E5 ^b ±0,13
Sülfakinoksalin	1,04E6 ^a ±0,02	9,48E5 ^b ±0,25	9,33E5 ^b ±0,10
Sülfatiazol	5,55E5 ^a ±0,06	5,59E5 ^a ±0,06	4,94E5 ^b ±0,18

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.1.8.3. Asetik asit

Hareketli faz B’de farklı konsantrasyonlarda (%0.1, 0.2 ve 0.5) asetik asit kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.10’da belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 4.01, 3.60 ve 3.20’dir. Analiz sonuçları incelendiğinde analitlerin pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca genel olarak konsantrasyon farkının analitlerin sinyal seviyesi üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

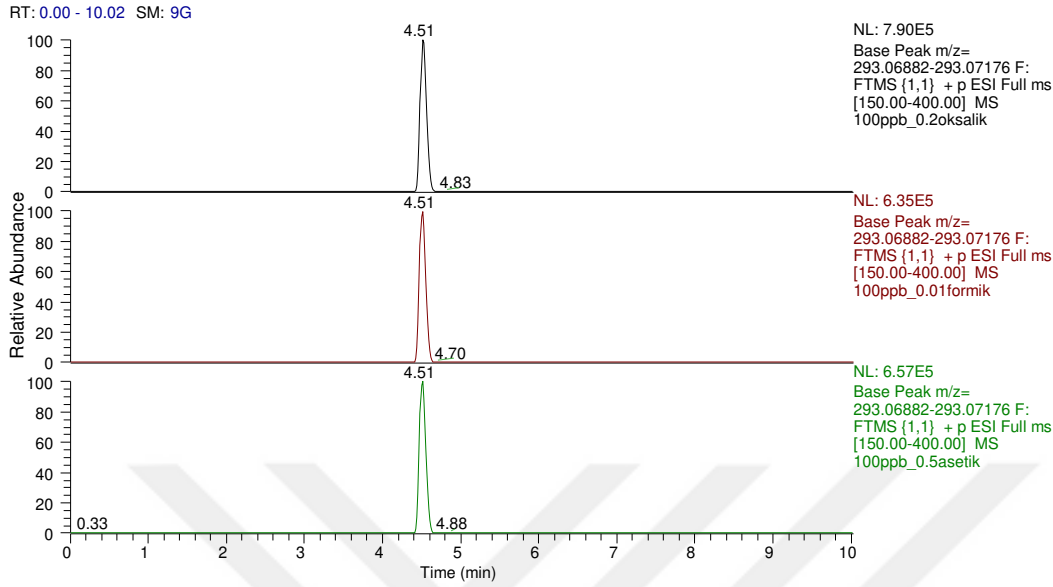
Çizelge 4.10. Farklı konsantrasyonlarda asetik asit ilavesinin sinyal seviyesine etkisi

Analit	%0,1	%0,2	%0,5
N-asetilsülfadiazin	6,47E5±0,02	6,34E5±0,14	6,53E5±0,06
N-asetilsülfamerazin	6,82E5±0,15	6,63E5±0,04	6,65E5±0,28
N-asetilsülfametazin	1,29E6±0,01	1,24E6±0,01	1,25E6±0,02
N-asetilsülfametoksazol	3,49E5±0,07	3,39E5±0,04	3,52E5±0,24
N-asetilsülfapiridin	5,84E5±0,06	5,51E5±0,49	6,33E5±0,08
Sülfakloropiridazin	5,10E5±0,11	4,94E5±0,35	5,34E5±0,04
Sülfadiazin	6,23E5±0,10	6,19E5±0,10	6,26E5±0,10
Sülfadimetoksin	1,32E6±0,00	1,29E6±0,01	1,25E6±0,00
Sülfamerazin	9,01E5±0,03	9,03E5±0,20	8,82E5±0,21
Sülfametazin	1,07E6±0,05	1,06E6±0,01	1,04E6±0,01
Sülfametoksazol	2,21E5±0,13	2,27E5±0,01	2,17E5±0,11
Sülfametoksipiridazin	9,93E5±0,15	9,83E5±0,21	9,91E5±0,20
Sülfamonometoksin	9,98E5±0,18	9,88E5±0,31	9,96E5±0,20
Sülfamoksol	9,21E5±0,08	9,17E5±0,16	9,05E5±0,04
Sülfapiridin	7,49E5±0,11	7,42E5±0,04	7,52E5±0,12
Sülfakinoksalin	9,85E5 ^a ±0,06	9,47E5 ^b ±0,03	9,53E5 ^b ±0,05
Sülfatiazol	5,17E5 ^b ±0,01	4,87E5 ^c ±0,02	5,25E5 ^a ±0,01

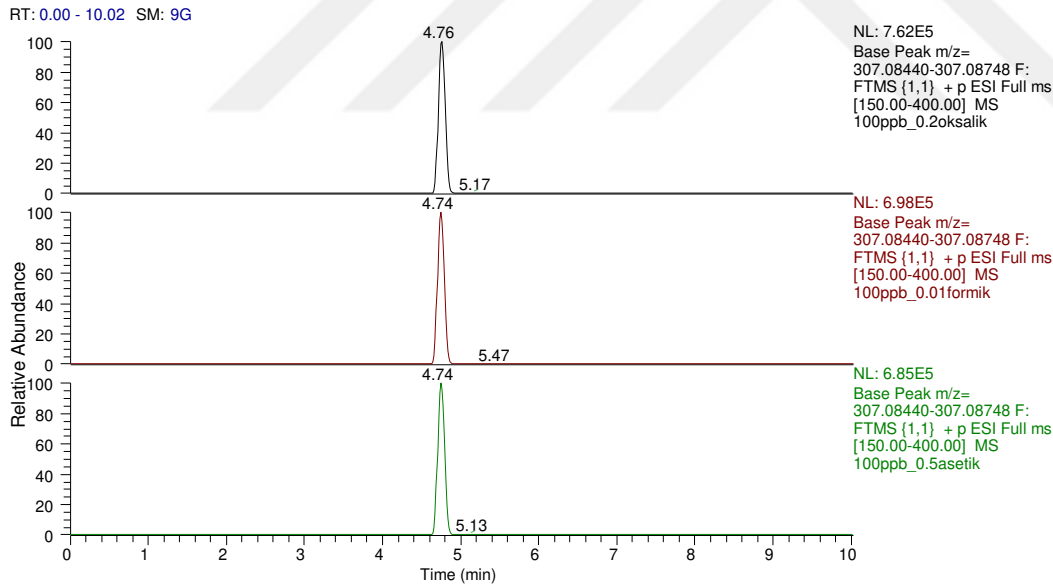
*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

* Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

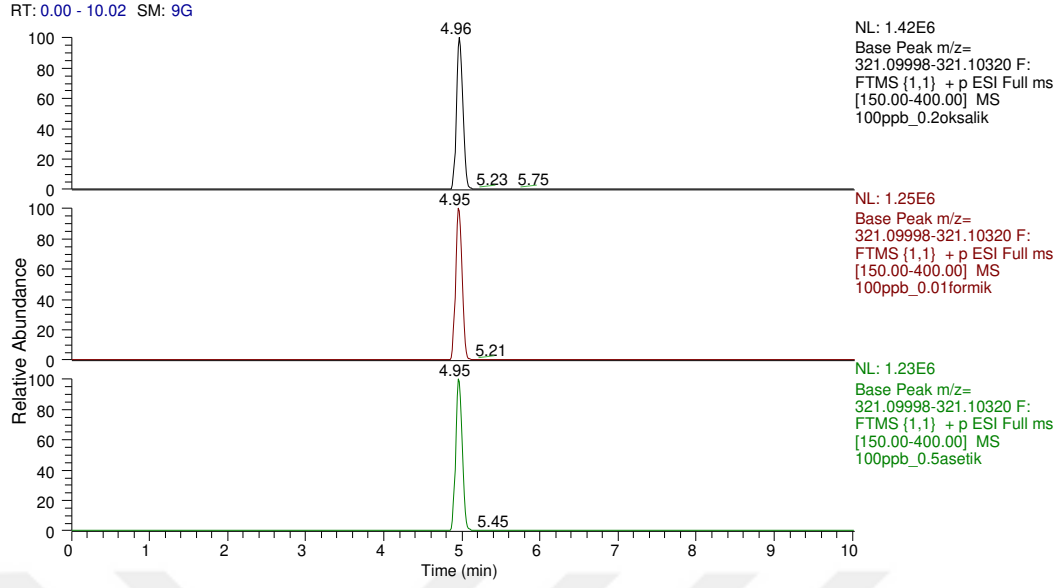
4.1.8.4. Hareketli faz B’de oksalik, formik ve asetik asit kullanımının sinyal seviyesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması



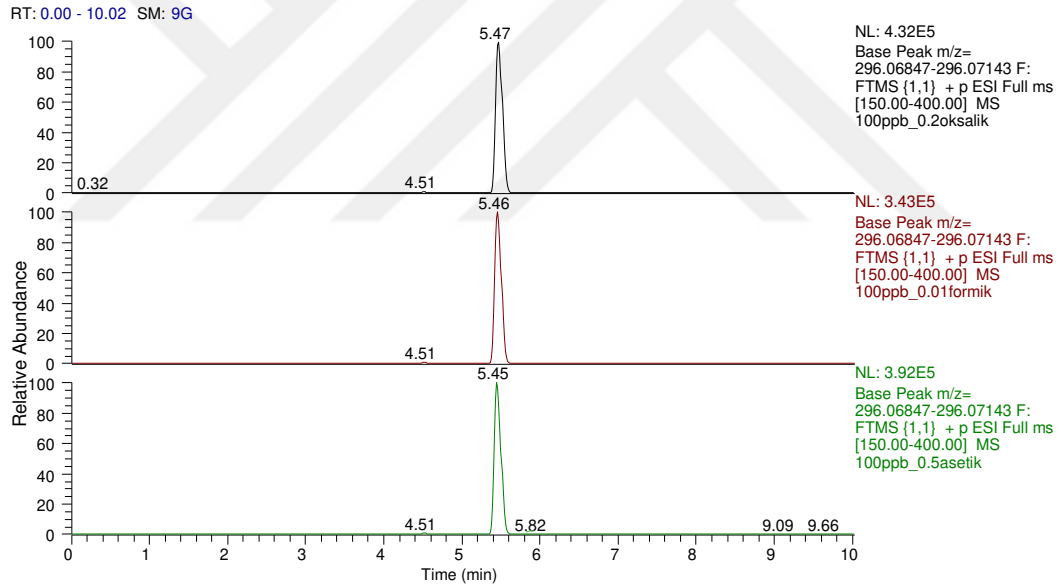
Şekil 4.66. Oksalik, formik ve asetik asidin N-asetilsülfadiazin’in sinyal seviyesi üzerine etkisi



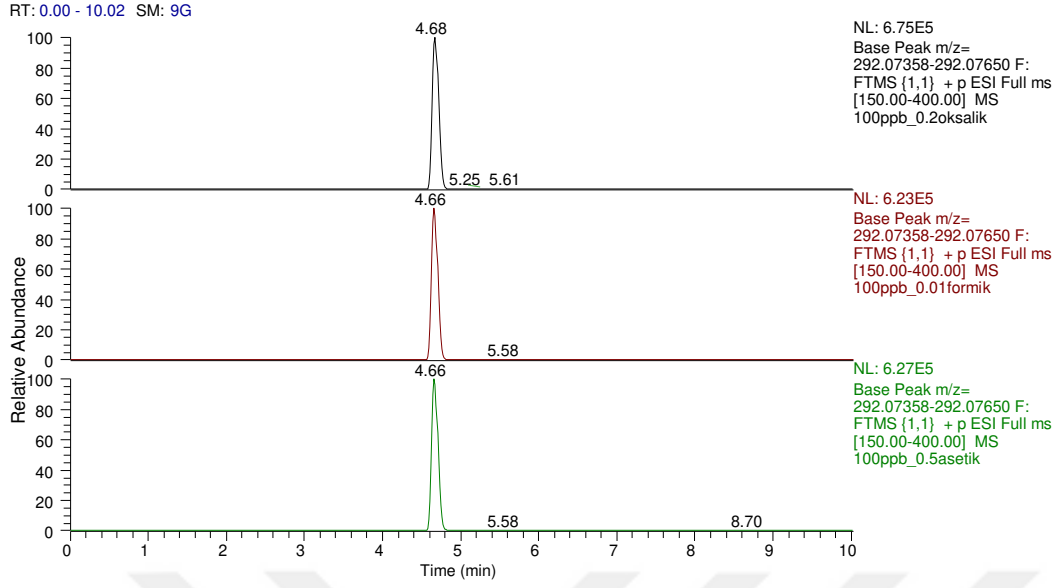
Şekil 4.67. Oksalik, formik ve asetik asidin N-asetilsülfamerazin’in sinyal seviyesi üzerine etkisi



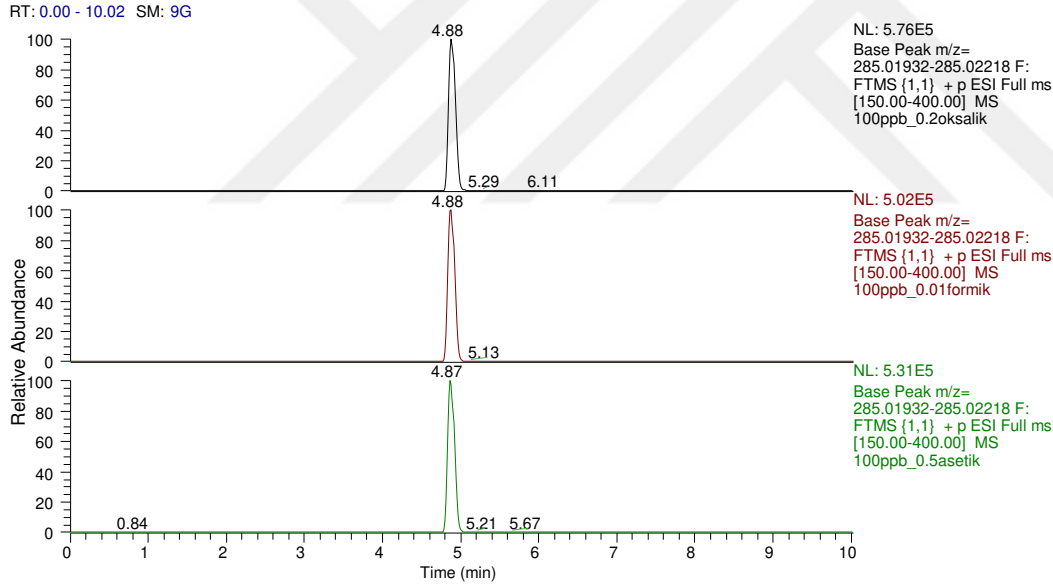
Şekil 4.68. Oksalik, formik ve asetik asidin N-asetilsülfametazın'ın sinyal seviyesi üzerine etkisi



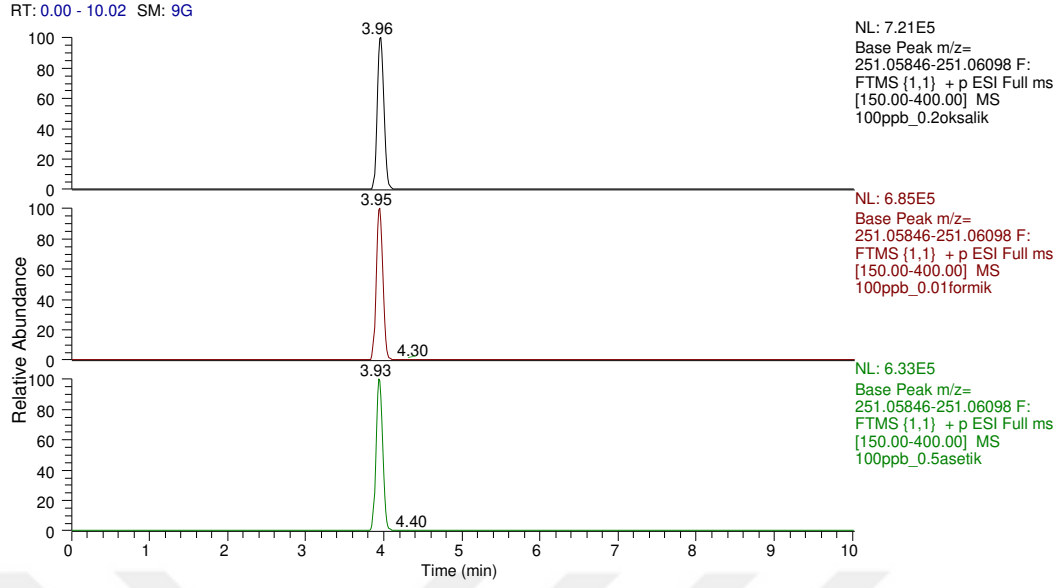
Şekil 4.69. Oksalik, formik ve asetik asidin N-asetilsülfametoksazol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi



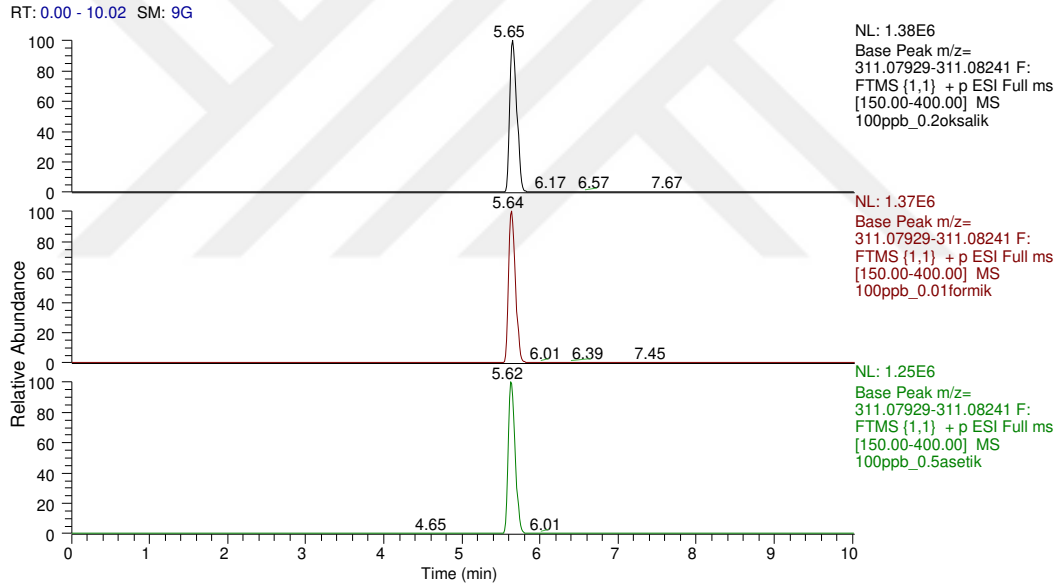
Şekil 4.70. Oksalik, formik ve asetik asidin N-asetilsülfapiridin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



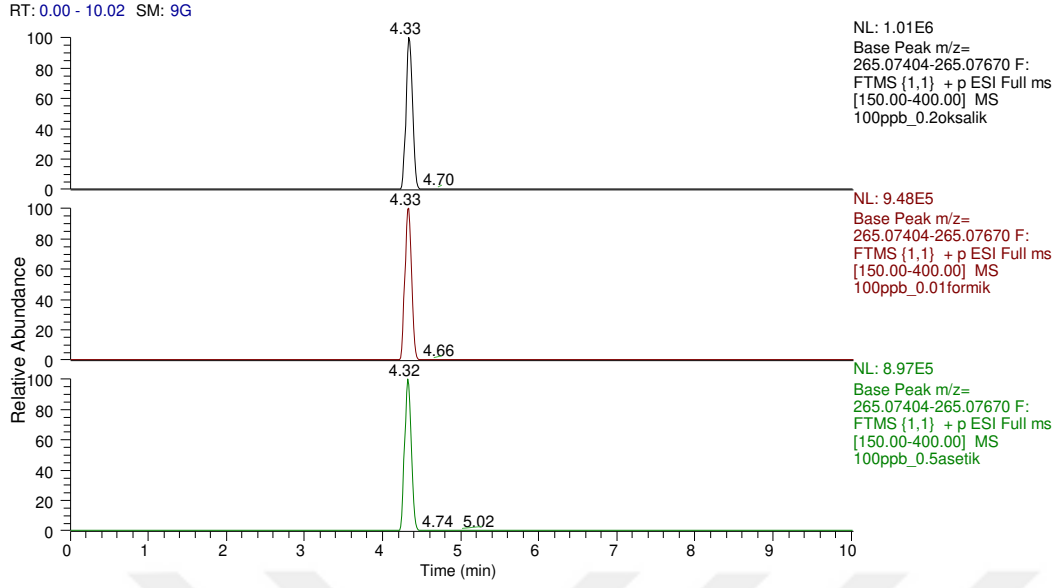
Şekil 4.71. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfakloropiridazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



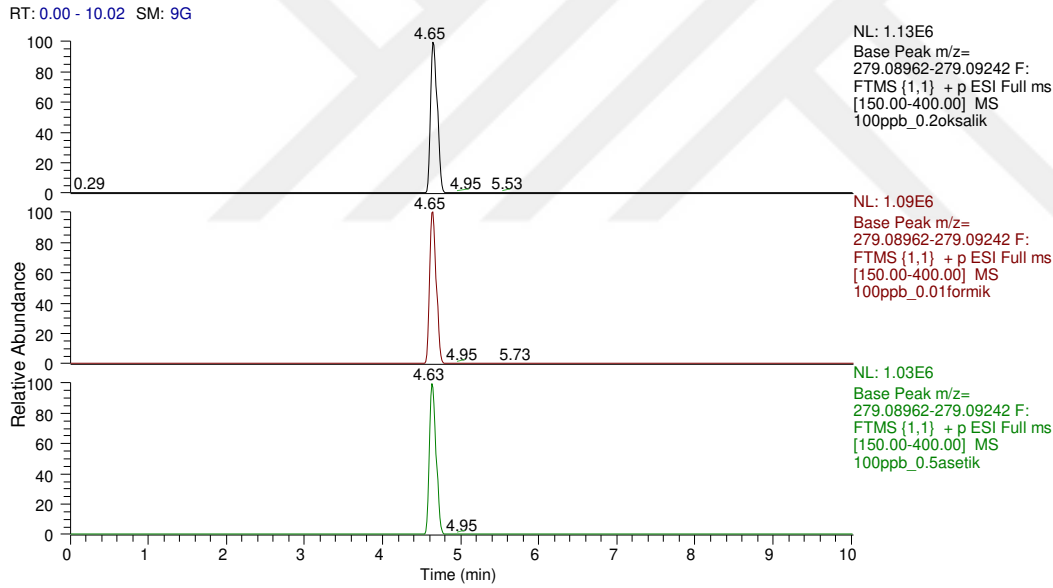
Şekil 4.72. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfadiazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



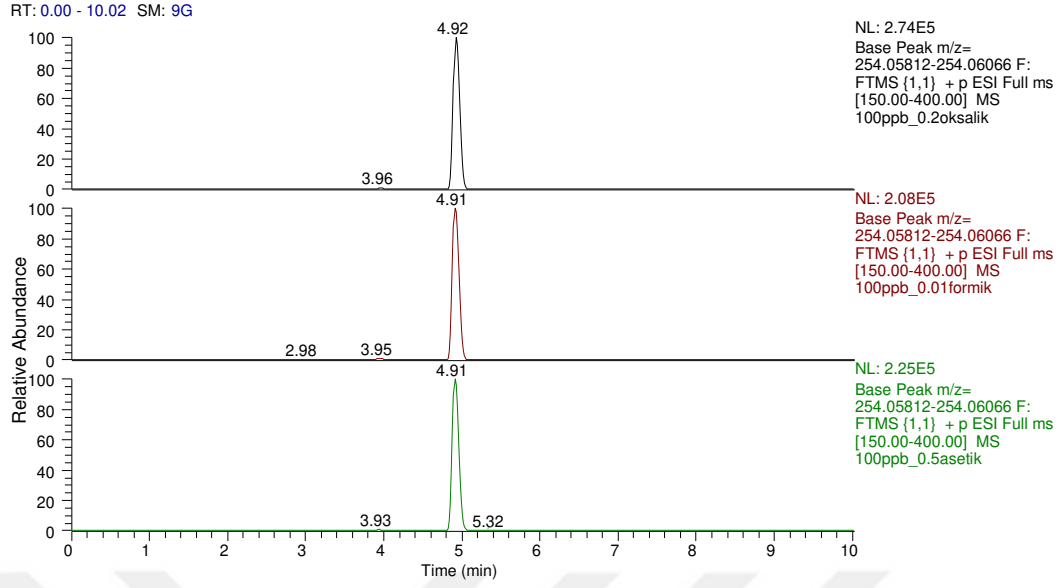
Şekil 4.73. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfadimetoksin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



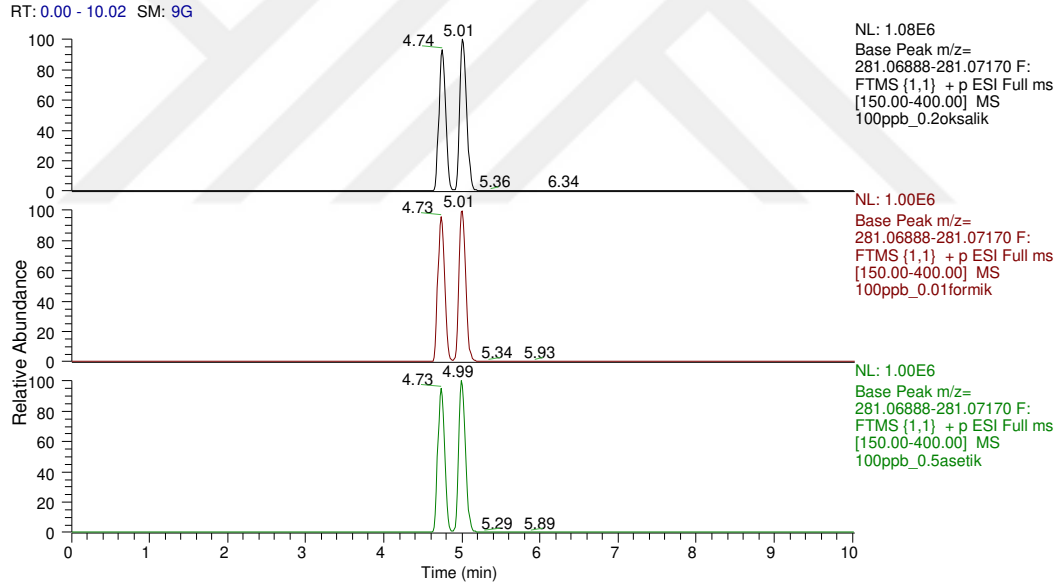
Şekil 4.74. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfamerazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



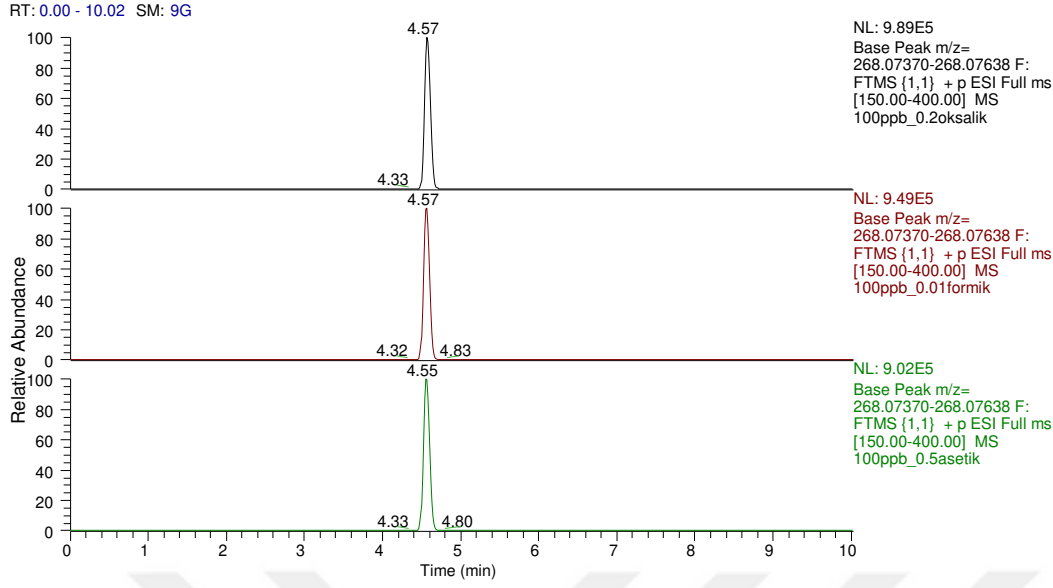
Şekil 4.75. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametazin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



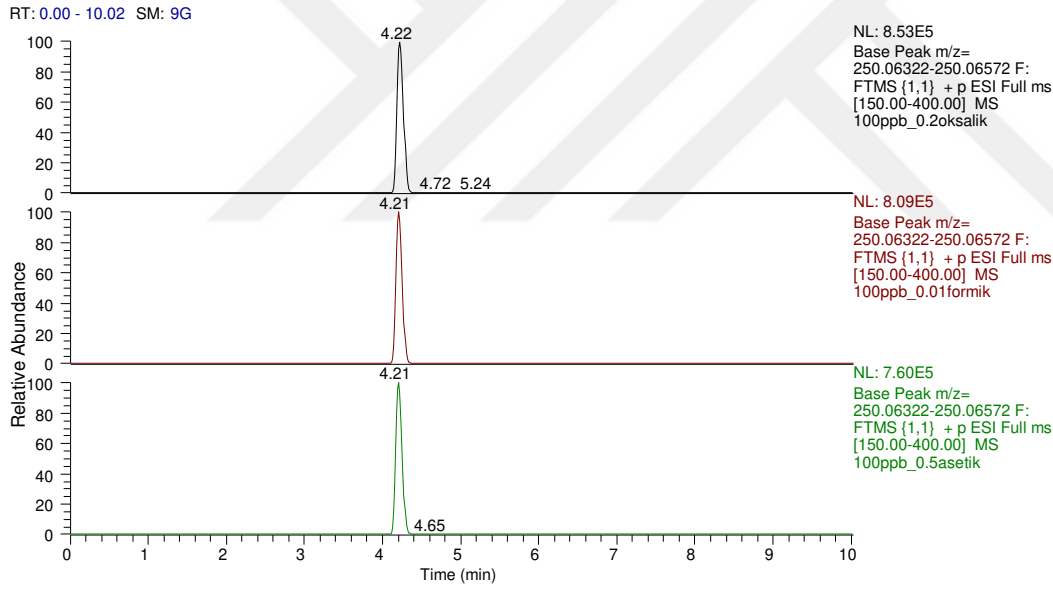
Şekil 4.76. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametoksazol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi



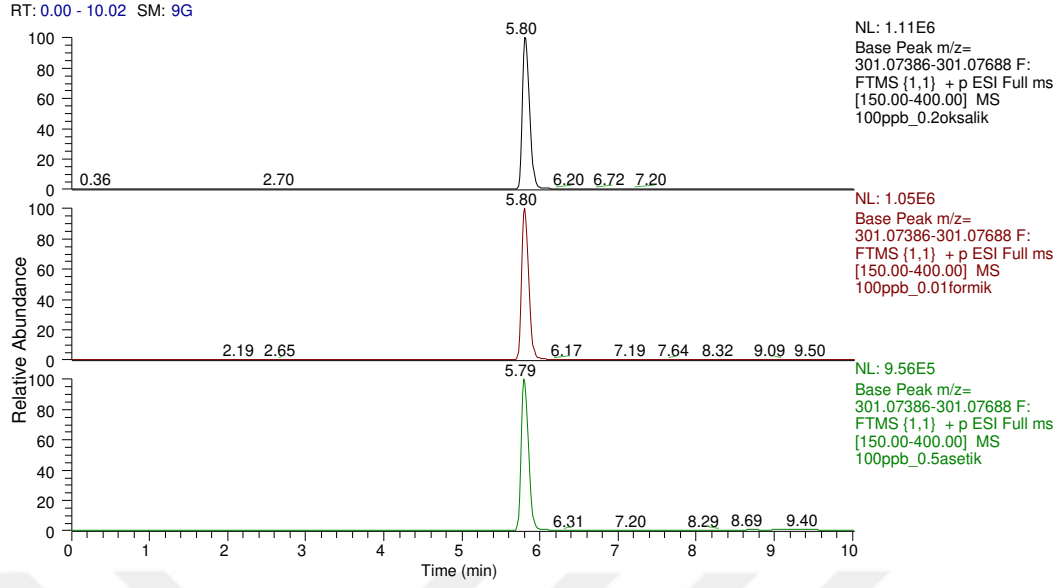
Şekil 4.77. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfametoksipiridazin-sülfamonometoksin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



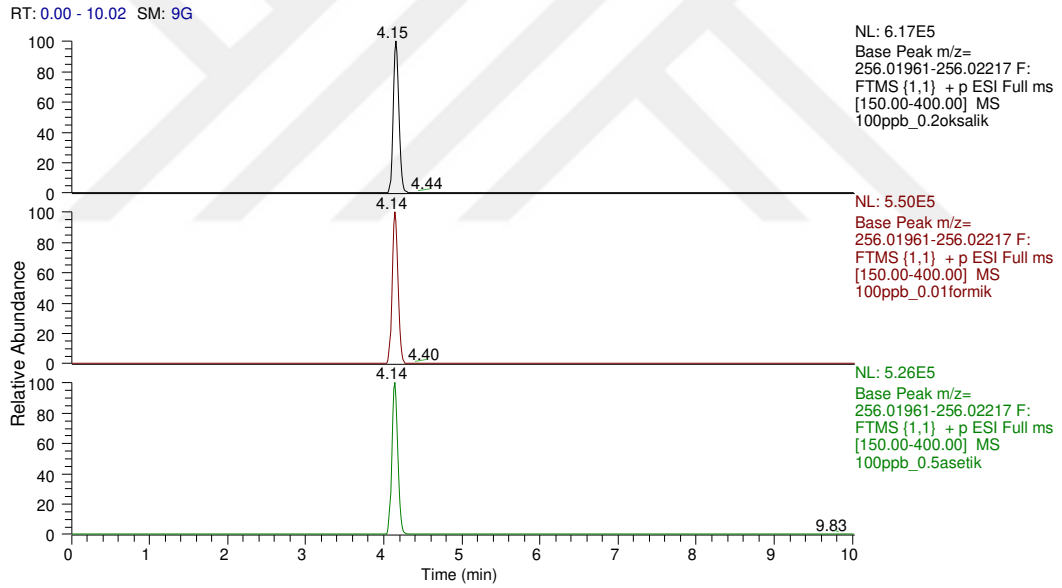
Şekil 4.78. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfamoksol'un sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.79. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfapiridin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.80. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfakinoksalin'in sinyal seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.81. Oksalik, formik ve asetik asidin sülfatiazol'ün sinyal seviyesi üzerine etkisi

Yapılan istatistik analizi sonucunda hareketli faz bileşimine katılan oksalik asidin, analitlerin cihazda vermiş oldukları sinyal seviyesi üzerine önemli düzeyde ($p < 0,05$) etkisinin olduğu ve formik asit ve asetik aside göre iyonlaşmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

4.1.9. Hareketli faz B (0,2 mM oksalik asit/su, pH: 2,46) sabit tutularak A fazında (0,5 mM oksalik asit/su) oksalik asit ile birlikte farklı konsantrasyonlarda amonyum format kullanımının analiz sonuçlarına etkisi

Hareketli faz B’de oksalik aside ilave olarak farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 2 ve 5 mM) amonyum format kullanımının analitlerin sinyal seviyesine etkisini incelemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.11’de belirtilmiştir. Hareketli fazın pH değerleri sırasıyla 3.31, 3.70, 4.11 ve 4.38’dir. Analiz sonuçları incelendiğinde analitlerin pik şekillerinde ve tutulma sürelerinde farklılık gözlenmemiştir. Yapılan istatistik analizi sonucunda hareketli faz A’nın bileşimine katılan amonyum formatın, analitlerin cihazda vermiş oldukları sinyal büyüklüğü üzerine önemli düzeyde ($p < 0,05$) etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ancak bazı analitler açısından farklı konsantrasyonların sinyal seviyesine etkisinin olmadığı, bazı analitler açısından ise konsantrasyon arttıkça sinyal seviyesinin düştüğü belirlenmiştir. Hareketli fazda genellikle düşük konsantrasyonda tuz kullanılması tercih edildiği için 0,5 mM oksalik asit ile 1 mM amonyum formatın birlikte kullanılması uygun görülmüştür.

Çizelge 4.11. Farklı konsantrasyonlarda amonyum format ilavesinin sinyal seviyesine etkisi

Analit	0mM	1mM	2mM	5mM
N-asetilsülfadiazin	6,50E5 ^d ±0,39	2,40E6 ^c ±0,13	3,01E6 ^a ±0,03	2,76E6 ^b ±0,01
N-asetilsülfamerazin	8,53E5 ^b ±0,47	2,59E6 ^a ±0,05	2,70E6 ^a ±0,00	2,53E6 ^a ±0,16
N-asetilsülfametazin	1,34E6 ^c ±0,05	2,74E6 ^{ab} ±0,04	2,91E6 ^a ±0,11	2,70E6 ^b ±0,03
N-asetilsülfametoksazol	3,05E5 ^c ±0,10	2,35E6 ^b ±0,04	2,50E6 ^a ±0,07	2,28E6 ^b ±0,04
N-asetilsülfapiridin	9,45E5 ^c ±0,64	2,61E6 ^a ±0,04	2,68E6 ^a ±0,01	2,45E6 ^b ±0,02
Sülfakloropiridazin	6,26E5 ^c ±0,02	1,50E6 ^a ±0,08	1,41E6 ^{ab} ±0,06	1,28E6 ^b ±0,09
Sülfadiazin	9,53E5 ^b ±0,13	1,45E6 ^a ±0,04	1,54E6 ^a ±0,11	1,42E6 ^a ±0,04
Sülfadimetoksin	1,30E6 ^c ±0,02	2,10E6 ^a ±0,11	1,99E6 ^{ab} ±0,02	1,90E6 ^b ±0,00
Sülfamerazin	9,23E5 ^c ±0,33	1,66E6 ^a ±0,02	1,60E6 ^{ab} ±0,05	1,55E6 ^b ±0,02
Sülfametazin	1,08E6 ^c ±0,02	1,77E6 ^a ±0,00	1,77E6 ^a ±0,02	1,62E6 ^b ±0,02
Sülfametoksazol	6,14E5 ^c ±0,10	1,53E6 ^a ±0,01	1,61E6 ^a ±0,04	1,42E6 ^b ±0,06
Sülfametoksipiridazin	1,06E6 ^b ±0,03	1,92E6 ^a ±0,11	1,84E6 ^a ±0,04	1,84E6 ^a ±0,02
Sülfamonometoksin	1,11E6 ^b ±0,03	1,97E6 ^a ±0,11	1,89E6 ^a ±0,05	1,89E6 ^a ±0,03
Sülfamoksol	9,89E5 ^b ±0,30	1,56E6 ^a ±0,07	1,68E6 ^a ±0,09	1,60E6 ^a ±0,10
Sülfapiridin	8,46E5 ^b ±0,16	1,45E6 ^a ±0,02	1,38E6 ^a ±0,03	1,45E6 ^a ±0,06
Sülfakinoksalin	9,35E5 ^b ±0,33	1,92E6 ^a ±0,06	1,94E6 ^a ±0,08	1,86E6 ^a ±0,02
Sülfatiazol	8,87E5 ^c ±0,06	1,80E6 ^{ab} ±0,04	1,97E6 ^a ±0,08	1,65E6 ^b ±0,03

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir

4.1.10. UHPLC’de oluşturulan analiz metodu

Yapılan analizler sonucunda analitlerin pik şekilleri ve sinyal seviyeleri açısından en uygun hareketli faz bileşimlerinin aşağıda belirtilen şekilde olmasına karar verilmiştir. Bu koşullarda en uygun kolon akış hızının 500 $\mu\text{L}/\text{dk}$, kolon sıcaklığının 30°C ve enjeksiyon hacminin 5 μL olduğu tespit edilmiştir.

Hareketli faz (A): 0,5 mM oksalik asit-1 mM amonyum format/su

Hareketli faz (B): 0,2 mM oksalik asit/MeOH

Analiz süresi 10 dakikadır, ancak ilk 6 dakikasında tüm analitler tespit edilmiştir. Sonraki 2 dakikalık sürede kolondan %100 organik faz akıtılarak kolonun temizlenmesi amaçlanmıştır. Son 2 dakikalık sürede de hareketli fazların analiz başlangıç oranları kolondan akıtılarak kolonun bir sonraki enjeksiyon için şartlanması sağlanmıştır.

4.2. Orbitrap Exactive HESI Parametrelerinin Belirlenmesi

UHPLC cihazında analitlerin daha yüksek pik alanı verdiği, daha iyi pik şekli ve ayırım gösterdiği metot belirlendikten sonra kütle spektrometresi kısmındaki parametrelerin belirlenmesine geçilmiştir. Bu aşamada, iyonlaşmayı ve oluşan iyonların kütle analizörüne iletimini sağlayan sheath ve auxiliary gazların akış hızları, kapiler ve heater sıcaklıkları ve sprej voltajı değerleri tespit edilmiştir. Analiz edilen analitlerin tarama aralığı (scan range) kütle değerlerine göre m/z 150-400 arasında, C-trap kapasitesi 1×10^6 ve maksimum enjeksiyon süresi 20 ms olarak ayarlanmıştır. Ayrıca analitlerin yapısından dolayı pozitif iyonlaşma modu (ESI+) kullanılmıştır.

4.2.1. Kapiler ve heater sıcaklık değerleri

ESI ile oluşan yüklü damlacıklar ısıtılmış kapilere doğru iletilirken ısıtılmış azot gazı ile bu damlacıklardan yüklü partiküller açığa çıkmaktadır. Bu yüzden kapiler ve azot gazının (sheath gaz) sıcaklığının iyonların analizöre iletiminde önemli etkisi vardır. Kapiler sıcaklığı 100-300 °C aralığında ayarlanabilmektedir (Banerjee ve Mazumdar 2012). Düşük sıcaklıklarda iyonların transfer verimi yüksek sıcaklıklara göre daha iyi bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu durum, kapilerin içindeki yüklü damlacıkların boyutu ve sayısı ile ilgilidir. Düşük kapiler sıcaklığında, damlacık boyutu daha büyüktür ve daha düşük hızda hareket etmektedir. Bu durum, damlacıkların kapilerin iç duvarına çarparak yok olmasına engel olmaktadır. Sıcaklık artışı ise çözücünün uzaklaşmasına yardımcı olarak damlacık boyutunun küçülmesine ve gaz faz iyonların sayısının artmasına yol açmaktadır. Ancak bu durum yüklü taneciklerin hızında artışa neden olduğu için kapilerin iç duvarına çarparak sinyalde kayıplara neden olmaktadır. Bu yüzden sıcaklık ayarının iyi bir şekilde yapılması gerekmektedir (Page vd 2007). Heater sıcaklığı, ESI’de oluşan iyonların analizöre iletimini sağlayan azot gazının ısıtılmasını sağlayarak sinyal seviyesine önemli düzeyde etki etmektedir. Spreyde oluşan damlacıklardan çözücünün uzaklaştırılması analizöre giren iyonların miktarında artış sağlamaktadır (Ho vd 2003).

Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde kapiler sıcaklığının 250-320 °C arasında kullanıldığı ve genel olarak heater sıcaklığının kapiler sıcaklığından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgilere dayanarak bu çalışmada Çizelge 4.12’de belirtilen değerler kullanılmıştır. Kapiler ve heater sıcaklığını belirlerken yapılan analizlerde sheath ve auxiliary sırasıyla 50 ve 20; sprej voltajı 4 kv’tur. Analiz sonuçları incelendiğinde kapiler ve heater sıcaklıklarının analitlerin sinyal seviyesi üzerine istatistiki olarak önemli derecede etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). En yüksek sinyal seviyesi kapiler sıcaklığı 250°C’ye ve heater sıcaklığı 350°C’ye ayarlandığında elde edilmiştir.

Çizelge 4.12. Kapiler ve heater sıcaklıklarının sinyal seviyesine etkisi

Kapiler sıcaklığı (°C)	250				275			300	
Heater sıcaklığı (°C)	275	300	325	350	300	325	350	325	350
N-asetilsülfadiazin	5,84E5 [±] 0,12	6,24E5 [±] 0,13	6,65E5 [±] 0,07	7,72E5 [±] 0,15	8,53E5 [±] 0,04	8,98E5 [±] 0,11	9,35E5 [±] 0,12	9,79E5 [±] 0,10	1,03E6 [±] 0,01
N-asetilsülfamerazin	1,30E6 [±] 0,11	1,41E6 [±] 0,04	1,44E6 [±] 0,01	1,68E6 [±] 0,07	1,81E6 [±] 0,02	1,86E6 [±] 0,05	1,88E6 [±] 0,04	1,90E6 [±] 0,01	1,91E6 [±] 0,02
N-asetilsülfametazin	2,05E6 [±] 0,01	2,10E6 [±] 0,05	2,09E6 [±] 0,01	2,30E6 [±] 0,12	2,38E6 [±] 0,06	2,37E6 [±] 0,06	2,33E6 [±] 0,01	2,27E6 [±] 0,04	2,39E6 [±] 0,07
N-asetilsülfametoksazol	6,16E5 [±] 0,01	6,68E5 [±] 0,11	6,78E5 [±] 0,11	7,42E5 [±] 0,09	7,28E5 [±] 0,01	7,04E5 [±] 0,01	7,34E5 [±] 0,16	7,35E5 [±] 0,14	7,44E5 [±] 0,27
N-asetilsülfapiridin	1,64E6 [±] 0,04	1,77E6 [±] 0,06	1,82E6 [±] 0,06	2,12E6 [±] 0,03	2,08E6 [±] 0,04	2,04E6 [±] 0,03	2,08E6 [±] 0,01	2,05E6 [±] 0,07	1,99E6 [±] 0,00
Sülfakloropiridazin	9,11E5 [±] 0,12	9,15E5 [±] 0,06	9,43E5 [±] 0,10	1,03E6 [±] 0,04	9,94E5 [±] 0,09	9,65E5 [±] 0,09	9,47E5 [±] 0,01	8,37E5 [±] 0,13	8,53E5 [±] 0,13
Sülfadiazin	1,15E6 [±] 0,04	1,21E6 [±] 0,08	1,16E6 [±] 0,01	1,26E6 [±] 0,01	1,30E6 [±] 0,01	1,19E6 [±] 0,03	1,11E6 [±] 0,06	9,64E5 [±] 0,17	8,80E5 [±] 0,10
Sülfadimetoksin	1,67E6 [±] 0,02	1,80E6 [±] 0,05	1,83E6 [±] 0,04	1,88E6 [±] 0,06	1,87E6 [±] 0,06	1,76E6 [±] 0,01	1,77E6 [±] 0,01	1,72E6 [±] 0,03	1,78E6 [±] 0,05
Sülfamerazin	1,45E6 [±] 0,02	1,47E6 [±] 0,04	1,39E6 [±] 0,04	1,46E6 [±] 0,06	1,49E6 [±] 0,07	1,38E6 [±] 0,07	1,38E6 [±] 0,06	1,12E6 [±] 0,02	1,26E6 [±] 0,08
Sülfametazin	1,47E6 [±] 0,01	1,55E6 [±] 0,08	1,47E6 [±] 0,06	1,52E6 [±] 0,03	1,54E6 [±] 0,05	1,49E6 [±] 0,01	1,52E6 [±] 0,00	1,35E6 [±] 0,04	1,23E6 [±] 0,02
Sülfametoksazol	1,23E6 [±] 0,01	1,23E6 [±] 0,03	1,23E6 [±] 0,00	1,75E6 [±] 0,04	1,23E6 [±] 0,04	1,21E6 [±] 0,01	1,25E6 [±] 0,01	1,07E6 [±] 0,01	1,06E6 [±] 0,04
Sülfametoksipiridazin	1,61E6 [±] 0,02	1,66E6 [±] 0,02	1,62E6 [±] 0,04	1,27E6 [±] 0,06	1,83E6 [±] 0,06	1,65E6 [±] 0,04	1,67E6 [±] 0,01	1,53E6 [±] 0,04	1,44E6 [±] 0,01
Sülfamonometoksin	1,65E6 [±] 0,01	1,71E6 [±] 0,02	1,67E6 [±] 0,04	1,32E6 [±] 0,05	1,88E6 [±] 0,06	1,70E6 [±] 0,03	1,72E6 [±] 0,01	1,58E6 [±] 0,04	1,49E6 [±] 0,01
Sülfamoksol	1,27E6 [±] 0,01	1,33E6 [±] 0,05	1,37E6 [±] 0,08	1,67E6 [±] 0,06	1,38E6 [±] 0,08	1,33E6 [±] 0,01	1,33E6 [±] 0,01	1,16E6 [±] 0,04	1,10E6 [±] 0,00
Sülfapiridin	1,24E6 [±] 0,06	1,31E6 [±] 0,03	1,39E6 [±] 0,04	1,47E6 [±] 0,03	1,30E6 [±] 0,01	1,34E6 [±] 0,00	1,22E6 [±] 0,04	1,10E6 [±] 0,01	9,74E5 [±] 0,12
Sülfakinoksalin	1,52E6 [±] 0,01	1,58E6 [±] 0,04	1,56E6 [±] 0,04	1,30E6 [±] 0,02	1,63E6 [±] 0,03	1,65E6 [±] 0,03	1,70E6 [±] 0,06	1,46E6 [±] 0,01	1,46E6 [±] 0,03
Sülfatiazol	1,15E6 [±] 0,00	1,20E6 [±] 0,03	1,28E6 [±] 0,02	1,37E6 [±] 0,01	1,31E6 [±] 0,04	1,30E6 [±] 0,01	1,26E6 [±] 0,04	1,06E6 [±] 0,02	1,01E6 [±] 0,00

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.2.2. Sheath ve auxiliary gaz değerleri

Sheath gaz kapilerden kapilerin ucuna gelen sıvının iyi bir şekilde spreye dönüşümü açısından önemlidir. Bu gaz aynı zamanda ESI probunda oluşan yüklü damlacıkların analizör girişine iletimini de sağlamaktadır. Auxiliary gaz ise oluşan yüklü damlacıklardan çözücünün uzaklaştırılmasını sağlayarak boyutunun azaltılmasında rol almaktadır (Banerjee ve Mazumdar 2012). Cihazın kullanım kitabında belirtildiği üzere sheath ve auxiliary gaz için minimum değerler sırasıyla 35 ve 10'dur (Anonymous 2009a). Bu bilgiye dayanarak analizde kullanılmak üzere belirlenen sheath ve auxiliary gaz değerleri ve sinyal seviyesine etkileri Çizelge 4.13'de belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, analitlerin en yüksek sinyal seviyesi sheath gaz 40 ve auxiliary gaz 10 olarak ayarlandığında elde edilmiştir.

Çizelge 4.13. Sheath ve auxiliary gaz değerlerinin sinyal seviyesine etkisi

Sheath gaz	40		50		
Auxiliary gaz	10	20	10	20	30
N-asetilsülfadiazin	8,03E5 ^a ±0,07	7,97E5 ^a ±0,04	7,93E5 ^a ±0,00	7,50E5 ^b ±0,16	6,41E5 ^c ±0,03
N-asetilsülfamerazin	1,83E6 ^a ±0,01	1,70E6 ^b ±0,01	1,83E6 ^a ±0,02	1,68E6 ^b ±0,07	1,42E6 ^c ±0,01
N-asetilsülfametazin	3,06E6 ^a ±0,05	2,46E6 ^b ±0,03	2,98E6 ^a ±0,01	2,30E6 ^b ±0,12	1,76E6 ^c ±0,06
N-asetilsülfametoksazol	7,52E5 ^a ±0,11	7,25E5 ^b ±0,08	7,54E5 ^a ±0,09	7,28E5 ^b ±0,10	6,24E5 ^c ±0,02
N-asetilsülfapiridin	2,47E6 ^a ±0,02	2,09E6 ^b ±0,02	2,44E6 ^a ±0,01	2,12E6 ^b ±0,03	1,59E6 ^c ±0,01
Sülfakloropiridazin	1,27E6 ^a ±0,01	1,08E6 ^b ±0,01	1,26E6 ^a ±0,05	1,03E6 ^b ±0,04	7,86E5 ^c ±0,14
Sülfadiazin	1,77E6 ^a ±0,04	1,34E6 ^b ±0,00	1,75E6 ^a ±0,01	1,26E6 ^b ±0,01	8,64E5 ^c ±0,02
Sülfadimetoksin	3,01E6 ^a ±0,11	2,23E6 ^b ±0,07	2,82E6 ^a ±0,02	1,84E6 ^c ±0,11	1,40E6 ^d ±0,06
Sülfamerazin	2,30E6 ^a ±0,00	1,68E6 ^b ±0,00	2,25E6 ^a ±0,09	1,46E6 ^c ±0,06	1,09E6 ^d ±0,01
Sülfametazin	2,63E6 ^a ±0,02	1,87E6 ^c ±0,11	2,42E6 ^b ±0,02	1,52E6 ^d ±0,03	1,20E6 ^c ±0,01
Sülfametoksazol	1,89E6 ^a ±0,05	1,47E6 ^c ±0,00	1,83E6 ^{ab} ±0,03	1,75E6 ^b ±0,04	1,02E6 ^d ±0,03
Sülfametoksipiridazin	2,69E6 ^a ±0,08	1,93E6 ^c ±0,02	2,49E6 ^b ±0,09	1,27E6 ^d ±0,06	1,25E6 ^d ±0,02
Sülfamonometoksin	2,74E6 ^a ±0,07	1,98E6 ^c ±0,02	2,54E6 ^b ±0,07	1,32E6 ^d ±0,05	1,29E6 ^d ±0,02
Sülfamoksol	2,07E6 ^a ±0,03	1,55E6 ^d ±0,01	1,99E6 ^b ±0,00	1,67E6 ^c ±0,06	1,06E6 ^c ±0,00
Sülfapiridin	2,12E6 ^a ±0,08	1,54E6 ^b ±0,07	2,01E6 ^a ±0,08	1,47E6 ^b ±0,03	1,02E6 ^c ±0,02
Sülfakinoksalin	2,34E6 ^a ±0,01	1,80E6 ^b ±0,09	2,33E6 ^a ±0,01	1,30E6 ^c ±0,02	1,29E6 ^c ±0,08
Sülfatiazol	1,66E6 ^a ±0,03	1,35E6 ^b ±0,05	1,63E6 ^a ±0,01	1,37E6 ^b ±0,01	1,01E6 ^c ±0,01

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.2.3. Sprey voltaj değerleri

Kapilerin çıkışındaki uca uygulanan sprej voltajı, burada oluşturduğu elektiriksel alan ile sıvı yüzeyinden yüklü damlacıkların oluşarak ayrılmasında önemli rol oynamaktadır. Metanol ilavesinin olmadığı sulu çözeltiler ile stabil sprej oluşumu oldukça zor veya imkansızdır. Sulu çözeltinin oranının arttığı durumlarda stabil sprej oluşumu, voltajın artırılması ile gözlemlenmiştir (Cech ve Enke 2001). Bu bilgiye dayanarak analizde kullanılmak üzere belirlenen sprej voltajı değerleri ve sinyal seviyesine etkileri Çizelge 4.14'de belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, analitlerin en yüksek sinyal seviyesine 4 kV, en düşük sinyal miktarına ise 3 kV değerinde ulaştığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.14. Sprey voltajının sinyal seviyesine etkisi

Sprey voltajı (kV)	3	3.5	4
N-asetilsülfadiazin	7,26E5 ^c ±0,11	7,73E5 ^b ±0,01	8,03E5 ^a ±0,07
N-asetilsülfamerazin	1,73E6±0,00	1,85E6±0,03	1,83E6±0,01
N-asetilsülfametazin	2,89E6±0,04	3,00E6±0,11	3,06E6±0,05
N-asetilsülfametoksazol	7,26E5±0,00	7,44E5±0,19	7,44E5±0,23
N-asetilsülfapiridin	2,32E6 ^b ±0,01	2,42E6 ^a ±0,03	2,47E6 ^a ±0,02
Sülfakloropiridazin	1,19E6±0,03	1,24E6±0,04	1,27E6±0,01
Sülfadiazin	1,68E6 ^b ±0,01	1,67E6 ^b ±0,01	1,77E6 ^a ±0,04
Sülfadimetoksin	2,79E6±0,11	2,89E6±0,01	3,01E6±0,11
Sülfamerazin	2,15E6 ^b ±0,04	2,26E6 ^a ±0,00	2,30E6 ^a ±0,00
Sülfametazin	2,41E6 ^b ±0,04	2,46E6 ^{ab} ±0,10	2,63E6 ^a ±0,02
Sülfametoksazol	1,81E6 ^b ±0,01	1,87E6 ^{ab} ±0,04	1,91E6 ^a ±0,02
Sülfametoksipiridazin	2,53E6 ^b ±0,03	2,60E6 ^{ab} ±0,09	2,73E6 ^a ±0,04
Sülfamonometoksin	2,57E6 ^b ±0,03	2,65E6 ^{ab} ±0,08	2,79E6 ^a ±0,04
Sülfamoksol	1,93E6 ^b ±0,04	2,01E6 ^{ab} ±0,01	2,07E6 ^a ±0,03
Sülfapiridin	2,01E6 ^b ±0,00	2,03E6 ^b ±0,04	2,15E6 ^a ±0,04
Sülfakinoksalin	2,28E6 ^b ±0,02	2,35E6 ^a ±0,03	2,34E6 ^{ab} ±0,01
Sülfatiazol	1,54E6 ^b ±0,03	1,65E6 ^a ±0,01	1,66E6 ^a ±0,03

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.3. Hızlandırılmış Çözgen Ekstraksiyonu Yönteminin Geliştirilmesi

Bu teknikte metot geliştirme aşamasında öncelikle numuneyi temsil edebilecek örnek miktarının ve belirlenen örnek miktarının konulabileceği uygun boyuttaki ekstraksiyon hücresinin seçiminin yapılması gerekmektedir. Hücrenin tamamen örnek ile doldurulması şart değildir; ancak hücrenin dolu olması ekstraksiyon işleminde daha az miktarda çözgenin harcanmasını sağlamaktadır. Örnek miktarı ve hücre hacmi belirlendikten sonra cihaz parametreleri standart değerlerde ayarlanarak uygun ekstraksiyon çözgeninin (tek veya karışım) seçimi yapılmalıdır. Kullanılacak çözgen ve bileşimi belirlendikten sonra ekstraksiyon sıcaklığı, döngü sayısı ve statik modun süresi belirlenmelidir (Luthria vd 2004).

Bu çalışmada, 10 mL'lik hücreler kullanılmıştır. Ekstraksiyonda küçük boyutta hücrelerin kullanılması hem numune hem de çözgen tüketiminin azaltılması açısından önemlidir (Kantiani vd 2010). Hücreyi tamamen doldurmak için sadece 5 g örnek veya 2,5 g örnek ile birlikte 1 g diatom toprağı kullanılmıştır. Diatom toprağı hücreye örnek konulmadan önce, konulduktan sonra ve örnek ile karıştırılmış olarak 3 farklı şekilde konulmuştur. Ekstraksiyon işleminin verimini belirlemek amacıyla örneklerde son konsantrasyon 10 ppb olacak şekilde örneklerle standart karışımdan 100 µL ilave edilmiş ve 30 dk beklenmiştir. Cihaz parametreleri sabit koşullarda tutularak yapılan analiz sonuçlarına göre sonraki aşamalara sadece örnek kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir. ASE 350 cihazında basınç değeri değişmemektedir ve otomatik olarak 1500 psi'ye ayarlanmıştır. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda, basıncın ekstraksiyon verimi üzerine çok az düzeyde etkisinin olduğu, sistemde yüksek basıncın kullanılmasının asıl amacının çözgeni sıvı fazda tutabilmesi olduğu belirtilmektedir. Ekstraksiyonu etkileyen değişkenler arasında ekstraksiyon çözgeni ve sıcaklık parametreleri ASE

sistemi üzerinde büyük etkiye sahiptir (Carabias-Martínez vd 2005). Bu yüzden bu çalışmada öncelikle bu parametrelerin ekstraksiyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir.

4.3.1. Ekstraksiyonda kullanılan çözgenin belirlenmesi

Hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonu, yüksek sıcaklık ve basınç altındaki sıvı çözgenin kullanılmasıyla analitlerin katı matriksten hızlı ve verimli bir şekilde ekstraksiyonunu sağlayan bir örnek hazırlama tekniğidir. Bu ekstraksiyon tekniğinin optimizasyonu genel olarak uygun ekstraksiyon çözgeninin seçimi ile başlamaktadır. Kullanılacak çözgenin ilgili analitlerin çözünerek matriksten ayrılmasını sağlarken diğer matriks bileşiklerinin ekstraksiyonunu en aza indirmesi gerekmektedir. Bu yüzden, çözgenin polaritesi hedef analitin polaritesine yakın olmalıdır. Polar olmayan ve lipofilik bileşikler için genel olarak hegzan ve pentan gibi polar olmayan ve su ile karışmayan çözgenler kullanılırken; polar yapıda olan asetonitril, metanol ve su, polar ve hidrofilik özellikteki bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır (Carabias-Martínez vd 2005). Ayrıca çözgen seçiminde ekstraksiyondan sonra analiz için kullanılacak tekniğin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. LC sistemlerde hareketli faz olarak kullanılan asetonitril ve metanolün ekstraksiyonda kullanılması ekstraktların doğrudan cihaza enjeksiyonuna olanak sağlarken, diğer çözgenlerin kullanılması durumunda evaporasyon gibi ek işlemlerin yapılması gerekmektedir (Luthria vd 2004).

Bu çalışmada, sülfonamid grubu antibiyotiklerin polar yapısından dolayı çözgen olarak asetonitril, metanol ve su kullanılmıştır. Ekstraksiyon işleminde öncelikle su ve suyun diğer iki çözgen ile belirli oranlarda karışımı denenmiştir. ASE sistemi uygulanarak Gentili vd (2004) tarafından et ve bebek gıdalarında 160 °C’de su ve Kantiani vd (2010) tarafından hayvan yemlerinde 55 °C’de metanol:su (20:80) karışımı kullanılarak sülfonamid grubu antibiyotiklerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu iki çalışmanın aksine, bu çalışmada bebek gıdalarının toz yapıda olmasından dolayı hücre içerisindeki örneğin yüksek sıcaklıkta suyun etkisiyle viskoz bir yapı oluşturduğu ve basınç yardımıyla toplama kabına aktarılırken selüloz filtreyi tıkadığı için sistemin hata verdiği tespit edilmiştir. Bu yüzden denemelere asetonitril ve metanol ile devam edilmiştir. Bu çözgenler hem tek olarak hem de belirli oranlarda birbiriyle karıştırılarak kullanılmıştır. Çözgen bileşiminin ve karışım oranlarının ekstraksiyon verimi üzerine etkisi analitlerin cihazda vermiş olduğu sinyal seviyesi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.15’de belirtilmiştir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, analitlerin ekstraksiyonunda asetonitrilin tek başına kullanılmasının en düşük geri kazanım değerlerini verdiği tespit edilmiştir. Asetonitrilin belirtilen oranlarda metanol ile karıştırılmasının analitlerin geri kazanımını artırdığı ancak analitlerin çoğunda sinyal seviyesini istatistiki olarak etkilemediği belirlenmiştir. Ayrıca karışımdaki metanol oranının artması örneğin yüksek oranda çözünerek toplama kabına geçmesine ve ekstraktın daha bulanık olmasına neden olmuştur (Şekil 4.82). Ekstrakt içerisinde analitler dışında diğer bileşiklerin yoğun olarak bulunması hem ekstraksiyonun ikinci aşamasında (temizleme-clean up) hem de kromatografik analizde sorunlara neden olmaktadır. LC-MS analizinde hem kolon ömrü

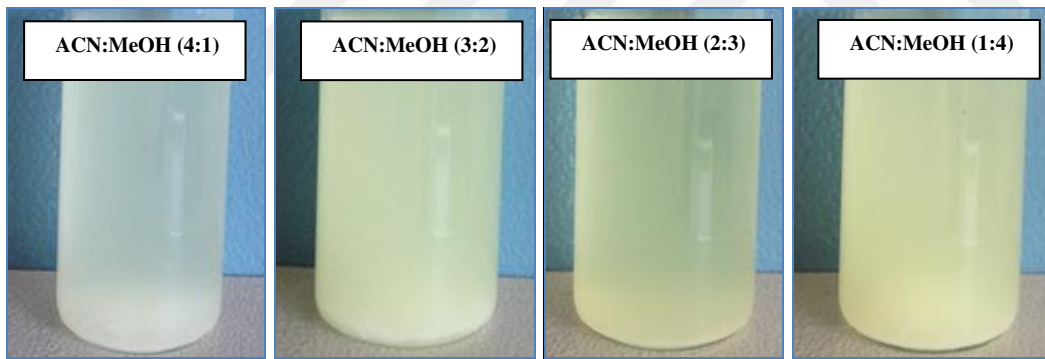
açısından hem de kütle analizörünün kirliliği açısından ekstraktın mümkün olduğunca temiz olması önemlidir.

Çizelge 4.15. Çözgen bileşiminin ve karışım oranlarının sinyal seviyesine etkisi

	ACN:MeOH (5:0)	ACN:MeOH (4:1)	ACN:MeOH (3:2)	ACN:MeOH (2:3)	ACN:MeOH (1:4)
n-asetilsülfadiazin	0,87 ^b ± 0,03	1,31 ^a ± 0,06	1,30 ^a ± 0,01	1,25 ^a ± 0,04	1,32 ^a ± 0,04
n-asetilsülfamerazin	0,81 ^b ± 0,07	1,28 ^a ± 0,10	1,29 ^a ± 0,08	1,17 ^a ± 0,10	1,28 ^a ± 0,08
n-asetilsülfametazin	0,94 ^c ± 0,08	1,53 ^a ± 0,01	1,48 ^{ab} ± 0,04	1,39 ^b ± 0,09	1,41 ^b ± 0,05
n-asetilsülfametoksazol	0,89 ^c ± 0,03	1,32 ^a ± 0,04	1,26 ^{ab} ± 0,04	1,20 ^b ± 0,09	1,25 ^{ab} ± 0,05
n-asetilsülfapiridin	0,81 ^c ± 0,06	1,23 ^a ± 0,01	1,14 ^{ab} ± 0,07	1,20 ^b ± 0,03	1,31 ^b ± 0,07
sülfakloropiridazin	0,62 ^c ± 0,09	0,98 ^a ± 0,08	0,91 ^{ab} ± 0,01	0,82 ^b ± 0,09	0,83 ^b ± 0,06
sülfadiazin	0,57 ^d ± 0,03	0,90 ^a ± 0,08	0,78 ^b ± 0,09	0,72 ^{bc} ± 0,05	0,69 ^c ± 0,01
sülfadimetoksin	0,87 ^b ± 0,07	1,22 ^a ± 0,06	1,18 ^a ± 0,04	1,15 ^a ± 0,09	1,13 ^a ± 0,03
sülfamerazin	0,66 ^b ± 0,05	0,99 ^a ± 0,09	0,96 ^a ± 0,10	0,91 ^a ± 0,06	0,94 ^a ± 0,03
sülfametazin	0,65 ^c ± 0,06	1,00 ^a ± 0,04	0,96 ^{ab} ± 0,05	0,90 ^b ± 0,04	0,90 ^b ± 0,03
sülfametoksazol	0,79 ^b ± 0,11	1,20 ^a ± 0,10	1,08 ^a ± 0,06	1,10 ^a ± 0,08	1,08 ^a ± 0,05
sülfametoksipiridazin	0,74 ^b ± 0,07	1,14 ^a ± 0,08	1,09 ^a ± 0,06	1,05 ^a ± 0,09	1,07 ^a ± 0,04
sülfamonometoksin	0,76 ^b ± 0,08	1,19 ^a ± 0,08	1,14 ^a ± 0,06	1,08 ^a ± 0,12	1,12 ^a ± 0,04
sülfamoksol	0,62 ^c ± 0,04	0,95 ^a ± 0,08	0,90 ^{ab} ± 0,08	0,85 ^b ± 0,02	0,85 ^b ± 0,02
sülfapiridin	0,61 ^b ± 0,06	0,90 ^a ± 0,03	0,89 ^a ± 0,01	0,88 ^a ± 0,04	0,86 ^a ± 0,03
sülfakinoksalin	0,83 ^b ± 0,04	1,19 ^a ± 0,06	1,20 ^a ± 0,06	1,14 ^a ± 0,08	1,15 ^a ± 0,01
sülfatiazol	0,66 ^b ± 0,05	1,00 ^a ± 0,06	0,96 ^a ± 0,10	0,93 ^a ± 0,13	0,96 ^a ± 0,09

*Değerler ortalama (E5) ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir



Şekil 4.82. Ekstraksiyonda asetonitril ve metanol karışımlarının kullanılması sonucunda elde edilen ekstraktların görünüşleri

4.3.2. Ekstraksiyonda kullanılan çözgenin asit konsantrasyonunun belirlenmesi

Kuvvetli asitlerin (hidroklorik, nitrik, sülfürik) örneğin konulduğu hücreye ve sistemde çözgenin geçtiği hatlara zarar vermesinden dolayı bu asitler hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonunda kullanılmamaktadır. Ekstraksiyon işleminde asidik koşulların gerekli olması durumunda asetik, fosforik vd. gibi zayıf asitlerin düşük konsantrasyonları (%1-5) kullanılabilir (Luthria vd 2004). Bu çalışmada, %0-3 konsantrasyonunda asetik asit içeren çözgenin ekstraksiyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.16'da belirtilmiştir. Genel olarak %1 asit konsantrasyonu ile yapılan ekstraksiyonlarda analitlerin sinyal seviyesi en yüksek olmakla birlikte çoğu analit açısından ortalamalar arasında istatistiki bir fark

gözlenmemiştir. Çalışmaya %1 asetik asit konsantrasyonunda çözgen kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4.16. Asit konsantrasyonunun sinyal seviyesine etkisi

	%0	%1	%2	%3
n-asetilsülfadiazin	1,26 ± 0,05	1,32 ± 0,08	1,30 ± 0,05	1,26 ± 0,06
n-asetilsülfamerazin	1,20 ^{bc} ± 0,04	1,29 ^{ab} ± 0,08	1,30 ^a ± 0,07	1,18 ^c ± 0,06
n-asetilsülfametazin	1,39 ^b ± 0,01	1,51 ^a ± 0,03	1,52 ^a ± 0,12	1,40 ^b ± 0,05
n-asetilsülfametoksazol	1,25 ^b ± 0,01	1,33 ^a ± 0,02	1,31 ^{ab} ± 0,06	1,25 ^b ± 0,06
n-asetilsülfapiridin	1,18 ^b ± 0,02	1,31 ^a ± 0,08	1,34 ^a ± 0,06	1,19 ^b ± 0,08
sülfakloropiridazin	0,86 ± 0,03	0,94 ± 0,13	0,89 ± 0,09	0,86 ± 0,11
sülfadiazin	0,81 ± 0,03	0,88 ± 0,11	0,84 ± 0,09	0,82 ± 0,13
sülfadimetoksin	1,16 ± 0,08	1,17 ± 0,12	1,20 ± 0,08	1,16 ± 0,09
sülfamerazin	0,92 ± 0,02	0,99 ± 0,10	1,01 ± 0,12	0,91 ± 0,07
sülfametazin	0,94 ± 0,01	0,99 ± 0,06	0,97 ± 0,09	0,93 ± 0,07
sülfametoksazol	1,11 ± 0,03	1,20 ± 0,10	1,21 ± 0,14	1,09 ± 0,10
sülfametoksipiridazin	1,01 ± 0,01	1,03 ± 0,09	1,04 ± 0,09	0,99 ± 0,11
sülfamonometoksin	1,05 ± 0,01	1,14 ± 0,08	1,10 ± 0,11	1,07 ± 0,13
sülfamoksol	0,90 ± 0,01	1,00 ± 0,21	0,91 ± 0,09	0,88 ± 0,10
sülfapiridin	0,88 ± 0,02	0,90 ± 0,03	0,89 ± 0,10	0,84 ± 0,10
sülfakinoksalin	1,18 ± 0,02	1,19 ± 0,06	1,25 ± 0,11	1,14 ± 0,12
sülfatiazol	0,96 ± 0,02	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,13	0,96 ± 0,16

*Değerler ortalama (E5) ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.3.3. Ekstraksiyon sıcaklığının belirlenmesi

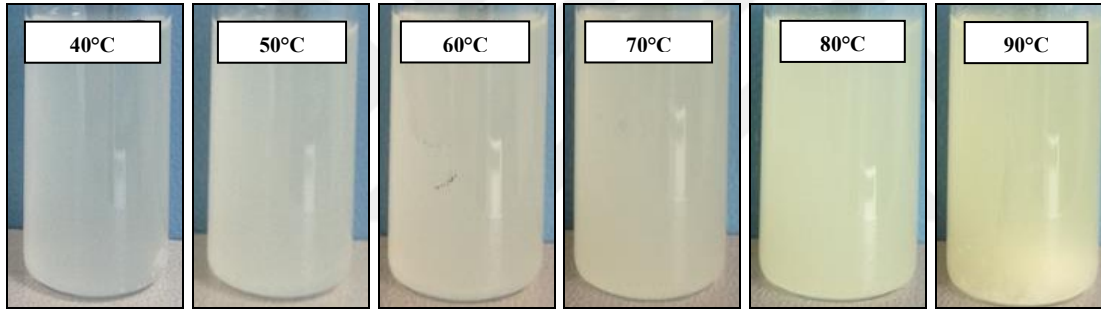
Sıcaklık hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonunda kritik bir parametredir. Yüksek sıcaklık çözgenin viskozitesini düşürerek matriksin içerisine daha iyi penetrasyonunu sağlamaktadır. Ancak yüksek sıcaklık ısıya duyarlı bileşiklerin parçalanmasına neden olabilmekte ve ayrıca hedef analit dışında matriksten diğer bileşiklerin de ekstrakta geçişini artırarak analiz yönteminin seçiciliğini ve hassasiyetini baskılayabilmektedir (García-Galán vd 2013). Bu çalışmada, ekstraksiyon sıcaklığı olarak 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C seçilmiştir. Çizelge 4.17’de görüldüğü üzere, sıcaklığın ekstraksiyon verimi üzerine etkisi vardır. Sıcaklık arttıkça analitlerin sinyal seviyesi artmaktadır. Ancak 70, 80 ve 90 °C sıcaklıkları arasında istatistiki olarak bir fark gözlenmemiştir. Şekil 4.83’de de görüldüğü üzere sıcaklık arttıkça ekstraktın bulanıklığı (özellikle 90 °C’de) bir başka deyişle ekstrakta geçen diğer matriks bileşikler artmıştır. Bu yüzden ekstraksiyon sıcaklığı olarak 70 °C seçilerek diğer aşamaya geçilmiştir. Yu vd (2011) tarafından et ürünlerinde sülfonamid grubu antibiyotiklerin analizi ile ilgili yapılan bir çalışmada da ekstraksiyon ASE sisteminde 70 °C’de gerçekleştirilmiştir. Bu sıcaklığın üzerinde analitlerin geri kazanımının düştüğü ve matriksin parçalanarak ekstrakta dağıldığı belirtilmiştir.

Çizelge 4.17. Ekstraksiyon sıcaklığının sinyal seviyesine etkisi

	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
n-asetilsülfadiazin	1,06 ^c ± 0,01	1,14 ^d ± 0,05	1,26 ^c ± 0,03	1,30 ^{bc} ± 0,04	1,37 ^a ± 0,01	1,33 ^{ab} ± 0,07
n-asetilsülfamerazin	0,96 ^c ± 0,09	1,05 ^c ± 0,09	1,17 ^b ± 0,05	1,23 ^{ab} ± 0,05	1,30 ^a ± 0,11	1,29 ^a ± 0,07
n-asetilsülfametazin	1,18 ^b ± 0,02	1,22 ^b ± 0,09	1,40 ^a ± 0,06	1,44 ^a ± 0,07	1,47 ^a ± 0,08	1,43 ^a ± 0,08
n-asetilsülfametoksazol	1,06 ^c ± 0,07	1,15 ^{bc} ± 0,11	1,23 ^{ab} ± 0,08	1,28 ^a ± 0,02	1,32 ^a ± 0,08	1,33 ^a ± 0,08
n-asetilsülfapiridin	1,01 ^c ± 0,10	1,08 ^{bc} ± 0,16	1,20 ^{ab} ± 0,11	1,24 ^a ± 0,03	1,28 ^a ± 0,07	1,29 ^a ± 0,14
sülfakloropiridazin	0,70 ^b ± 0,09	0,77 ^{ab} ± 0,15	0,83 ^{ab} ± 0,08	0,90 ^a ± 0,07	0,85 ^{ab} ± 0,09	0,87 ^a ± 0,14
sülfadiazin	0,67 ^b ± 0,07	0,74 ^{ab} ± 0,15	0,84 ^a ± 0,13	0,85 ^a ± 0,08	0,82 ^{ab} ± 0,14	0,83 ^{ab} ± 0,11
sülfadimetoksin	1,03 ± 0,09	1,03 ± 0,11	1,16 ± 0,12	1,13 ± 0,09	1,17 ± 0,06	1,15 ± 0,12
sülfamerazin	0,76 ^b ± 0,09	0,86 ^{ab} ± 0,17	0,87 ^{ab} ± 0,09	0,94 ^a ± 0,05	0,96 ^a ± 0,12	0,98 ^a ± 0,13
sülfametazin	0,77 ^b ± 0,07	0,86 ^{ab} ± 0,11	0,94 ^a ± 0,07	0,94 ^a ± 0,01	0,98 ^a ± 0,12	1,00 ^a ± 0,14
sülfametoksazol	0,94 ^b ± 0,09	1,01 ^{ab} ± 0,12	1,08 ^{ab} ± 0,14	1,16 ^a ± 0,08	1,13 ^a ± 0,15	1,17 ^a ± 0,17
sülfametoksipiridazin	0,81 ^b ± 0,05	0,92 ^{ab} ± 0,14	0,99 ^a ± 0,09	1,03 ^a ± 0,11	1,07 ^a ± 0,14	1,07 ^a ± 0,18
sülfamonometoksin	0,88 ^b ± 0,09	0,95 ^{ab} ± 0,17	1,03 ^{ab} ± 0,08	1,08 ^a ± 0,09	1,08 ^a ± 0,13	1,07 ^a ± 0,16
sülfamoksol	0,73 ^b ± 0,07	0,80 ^{ab} ± 0,16	0,87 ^{ab} ± 0,11	0,88 ^{ab} ± 0,06	0,89 ^{ab} ± 0,11	0,94 ^a ± 0,18
sülfapiridin	0,71 ^b ± 0,08	0,81 ^{ab} ± 0,16	0,83 ^{ab} ± 0,08	0,90 ^a ± 0,07	0,91 ^a ± 0,14	0,90 ^a ± 0,16
sülfakinoksalin	0,94 ^b ± 0,11	1,04 ^{ab} ± 0,19	1,13 ^{ab} ± 0,15	1,15 ^a ± 0,05	1,20 ^a ± 0,18	1,20 ^a ± 0,14
sülfatiazol	0,77 ^b ± 0,12	0,90 ^{ab} ± 0,15	0,91 ^{ab} ± 0,07	1,00 ^a ± 0,07	0,97 ^a ± 0,13	0,98 ^a ± 0,21

*Değerler ortalama (E5)± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir



Şekil 4.83. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen ekstraktların görünüşleri

4.3.4. Statik süresinin, yıkama hacminin ve döngü sayısının belirlenmesi

Çizelge 4.18-20’de belirtilen statik süresi, yıkama hacmi ve döngü sayısında elde edilen analitlerin sinyal seviyesi ortalamaları verilmiştir. Ayrıca bu parametrelerin analitlerin ekstraksiyon verimi üzerine etkisi istatistiki olarak değerlendirilip Çizelge 4.21’de belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ideal ekstraksiyon koşulları statik süresi 5 dk, yıkama hacmi %60 ve döngü sayısı 3 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda yapılan ekstraksiyon sonucunda 18 ml ekstrakt elde edilmiştir. Statik süresi arttıkça analitlerin sinyal seviyesi ortalamaları artmasına rağmen çoğu analitin ortalamaları arasında istatistiki olarak fark çıkmamıştır. Statik süresinin kısa olması hem analiz süresinin kısalması hem de uzun süre çözgen ile temas eden matriksten diğer bileşenlerin de ayrılmasını azaltması ve ekstraktın daha berrak olması açısından önemlidir. Aynı şekilde döngü sayısının fazla olması analitlerin ekstraksiyon çözgenine difüzyonunun daha iyi olmasını sağlamaktadır. Literatürde örnek içerisindeki analitlerin ilk ve ikinci döngüde yüksek oranda matriksten alınabildiği, üçüncü döngünün ise ekstraksiyonda güvenilirliği artırmak amacıyla ilave edildiği belirtilmiştir (García-Galán

vd 2013). Bu çalışmada da, analitlerin genel olarak ilk döngüde büyük oranda ekstrakta geçtiği ve döngü sayısı arttıkça elde edilen sinyal seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Analitlerin çoğunda ikinci ve üçüncü döngü açısından sinyal seviyesi ortalamaları arasında istatistiki olarak bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.18. Analitlerin sinyal seviyelerinin statik süresine (5 dk), yıkama hacmine ve döngü sayısına bağlı olarak değişimi

Statik süresi (dk)	5						
Yıkama hacmi (%)	60			80			100
Döngü sayısı	1	2	3	1	2	3	1
n-asetilsülfadiazin	1,32 ± 0,074	1,35 ± 0,01	1,40 ± 0,05	1,31 ± 0,07	1,40 ± 0,01	1,42 ± 0,02	1,14 ± 0,18
n-asetilsülfamerazin	1,29 ± 0,07	1,32 ± 0,07	1,34 ± 0,15	1,27 ± 0,04	1,35 ± 0,07	1,35 ± 0,11	1,07 ± 0,13
n-asetilsülfametazin	1,46 ± 0,01	1,54 ± 0,08	1,57 ± 0,09	1,46 ± 0,03	1,48 ± 0,02	1,51 ± 0,02	1,27 ± 0,13
n-asetilsülfametoksazol	1,29 ± 0,05	1,35 ± 0,01	1,37 ± 0,05	1,31 ± 0,02	1,34 ± 0,01	1,37 ± 0,13	1,13 ± 0,14
n-asetilsülfapiridin	1,27 ± 0,01	1,34 ± 0,09	1,33 ± 0,16	1,27 ± 0,02	1,30 ± 0,02	1,30 ± 0,11	1,12 ± 0,13
sülfakloropiridazin	0,86 ± 0,08	0,91 ± 0,10	0,91 ± 0,11	0,89 ± 0,06	0,91 ± 0,09	0,94 ± 0,08	0,74 ± 0,09
sülfadiazin	0,85 ± 0,11	0,88 ± 0,08	0,89 ± 0,07	0,82 ± 0,04	0,88 ± 0,04	0,90 ± 0,05	0,72 ± 0,10
sülfadimetoksin	1,21 ± 0,01	1,26 ± 0,01	1,28 ± 0,12	1,18 ± 0,02	1,21 ± 0,06	1,30 ± 0,04	1,04 ± 0,17
sülfamerazin	0,95 ± 0,07	0,99 ± 0,11	1,01 ± 0,13	0,95 ± 0,04	0,98 ± 0,08	1,00 ± 0,04	0,80 ± 0,13
sülfametazin	0,98 ± 0,06	0,99 ± 0,03	0,99 ± 0,09	0,94 ± 0,05	1,02 ± 0,05	1,02 ± 0,04	0,85 ± 0,08
sülfametoksazol	1,11 ± 0,02	1,21 ± 0,08	1,24 ± 0,13	1,13 ± 0,04	1,18 ± 0,08	1,20 ± 0,08	0,99 ± 0,18
sülfametoksipiridazin	1,02 ± 0,15	1,08 ± 0,14	1,12 ± 0,20	1,06 ± 0,08	1,11 ± 0,12	1,13 ± 0,15	0,88 ± 0,08
sülfamonometoksin	1,10 ± 0,03	1,17 ± 0,01	1,19 ± 0,10	1,11 ± 0,01	1,16 ± 0,05	1,19 ± 0,06	0,92 ± 0,13
sülfamoksol	0,89 ± 0,02	0,93 ± 0,03	0,94 ± 0,10	0,88 ± 0,02	0,95 ± 0,04	0,97 ± 0,07	0,79 ± 0,13
sülfapiridin	0,87 ± 0,09	0,90 ± 0,08	0,91 ± 0,15	0,87 ± 0,07	0,89 ± 0,11	0,93 ± 0,10	0,74 ± 0,12
sülfakinoksalin	1,20 ± 0,11	1,24 ± 0,07	1,23 ± 0,12	1,18 ± 0,01	1,24 ± 0,09	1,26 ± 0,09	0,99 ± 0,18
sülfatiazol	0,92 ± 0,07	0,98 ± 0,11	0,97 ± 0,16	0,96 ± 0,04	0,99 ± 0,12	1,03 ± 0,10	0,83 ± 0,12

*Değerler ortalama (E5) ± standart sapma olarak belirtilmiştir

Çizelge 4.19. Analitlerin sinyal seviyelerinin statik süresine (10 dk), yıkama hacmine ve döngü sayısına bağlı olarak değişimi

Statik süresi (dk)	10						
Yıkama hacmi (%)	60			80			100
Döngü sayısı	1	2	3	1	2	3	1
n-asetilsülfadiazin	1,32 ± 0,08	1,37 ± 0,05	1,42 ± 0,08	1,31 ± 0,10	1,33 ± 0,01	1,34 ± 0,05	1,25 ± 0,03
n-asetilsülfamerazin	1,26 ± 0,19	1,32 ± 0,11	1,34 ± 0,18	1,24 ± 0,16	1,22 ± 0,15	1,26 ± 0,07	1,22 ± 0,10
n-asetilsülfametazin	1,51 ± 0,16	1,53 ± 0,18	1,51 ± 0,16	1,59 ± 0,16	1,59 ± 0,07	1,50 ± 0,15	1,42 ± 0,05
n-asetilsülfametoksazol	1,31 ± 0,08	1,36 ± 0,09	1,36 ± 0,15	1,29 ± 0,11	1,27 ± 0,11	1,24 ± 0,10	1,20 ± 0,12
n-asetilsülfapiridin	1,32 ± 0,14	1,34 ± 0,14	1,40 ± 0,13	1,30 ± 0,20	1,27 ± 0,16	1,32 ± 0,15	1,19 ± 0,10
sülfakloropiridazin	0,85 ± 0,16	0,90 ± 0,15	0,90 ± 0,13	0,84 ± 0,11	0,85 ± 0,10	0,88 ± 0,15	0,83 ± 0,10
sülfadiazin	0,79 ± 0,15	0,84 ± 0,12	0,81 ± 0,16	0,76 ± 0,17	0,79 ± 0,16	0,79 ± 0,10	0,79 ± 0,06
sülfadimetoksin	1,27 ± 0,17	1,28 ± 0,07	1,21 ± 0,09	1,23 ± 0,13	1,20 ± 0,11	1,23 ± 0,01	1,19 ± 0,05
sülfamerazin	0,89 ± 0,13	0,95 ± 0,18	0,97 ± 0,16	0,88 ± 0,18	0,88 ± 0,21	0,95 ± 0,14	0,88 ± 0,11
sülfametazin	0,95 ± 0,14	0,96 ± 0,13	1,04 ± 0,13	0,93 ± 0,19	0,92 ± 0,20	0,98 ± 0,18	0,90 ± 0,17
sülfametoksazol	1,14 ± 0,22	1,12 ± 0,18	1,16 ± 0,23	1,08 ± 0,28	1,09 ± 0,27	1,09 ± 0,15	1,06 ± 0,14
sülfametoksipiridazin	1,05 ± 0,27	1,08 ± 0,19	1,12 ± 0,21	1,01 ± 0,25	0,99 ± 0,23	1,06 ± 0,21	0,99 ± 0,15
sülfamonometoksin	1,09 ± 0,21	1,12 ± 0,14	1,19 ± 0,11	1,04 ± 0,20	1,03 ± 0,15	1,10 ± 0,17	1,01 ± 0,13
sülfamoksol	0,90 ± 0,17	0,90 ± 0,08	0,95 ± 0,17	0,84 ± 0,15	0,83 ± 0,18	0,87 ± 0,11	0,87 ± 0,12
sülfapiridin	0,82 ± 0,14	0,85 ± 0,18	0,90 ± 0,14	0,79 ± 0,15	0,83 ± 0,17	0,83 ± 0,15	0,80 ± 0,10
sülfakinoksalin	1,16 ± 0,18	1,18 ± 0,18	1,25 ± 0,24	1,09 ± 0,19	1,10 ± 0,20	1,16 ± 0,16	1,09 ± 0,12
sülfatiazol	0,90 ± 0,20	0,90 ± 0,16	0,94 ± 0,22	0,86 ± 0,16	0,86 ± 0,19	0,96 ± 0,16	0,85 ± 0,14

*Değerler ortalama (E5) ± standart sapma olarak belirtilmiştir

Çizelge 4.20. Analitlerin sinyal seviyelerinin statik süresine (15 dk), yıkama hacmine ve döngü sayısına bağlı olarak değişimi

Statik süresi (dk)	15						
Yıkama hacmi (%)	60			80			100
Döngü sayısı	1	2	3	1	2	3	1
n-asetilsülfadiazin	1,32 ± 0,01	1,39 ± 0,02	1,37 ± 0,03	1,34 ± 0,13	1,44 ± 0,04	1,37 ± 0,06	1,35 ± 0,01
n-asetilsülfamerazin	1,24 ± 0,08	1,34 ± 0,09	1,35 ± 0,14	1,35 ± 0,16	1,38 ± 0,06	1,32 ± 0,14	1,31 ± 0,14
n-asetilsülfametazin	1,52 ± 0,12	1,58 ± 0,10	1,58 ± 0,07	1,58 ± 0,12	1,54 ± 0,02	1,56 ± 0,10	1,55 ± 0,12
n-asetilsülfametoksazol	1,32 ± 0,08	1,36 ± 0,05	1,37 ± 0,10	1,34 ± 0,18	1,39 ± 0,10	1,38 ± 0,16	1,33 ± 0,10
n-asetilsülfapiridin	1,25 ± 0,17	1,37 ± 0,10	1,37 ± 0,21	1,32 ± 0,21	1,34 ± 0,12	1,38 ± 0,14	1,32 ± 0,23
sülfakloropiridazin	0,84 ± 0,10	0,91 ± 0,04	0,95 ± 0,13	0,90 ± 0,13	0,87 ± 0,07	0,88 ± 0,10	0,90 ± 0,11
sülfadiazin	0,80 ± 0,07	0,91 ± 0,08	0,93 ± 0,12	0,84 ± 0,13	0,90 ± 0,07	0,84 ± 0,06	0,86 ± 0,07
sülfadimetoksin	1,21 ± 0,04	1,31 ± 0,11	1,25 ± 0,11	1,29 ± 0,16	1,22 ± 0,05	1,30 ± 0,03	1,26 ± 0,14
sülfamerazin	0,93 ± 0,13	1,01 ± 0,07	1,04 ± 0,08	1,00 ± 0,17	1,02 ± 0,06	0,97 ± 0,12	0,97 ± 0,14
sülfametazin	0,96 ± 0,09	1,03 ± 0,03	1,05 ± 0,13	0,99 ± 0,14	1,01 ± 0,01	1,00 ± 0,10	1,00 ± 0,14
sülfametoksazol	1,17 ± 0,05	1,21 ± 0,07	1,22 ± 0,10	1,21 ± 0,11	1,19 ± 0,06	1,18 ± 0,17	1,18 ± 0,15
sülfametoksipiridazin	0,97 ± 0,16	1,07 ± 0,18	1,10 ± 0,19	1,02 ± 0,27	0,99 ± 0,23	1,05 ± 0,21	1,07 ± 0,25
sülfamonometoksin	1,04 ± 0,04	1,17 ± 0,03	1,19 ± 0,06	1,11 ± 0,14	1,16 ± 0,01	1,14 ± 0,09	1,12 ± 0,17
sülfamoksol	0,88 ± 0,33	0,93 ± 0,01	0,97 ± 0,07	0,94 ± 0,14	0,95 ± 0,08	0,93 ± 0,07	0,92 ± 0,13
sülfapiridin	0,83 ± 0,05	0,93 ± 0,03	0,96 ± 0,10	0,89 ± 0,11	0,94 ± 0,06	0,93 ± 0,06	0,88 ± 0,12
sülfakinoksalin	1,15 ± 0,08	1,23 ± 0,02	1,25 ± 0,11	1,18 ± 0,18	1,22 ± 0,04	1,15 ± 0,04	1,20 ± 0,16
sülfatiazol	0,86 ± 0,01	0,94 ± 0,06	0,97 ± 0,05	0,90 ± 0,14	0,94 ± 0,03	0,93 ± 0,12	0,92 ± 0,11

*Değerler ortalama (E5) ± standart sapma olarak belirtilmiştir

Çizelge 4.21. Statik süresinin, yıkama hacminin ve döngü sayısının sinyal seviyesine etkisi

N-asetilsülfadiazin			
Statik süresi	5 dk	10 dk	15 dk
	1,333 ± 0,111	1,333 ± 0,072	1,365 ± 0,062
Yıkama hacmi	%60	%80	%100
	1,360 ^a ± 0,058	1,359 ^a ± 0,071	1,245 ^b ± 0,123
Döngü sayısı	1	2	3
	1,293 ^b ± 0,093	1,377 ^a ± 0,046	1,386 ^a ± 0,058
N-asetilsülfamerazin			
Statik süresi	5 dk	10 dk	15 dk
	1,283 ^{ab} ± 0,123	1,264 ^b ± 0,117	1,325 ^a ± 0,103
Yıkama hacmi	%60	%80	%100
	1,309 ^a ± 0,103	1,303 ^a ± 0,108	1,197 ^b ± 0,142
Döngü sayısı	1	2	3
	1,249 ^b ± 0,123	1,319 ^a ± 0,092	1,325 ^a ± 0,112
N-asetilsülfametazin			
Statik süresi	5 dk	10 dk	15 dk
	1,466 ^b ± 0,111	1,520 ^a ± 0,126	1,556 ^a ± 0,081
Yıkama hacmi	%60	%80	%100
	1,531 ^a ± 0,102	1,532 ^a ± 0,090	1,409 ^b ± 0,151
Döngü sayısı	1	2	3
	1,482 ^b ± 0,131	1,542 ^a ± 0,091	1,534 ^{ab} ± 0,094

N-asetilsülfametoksazol			
Statik süresi	5 dk 1,308 ^{ab} ± 0,105	10 dk 1,288 ^b ± 0,101	15 dk 1,353 ^a ± 0,101
Yıkama hacmi	%60 1,342 ^a ± 0,078	%80 1,324 ^a ± 0,101	%100 1,218 ^b ± 0,132
Döngü sayısı	1 1,277 ^b ± 0,106	2 1,344 ^a ± 0,074	3 1,348 ^a ± 0,113
N-asetilsülfapiridin			
Statik süresi	5 dk 1,275 ± 0,101	10 dk 1,303 ± 0,124	15 dk 1,334 ± 0,139
Yıkama hacmi	%60 1,330 ^a ± 0,116	%80 1,309 ^a ± 0,108	%100 1,210 ^b ± 0,150
Döngü sayısı	1 1,261 ^b ± 0,130	2 1,325 ^{ab} ± 0,095	3 1,348 ^a ± 0,122
Sülfakloropiridazin			
Statik süresi	5 dk 0,879 ± 0,094	10 dk 0,865 ± 0,101	15 dk 0,893 ± 0,082
Yıkama hacmi	%60 0,892 ^a ± 0,093	%80 0,885 ^a ± 0,082	%100 0,824 ^b ± 0,105
Döngü sayısı	1 0,852 ^b ± 0,095	2 0,890 ^{ab} ± 0,079	3 0,910 ^a ± 0,093
Sülfadiazin			
Statik süresi	5 dk 0,849 ^a ± 0,085	10 dk 0,795 ^b ± 0,104	15 dk 0,869 ^a ± 0,081
Yıkama hacmi	%60 0,856 ^a ± 0,097	%80 0,836 ^{ab} ± 0,092	%100 0,789 ^b ± 0,085
Döngü sayısı	1 0,805 ^b ± 0,091	2 0,866 ^a ± 0,088	3 0,860 ^a ± 0,095
Sülfadimetoksin			
Statik süresi	5 dk 1,211 ^b ± 0,107	10 dk 1,229 ^{ab} ± 0,086	15 dk 1,260 ^a ± 0,086
Yıkama hacmi	%60 1,253 ^a ± 0,081	%80 1,238 ^a ± 0,081	%100 1,163 ^b ± 0,138
Döngü sayısı	1 1,207 ^b ± 0,112	2 1,246 ^{ab} ± 0,076	3 1,261 ^a ± 0,075

Sülfamerazin			
Statik süresi	5 dk 0,954 ^{ab} ± 0,101	10 dk 0,916 ^b ± 0,127	15 dk 0,990 ^a ± 0,099
Yıkama hacmi	%60 0,972 ^a ± 0,105	%80 0,958 ^a ± 0,110	%100 0,882 ^b ± 0,125
Döngü sayısı	1 0,917 ^b ± 0,115	2 0,969 ^{ab} ± 0,112	3 0,991 ^a ± 0,096
Sülfametazin			
Statik süresi	5 dk 0,971 ± 0,074	10 dk 0,952 ± 0,128	15 dk 1,005 ± 0,083
Yıkama hacmi	%60 0,993 ^a ± 0,082	%80 0,978 ^{ab} ± 0,101	%100 0,918 ^b ± 0,125
Döngü sayısı	1 0,946 ^b ± 0,105	2 0,986 ^{ab} ± 0,086	3 1,011 ^a ± 0,092
Sülfametoksazol			
Statik süresi	5 dk 1,149 ^{ab} ± 0,120	10 dk 1,105 ^b ± 0,165	15 dk 1,193 ^a ± 0,091
Yıkama hacmi	%60 1,174 ^a ± 0,122	%80 1,148 ^{ab} ± 0,133	%100 1,074 ^b ± 0,144
Döngü sayısı	1 1,116 ± 0,134	2 1,165 ± 0,127	3 1,182 ± 0,130
Sülfametoksipiridazin			
Statik süresi	5 dk 1,058 ± 0,132	10 dk 1,042 ± 0,167	15 dk 1,038 ± 0,165
Yıkama hacmi	%60 1,066 ± 0,147	%80 1,048 ± 0,158	%100 0,980 ± 0,154
Döngü sayısı	1 1,007 ± 0,154	2 1,053 ± 0,146	3 1,097 ± 0,151
Sülfamonometoksin			
Statik süresi	5 dk 1,118 ± 0,110	10 dk 1,081 ± 0,132	15 dk 1,132 ± 0,089
Yıkama hacmi	%60 1,138 ^a ± 0,094	%80 1,115 ^a ± 0,106	%100 1,015 ^b ± 0,106
Döngü sayısı	1 1,059 ^b ± 0,120	2 1,133 ^a ± 0,085	3 1,163 ^a ± 0,094

Sülfamoksol			
Statik süresi	5 dk 0,907 ± 0,082	10 dk 0,884 ± 0,114	15 dk 0,931 ± 0,072
Yıkama hacmi	%60 0,924 ^a ± 0,079	%80 0,907 ^{ab} ± 0,094	%100 0,860 ^b ± 0,112
Döngü sayısı	1 0,879 ^b ± 0,098	2 0,918 ^{ab} ± 0,079	3 0,939 ^a ± 0,086
Sülfapiridin			
Statik süresi	5 dk 0,872 ^{ab} ± 0,099	10 dk 0,831 ^b ± 0,115	15 dk 0,908 ^a ± 0,075
Yıkama hacmi	%60 0,884 ^a ± 0,098	%80 0,877 ^a ± 0,099	%100 0,806 ^b ± 0,105
Döngü sayısı	1 0,831 ^b ± 0,094	2 0,889 ^a ± 0,097	3 0,910 ^a ± 0,100
Sülfakinoksalin			
Statik süresi	5 dk 1,188 ± 0,120	10 dk 1,146 ± 0,150	15 dk 1,197 ± 0,088
Yıkama hacmi	%60 1,208 ^a ± 0,111	%80 1,174 ^a ± 0,113	%100 1,094 ^b ± 0,151
Döngü sayısı	1 1,137 ^b ± 0,129	2 1,199 ^{ab} ± 0,103	3 1,215 ^a ± 0,117
Sülfatiazol			
Statik süresi	5 dk 0,954 ± 0,099	10 dk 0,896 ± 0,139	15 dk 0,923 ± 0,076
Yıkama hacmi	%60 0,932 ^{ab} ± 0,107	%80 0,937 ^a ± 0,113	%100 0,865 ^b ± 0,102
Döngü sayısı	1 0,889 ^b ± 0,100	2 0,934 ^{ab} ± 0,103	3 0,968 ^a ± 0,114

*Değerler ortalama (E5) ± standart sapma olarak belirtilmiştir

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı (p<0,05) ifade etmektedir

4.3.5. Temizleme aşaması

Ekstraksiyon aşamasından sonra ekstraktların doğrudan cihaza enjekte edilmesi hem cihazın LC kısmında kolonun tıkanmasına ve kullanım ömrünün azalmasına hem de özellikle MS kısmındaki parçaların kirlenmesine ve tıkanmasına yol açarak analitlerin seçiciliğinin azalmasına neden olmaktadır. Bu yüzden bu aşamadan sonra temizleme işleminin yapılması gerekmektedir. Et içeren kavanoz mamaları (yağ oranı %1,5-3,0) hariç, bebek gıdalarının bileşiminde %9-25 oranında yağ (100 g toz üründe) bulunduğu için örneklerin bu bileşikten mümkün olduğunca arındırılması önemlidir. Bunun için, Hoff vd (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, et ürünlerinde sülfonamid

grubu antibiyotiklerin ASE sistemi ile ekstraksiyonundan önce örnekler hegzan ile muamele edilmiştir. Örneklerdeki yağın 4 ekstraksiyon döngüsünden sonra %16'sının (kuru maddede) uzaklaştırıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada da öncelikle bebek gıdalarından yağın hegzan ile ekstraksiyonu denenmiştir. Ancak bu işlemden sonra hücre içerisinde lapa olan örneklerin asıl ekstraksiyon işlemi gerçekleşmemiştir. Bu yüzden ekstraktlar, ekstraksiyon aşamasından sonra temizleme işlemine tabi tutulmuştur ve proteinlerin ve yağların düşük sıcaklıklarda çözünürlüklerinin azalarak çökmelerinden dolayı -18 °C'de bir gece bekletilmiştir (Gentili vd 2004, Rodriguez vd 2010, Zhan vd 2013, Hoff vd 2015). Çöken bileşikler +4 °C'de 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek ekstrakttan ayrılmıştır. Bu işlemden sonra ekstraktlar 0,45 µm'lik naylon filtreden geçirilip cihaza enjekte edilmiştir.

4.4. Metot Validasyonu

Geliştirilen metotların geçerliliğini sağlamak amacıyla laboratuvar içi metot validasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, doğrusalılık ve ölçüm aralığı, seçicilik, tespit limit (LOD), tayin limiti (LOQ), doğruluk ve kesinlik parametreleri belirlenmiştir. Metot validasyonu için kullanılan ham verilerin tamamı Ek 2-7'de verilmiştir.

4.4.1. Doğrusallık ve ölçüm aralığı

Metot validasyonunda öncelikle analitlere ait kalibrasyon grafiğinin belirlenmesi gerekmektedir. Kalibrasyon grafikleri, analit konsantrasyonları ile bu konsantrasyonlarda analitlerin cihaz dedektöründe gösterdikleri yanıt arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bu ilişki korelasyon denklemi ile ifade edilmektedir ve denkleme ait korelasyon katsayısının karesinin (r^2) $\geq 0,999$ olması denklemin kabul edilebilir olduğunu belirtmektedir. Kalibrasyon grafikleri en düşük analit konsantrasyonundan başlanarak en az 6 nokta (kör dahil) ile çizilmelidir. Ölçüm aralığı, kalibrasyon grafiği elde edilirken kullanılan en düşük ve en yüksek konsantrasyonlar ile tanımlanmaktadır (Araujo 2009, Kay ve MacNeil 2012).

Kalibrasyon grafiği çizdirilirken belirlenen konsantrasyonlardaki standart çözeltiler uygun çözücü ile hazırlanmaktadır. Ancak, matriks numuneleri çözücü ile hazırlanan kalibrasyon grafikleri ile değerlendirildiğinde, matriksin içinde bulunan bileşenlerin analit sinyallerini etkilediği gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak, analitlerin miktarı doğru bir şekilde hesaplanamamaktadır. Bu durum matriks etkisi olarak bilinmektedir ve matriks kaynaklı girişim unsurlarının neden olduğu olumsuzluğu elimine etmek için matriks uyumlu kalibrasyon grafikleri oluşturulmaktadır (Lopes vd 2012).

Kalibrasyon grafikleri, analitik metodun kullanılacağı farklı bileşimdeki matrikslerin her biri için belirlenmelidir. Bu durum, matriks yapısındaki farklı girişim unsurlarının cihazda verdiği yanıtın farklı olmasından ve analitlerin ekstraksiyon (geri kazanım) düzeyinin matrikse bağlı olarak değişmesinden kaynaklanmaktadır (Anonymous 2014). Bu yüzden, bu çalışmada metot validasyonu için bebek gıdalarını temsil edebilecek ve sülfonamid grubu antibiyotikleri içermeyen 3 farklı matrikse sahip

numuneler seçilmiştir. Bu numuneler, bebek ve devam sütleri, ek gıdalar (meyveli, tahıllı, ballı, bisküvili, pirinçli) ve et ürünleri içeren kavanoz mamalarıdır.

Kalibrasyon grafiklerinin çiziminin matriks uyumlu yapılması miktar belirleme çalışmalarında doğru sonuçların elde edilmesi açısından önemlidir. Matriks etkisi, matriksten gelen girişim unsurlarından kaynaklanan ve ESI işlemi sırasında analitlerin iyonizasyonu üzerine iyon baskılama veya artırma şeklinde etkisi olan bir durumdur. Örnek ekstraksiyonu, ekstraktın temizlenmesi ve kromatografik işlemler LC-MS analizlerinde uygulanması zorunlu olan ve matriks etkisini azaltan uygulamalardır. Ancak hangi işlem uygulanırsa uygulansın matriks etkisini tamamen elimine etmek mümkün değildir. Bunun sonucunda, örnekte bulunan girişim unsurları analitle etkileşerek analitin dedektörde vermiş olduğu yanıtı değiştirmektedir veya kendileri dedektörde yanıt oluşturmaktadır. Bu yüzden, LC-MS’de miktar belirleme çalışmalarında analiz sonucunun doğruluğunu artırmak amacıyla matriks uyumlu kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi gerekmektedir (Kay ve MacNeil 2012, Wang ve Turnipseed 2012). Literatür çalışmalarında da sülfonamidlerin bal (Sheridan vd 2008), peynir (Pérez vd 2013), bebek maması (Gentili vd 2004), süt (She vd 2010) ve et (Hoff vd 2015) gibi gıdalarda yapılan analizlerinde genel olarak matriks uyumlu kalibrasyon kullanılmıştır.

Matriks uyumlu kalibrasyon grafikleri çizilirken hazırlanan konsantrasyonların, örneğin ekstrakt içeriğini yansıtmaları gerekmektedir. Bu yüzden, bu çalışmada 3 farklı matriksten ASE ve QuEChERS ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktlara artan konsantrasyonda standart karışım çözeltisinden ilave edilmiştir. Kalibrasyon grafikleri 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 µg/kg olmak üzere 6 noktalı olacak şekilde oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafikleri belirtilen bu değerlere karşı dedektörün vermiş olduğu yanıtı göre çizilmiştir. Analitik ölçüm aralıkları genel olarak analitlerin maksimum kalıntı miktarı (MRL) baz alınarak belirlenmektedir ve sülfonamid grubu antibiyotiklerin MRL değeri 100 µg/kg’dır (Wang ve Turnipseed 2012). Ancak bu çalışmanın en önemli amacı, bebek gıdalarında eser miktarda bulunan kalıntıların tespit edilebilmesi için yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresinden yararlanarak çok düşük konsantrasyonlarda ölçüm yapabilmektir. Bu amaçla, LOQ değerlerine göre kalibrasyon grafiğinin başlangıç konsantrasyonu belirlenmiş ve 6 noktalı olacak şekilde konsantrasyonlar ayarlanmıştır. Kalibrasyon grafikleri çizilirken kullanılacak modelin belirlenmesi doğru sonuçların elde edilmesi açısından önemlidir (Kay ve MacNeil 2012). Bu çalışmada, $r^2 \geq 0,999$ değerleri ile tüm kalibrasyon grafiklerinde kuadratik model uygulanmıştır. Bu model uygulanarak elde edilen kalibrasyon denklemleri Çizelge 22-27’de belirtilmiştir. Literatürde bebek gıdalarında farklı grup antibiyotiklerin analiz edildiği çalışmalarda (Gentili vd 2004, Aguilera-Luiz vd 2012, Zhan vd 2013, Jia vd 2014, Gómez-Pérez vd 2015) doğrusal kalibrasyon grafiği kullanılmıştır. Ancak, bu tez çalışmasında kalibrasyon grafiklerinin doğrusal olarak çizilmesi durumunda analitlerin r^2 değerlerinin kuadratik modele göre daha düşük olduğu ve bazı analitlerin r^2 değerinin 0,99 değerinin altına düştüğü belirlenmiştir. Kaufmann vd (2011) ve Bourdat-Deschamps vd (2014) tarafından gıdalarda ve çamur gibi sulu çevresel örneklerde yapılan farklı gruplardaki antibiyotik analizinde de kuadratik kalibrasyon modeli kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiklerinde dinamik aralığın geniş olduğu durumlarda

doğrusal kalibrasyon grafiklerinin kullanılmasının düşük konsantrasyonların ölçümlerinin güvenilir olmamasına neden olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 4.22. Bebek sütünde ASE sistemi ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısının karesi (r^2)
n-asetilsülfadiazin	$y = 8744,88x^2 + 269374x$	0,9999
n-asetilsülfamerazin	$y = 12999,3x^2 + 251853x$	0,9997
n-asetilsülfametazin	$y = 3539,81x^2 + 322957x$	0,9999
n-asetilsülfametoksazol	$y = 5728,99x^2 + 299160x$	0,9998
n-asetilsülfapiridin	$y = 5784,58x^2 + 277234x$	0,9995
sülfakloropiridazin	$y = 9740,31x^2 + 173201x$	0,9999
sülfadiazin	$y = 138,762x^2 + 198815x$	0,9998
sülfadimetoksin	$y = 5753,08x^2 + 290080x$	0,9998
sülfamerazin	$y = 418,089x^2 + 219957x$	0,9997
sülfametazin	$y = 6870,28x^2 + 206657x$	0,9998
sülfametoksazol	$y = 10149,6x^2 + 224247x$	0,9997
sülfametoksipiridazin	$y = 9307,22x^2 + 202111x$	0,9999
sülfamonometoksin	$y = 9979,63x^2 + 233817x$	0,9999
sülfamoksol	$y = 3404,39x^2 + 201885x$	0,9999
sülfapiridin	$y = 1237,71x^2 + 196536x$	0,9998
sülfakinoksalin	$y = 13508,8x^2 + 250324x$	0,9998
sülfatiazol	$y = 191,71x^2 + 236392x$	0,9995

*Denklemden 'x' analit konsantrasyonunu, 'y' alanını ifade etmektedir

Çizelge 4.23. Bebek sütünde QuEChERS ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısının karesi (r^2)
n-asetilsülfadiazin	$y = 3708,81x^2 + 288936x$	0,9998
n-asetilsülfamerazin	$y = 5860,45x^2 + 265129x$	0,9999
n-asetilsülfametazin	$y = 3456,49x^2 + 317057x$	0,9998
n-asetilsülfametoksazol	$y = 13035,6x^2 + 249928x$	0,9993
n-asetilsülfapiridin	$y = 6196,21x^2 + 271277x$	0,9997
sülfakloropiridazin	$y = 7419,14x^2 + 174870x$	0,9992
sülfadiazin	$y = 5016,34x^2 + 186272x$	0,9995
sülfadimetoksin	$y = 4372,67x^2 + 198003x$	0,9998
sülfamerazin	$y = 4894,88x^2 + 209082x$	0,9996
sülfametazin	$y = 5692,25x^2 + 205151x$	0,9998
sülfametoksazol	$y = 8267,03x^2 + 205499x$	0,9995
sülfametoksipiridazin	$y = 2426,62x^2 + 207629x$	0,9992
sülfamonometoksin	$y = 8338,04x^2 + 253652x$	0,9997
sülfamoksol	$y = 7747,32x^2 + 184300x$	0,9993
sülfapiridin	$y = 4308,14x^2 + 181471x$	0,9997
sülfakinoksalin	$y = 13067,5x^2 + 224947x$	0,9995
sülfatiazol	$y = 9174,78x^2 + 201624x$	0,9998

*Denklemden 'x' analit konsantrasyonunu, 'y' alanını ifade etmektedir

Çizelge 4.24. Ek gıdada ASE sistemi ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısının karesi (r^2)
n-asetilsülfadiazin	$y = 2928,68x^2 + 37971,6x$	0,9990
n-asetilsülfamerazin	$y = 4394,69x^2 + 99646,7x$	0,9992
n-asetilsülfametazin	$y = 914,698x^2 + 230722x$	0,9999
n-asetilsülfametoksazol	$y = 1226,75x^2 + 38337,6x$	0,9999
n-asetilsülfapiridin	$y = 7045,94x^2 + 177921x$	0,9999
sülfakloropiridazin	$y = 3632,11x^2 + 82915,6x$	0,9995
sülfadiazin	$y = 4111,15x^2 + 95289,2x$	0,9992
sülfadimetoksin	$y = 7531,35x^2 + 203403x$	0,9999
sülfamerazin	$y = 4018,06x^2 + 135697x$	0,9994
sülfametazin	$y = 4391,75x^2 + 161324x$	0,9998
sülfametoksazol	$y = 6406,52x^2 + 119534x$	0,9999
sülfametoksipiridazin	$y = 3184,5x^2 + 165596x$	0,9998
sülfamonometoksin	$y = 9856,07x^2 + 155689x$	0,9999
sülfamoksol	$y = 3354,32x^2 + 124790x$	0,9995
sülfapiridin	$y = 5824,56x^2 + 125806x$	0,9999
sülfakinoksalin	$y = 10094,1x^2 + 160420x$	0,9999
sülfatiazol	$y = 2988,87x^2 + 65472,8x$	0,9991

*Denklemden 'x' analit konsantrasyonunu, 'y' alanını ifade etmektedir

Çizelge 4.25. Ek gıdada QuEChERS ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısının karesi (r^2)
n-asetilsülfadiazin	$y = 5829,46x^2 + 260767x$	0,9999
n-asetilsülfamerazin	$y = 2406,04x^2 + 279240x$	0,9997
n-asetilsülfametazin	$y = 5305,98x^2 + 303286x$	0,9994
n-asetilsülfametoksazol	$y = 5728,16x^2 + 270253x$	0,9999
n-asetilsülfapiridin	$y = 7979,95x^2 + 238134x$	0,9997
sülfakloropiridazin	$y = 6741,2x^2 + 165165x$	0,9999
sülfadiazin	$y = 7133,24x^2 + 176839x$	0,9997
sülfadimetoksin	$y = 6538,02x^2 + 176082x$	0,9994
sülfamerazin	$y = 4426,19x^2 + 200105x$	0,9995
sülfametazin	$y = 9301,81x^2 + 184780x$	0,9990
sülfametoksazol	$y = 7412,58x^2 + 203585x$	0,9995
sülfametoksipiridazin	$y = 456,375x^2 + 210651x$	0,9996
sülfamonometoksin	$y = 8255,32x^2 + 253800x$	0,9992
sülfamoksol	$y = 1473,36x^2 + 203804x$	0,9994
sülfapiridin	$y = 3675,68x^2 + 190105x$	0,9997
sülfakinoksalin	$y = 12251,3x^2 + 223607x$	0,9996
sülfatiazol	$y = 8421,09x^2 + 197293x$	0,9997

*Denklemden 'x' analit konsantrasyonunu, 'y' alanını ifade etmektedir

Çizelge 4.26. Et ürünleri içeren mamaların ASE sistemi ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısının karesi (r^2)
n-asetilsülfadiazin	$y = 5698,35x^2 + 90802,2x$	0,9998
n-asetilsülfamerazin	$y = 3672,44x^2 + 134364x$	0,9998
n-asetilsülfametazin	$y = 3981,69x^2 + 187466x$	0,9997
n-asetilsülfametoksazol	$y = 3666,71x^2 + 92178,4x$	0,9995
n-asetilsülfapiridin	$y = 1556,23x^2 + 156009x$	0,9997
sülfakloropiridazin	$y = 3215,02x^2 + 107360x$	0,9993
sülfadiazin	$y = 6804,44x^2 + 102988x$	0,9997
sülfadimetoksin	$y = 4752,5x^2 + 173551x$	0,9998
sülfamerazin	$y = 2584,83x^2 + 131120x$	0,9999
sülfametazin	$y = 3262,17x^2 + 138268x$	0,9999
sülfametoksazol	$y = 1680,67x^2 + 146085x$	0,9993
sülfametoksipiridazin	$y = 2977,97x^2 + 141812x$	0,9992
sülfamonometoksin	$y = 4097,77x^2 + 136189x$	0,9995
sülfamoksol	$y = 4460,55x^2 + 110710x$	0,9998
sülfapiridin	$y = 7056,03x^2 + 100709x$	0,9999
sülfakinoksalin	$y = 4407,98x^2 + 158848x$	0,9990
sülfatiazol	$y = 4816,79x^2 + 114742x$	0,9994

*Denklemden 'x' analit konsantrasyonunu, 'y' alanını ifade etmektedir

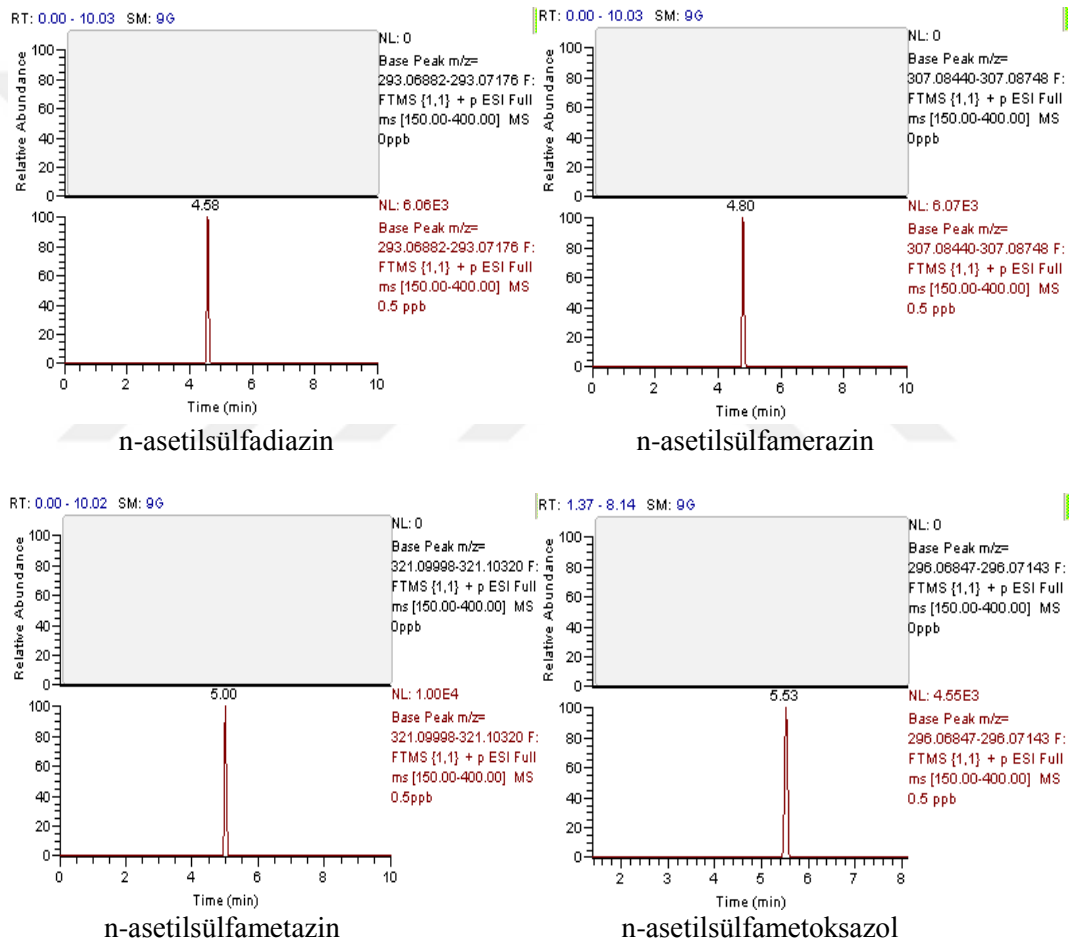
Çizelge 4.27. Et ürünleri içeren mamaların QuEChERS ile yapılan ekstraksiyon sonucunda analit verilerini temsil eden en iyi doğru denklemleri ve korelasyon katsayısının kareleri

Analit	Denklem	Korelasyon katsayısının karesi (r^2)
n-asetilsülfadiazin	$y = 9082,85x^2 + 224041x$	0,9999
n-asetilsülfamerazin	$y = 11072,9x^2 + 215493x$	0,9997
n-asetilsülfametazin	$y = 4234,8x^2 + 298876x$	0,9998
n-asetilsülfametoksazol	$y = 11582,8x^2 + 223670x$	0,9996
n-asetilsülfapiridin	$y = 484,366x^2 + 227869x$	0,9997
sülfakloropiridazin	$y = 9625,67x^2 + 146307x$	0,9997
sülfadiazin	$y = 6610,63x^2 + 169994x$	0,9995
sülfadimetoksin	$y = 3256,38x^2 + 293645x$	0,9995
sülfamerazin	$y = 9654,92x^2 + 169063x$	0,9998
sülfametazin	$y = 3245,24x^2 + 201602x$	0,9997
sülfametoksazol	$y = 9584,35x^2 + 185271x$	0,9997
sülfametoksipiridazin	$y = 11058,4x^2 + 157086x$	0,9997
sülfamonometoksin	$y = 7199,33x^2 + 229472x$	0,9999
sülfamoksol	$y = 8518,08x^2 + 164710x$	0,9999
sülfapiridin	$y = 4719,27x^2 + 176839x$	0,9995
sülfakinoksalin	$y = 17116,5x^2 + 203033x$	0,9998
sülfatiazol	$y = 6337,54x^2 + 193859x$	0,9997

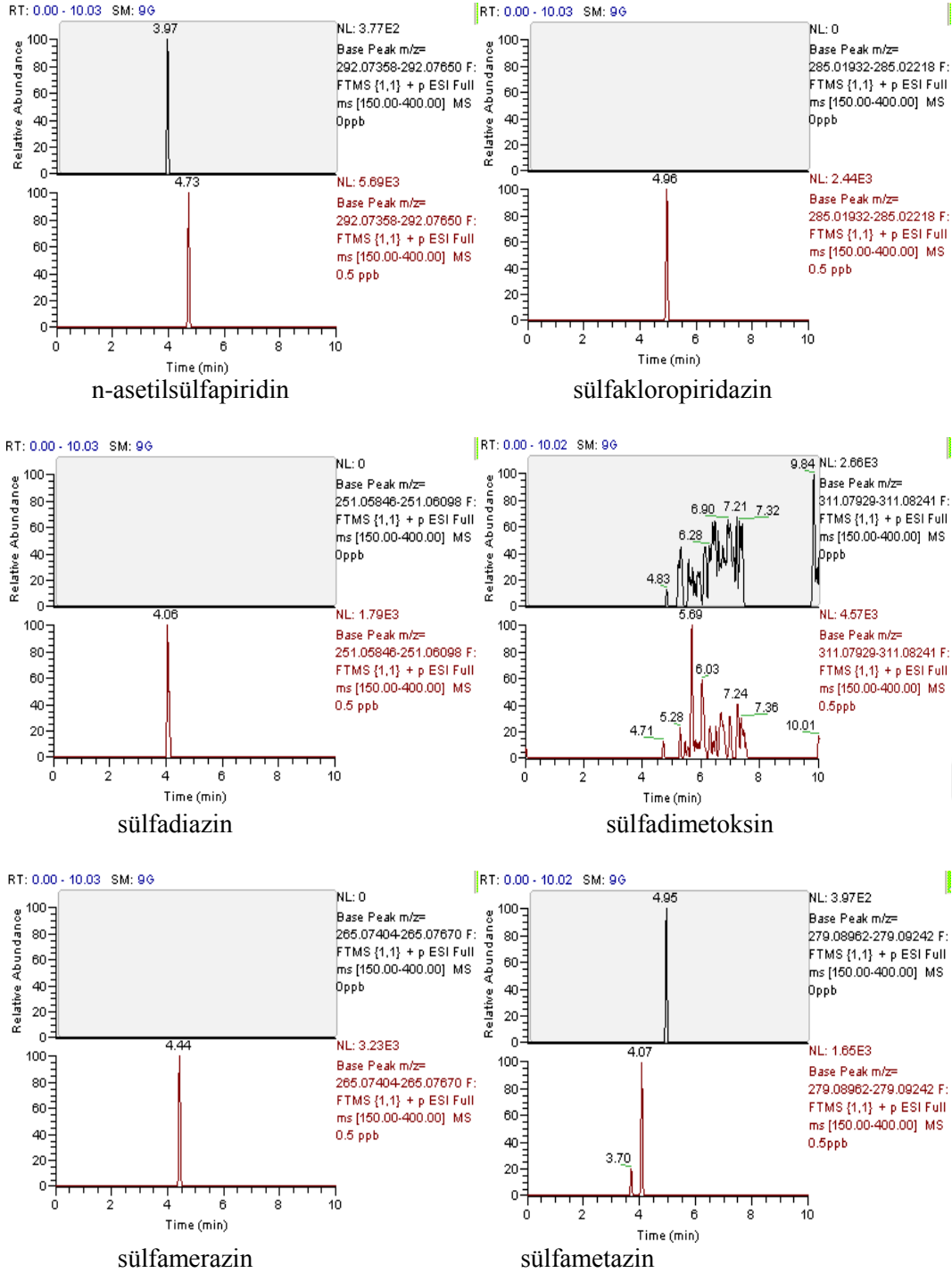
*Denklemden 'x' analit konsantrasyonunu, 'y' alanını ifade etmektedir

4.4.2. Seçicilik

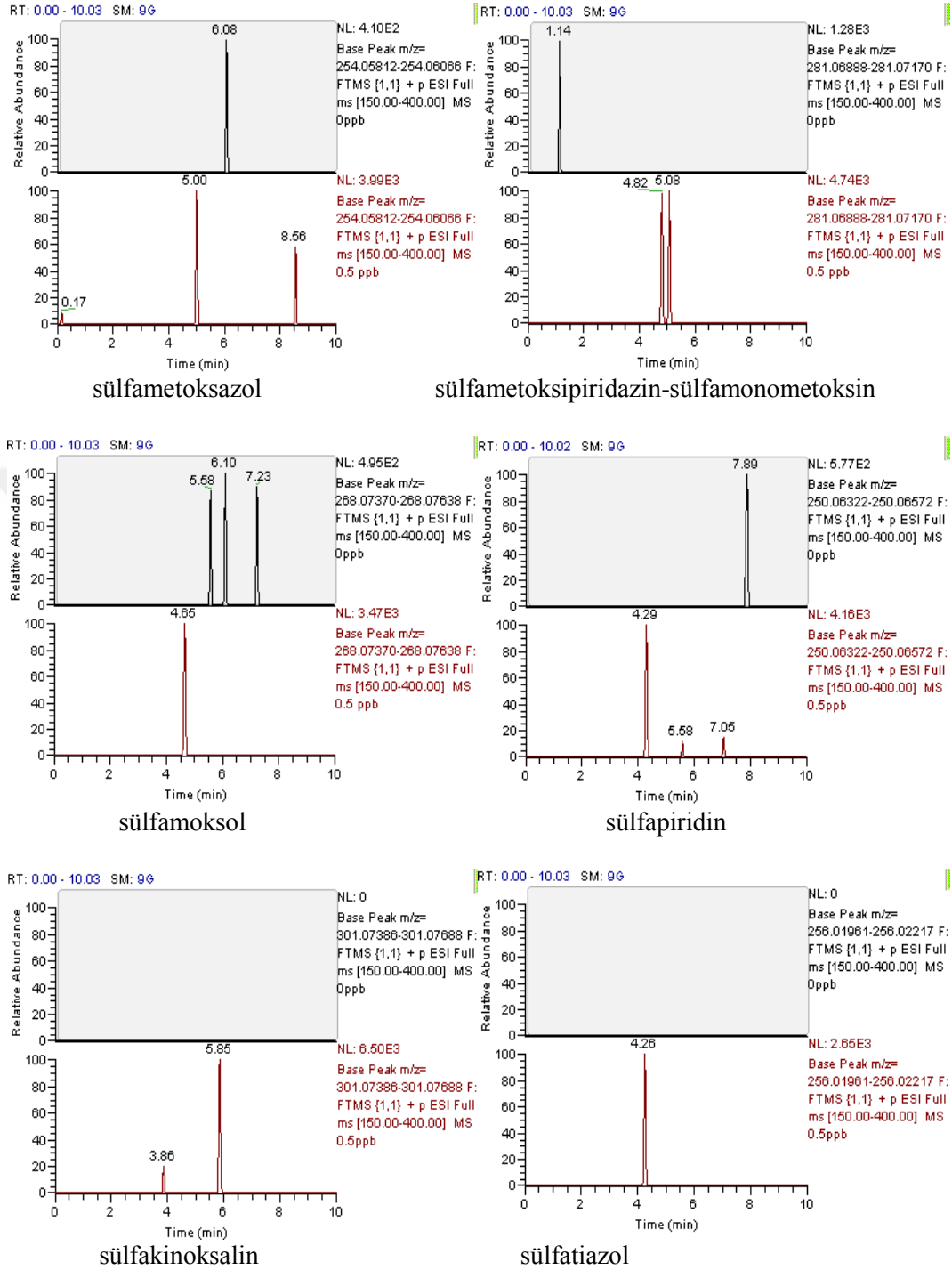
Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrelerinin (HRMS), yüksek çözünürlük gücüne sahip olması ve doğru kütle ölçümleri yapabilmesi analizlerde seçiciliğin artmasını sağlamaktadır. Bu durum matrikste özellikle eser miktarda bulunan analitlerin diğer matriks bileşiklerinden ayrılabilmesinde önemlidir (Kaklamanos vd 2013). Geliştirilen metodun seçiliğini belirlemek amacıyla 3 farklı matriksteki kör numuneler ve 0,5 µg/kg konsantrasyonda standart karışım ilave edilen numuneler QuEChERS ve ASE sistemi ile ekstrakte edilip analiz edilmiştir. Analitlere ait kromatogramlar Şekil 4.84-4.89’da verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde analizlerin yüksek seçicilikte yapıldığı belirlenmiştir.



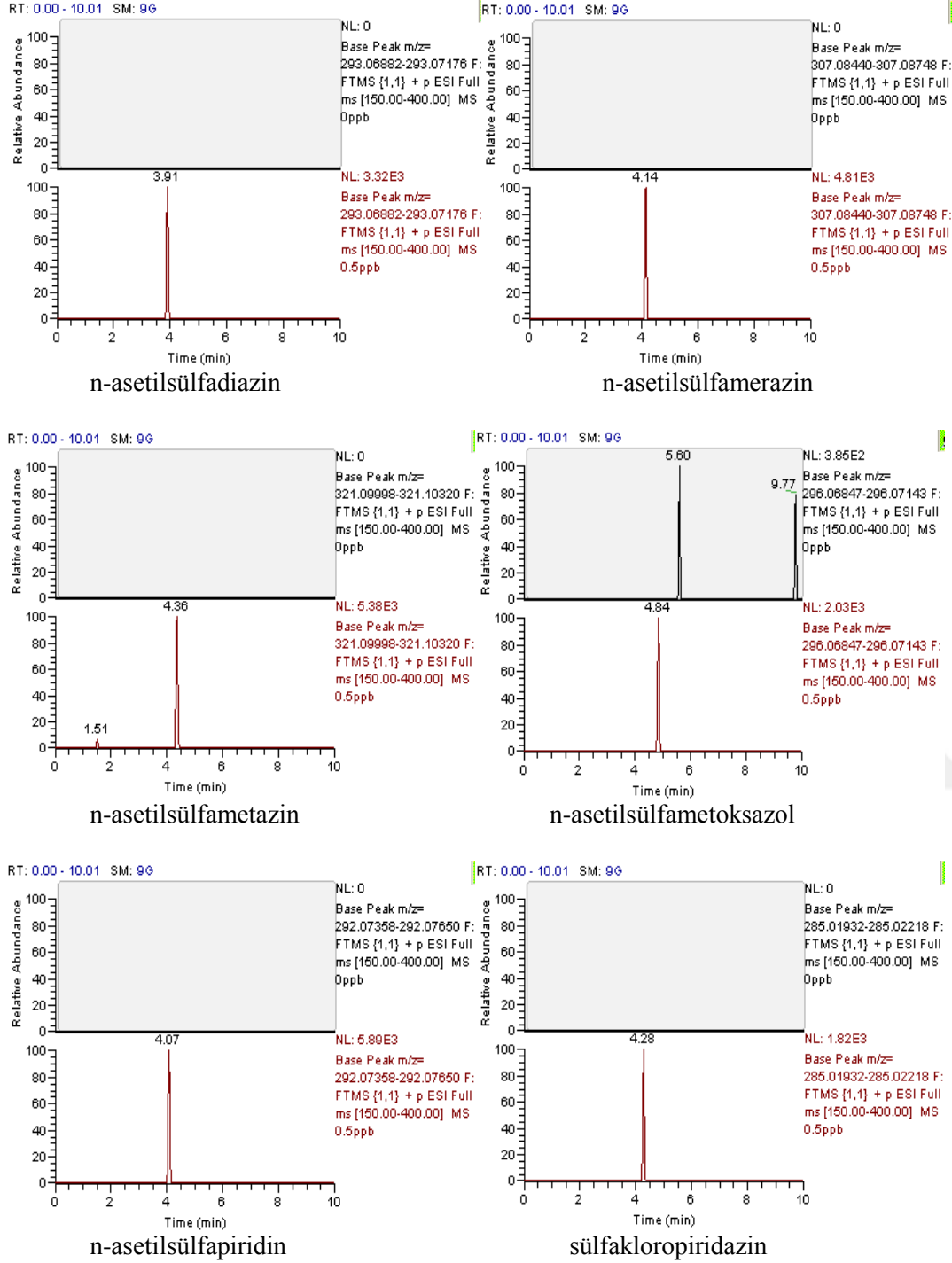
Şekil 4.84. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) bebek sütü örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir)



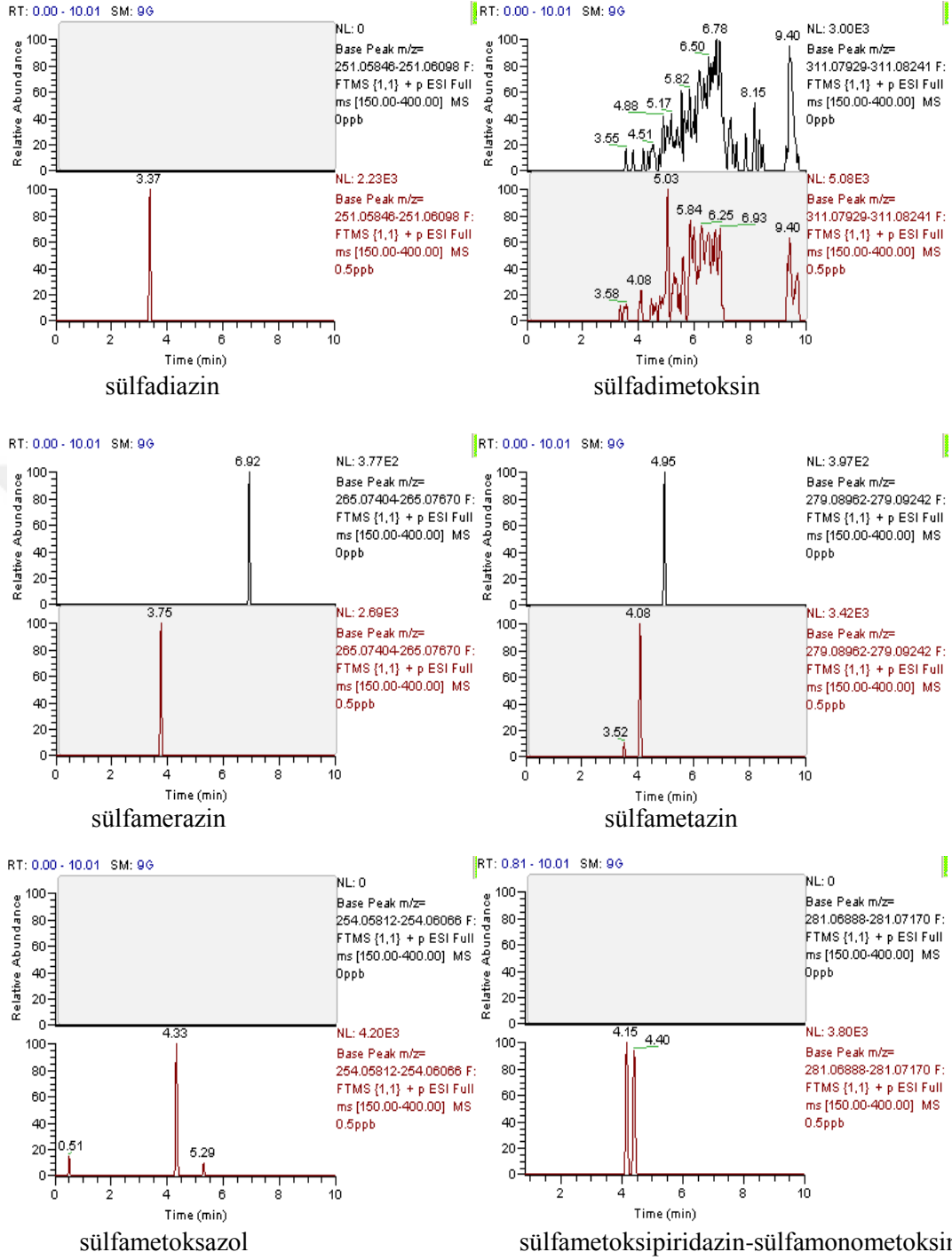
Şekil 4.84. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) bebek sütü örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir) (devamı)



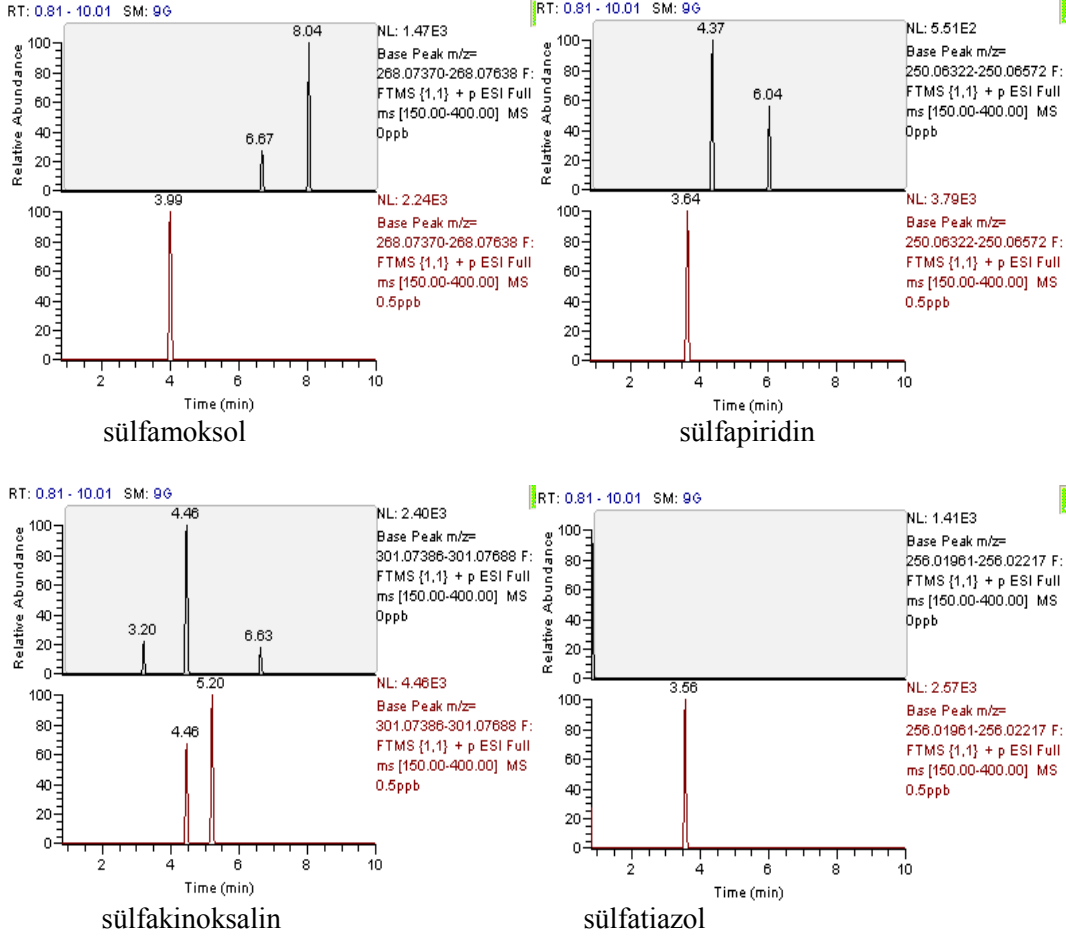
Şekil 4.84. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) bebek sütü örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir) (devamı)



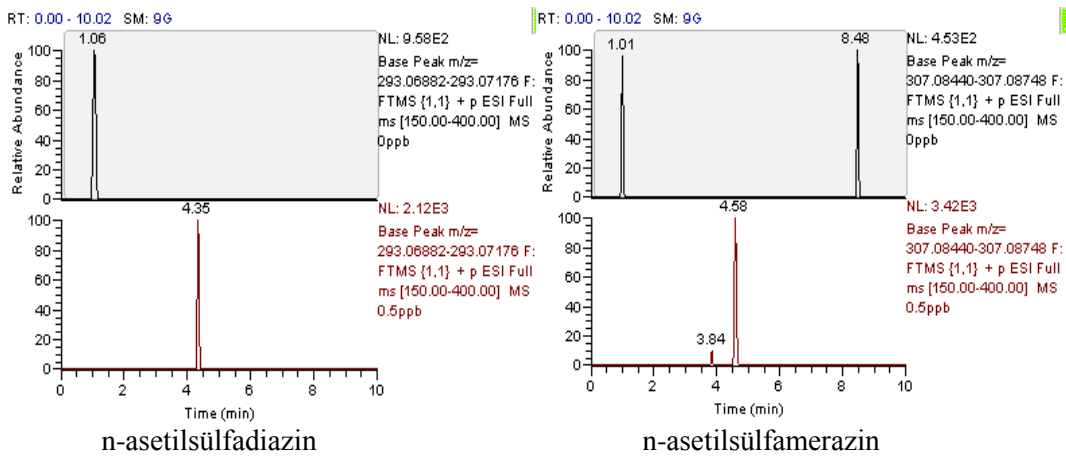
Şekil 4.85. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) ek gıda örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir)



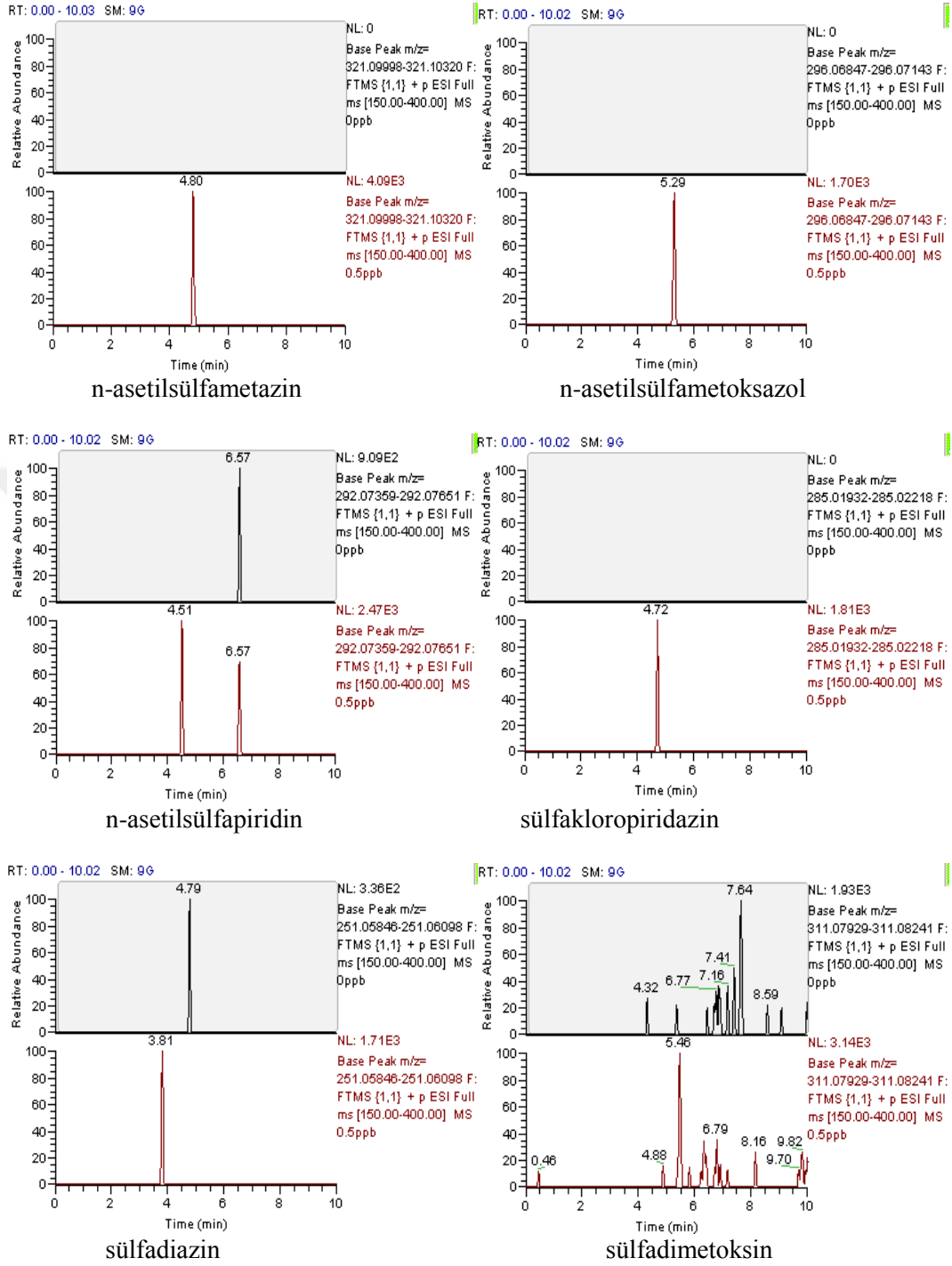
Şekil 4.85. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) ek gıda örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir) (devamı)



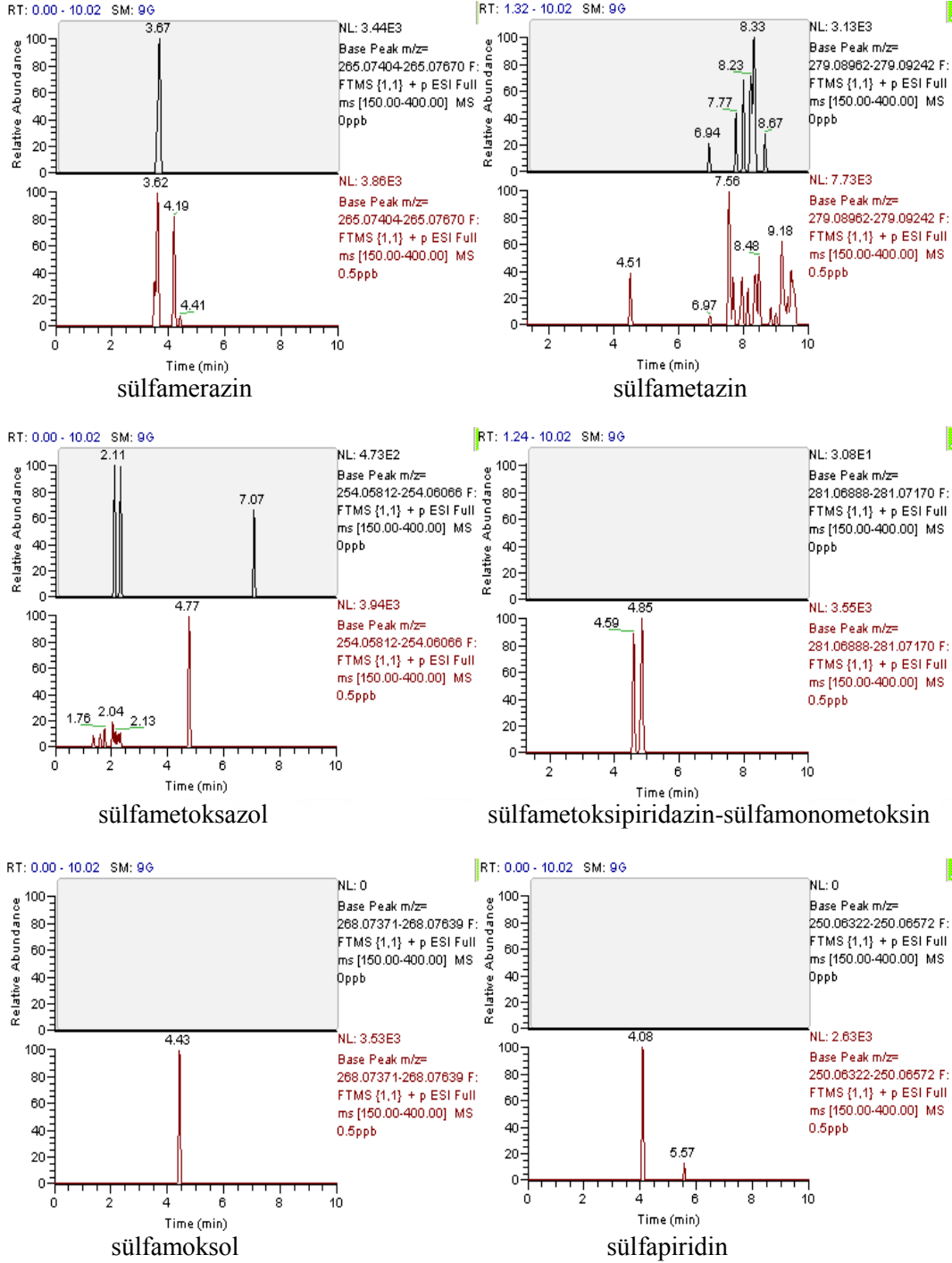
Şekil 4.85. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) ek gıda örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir) (devamı)



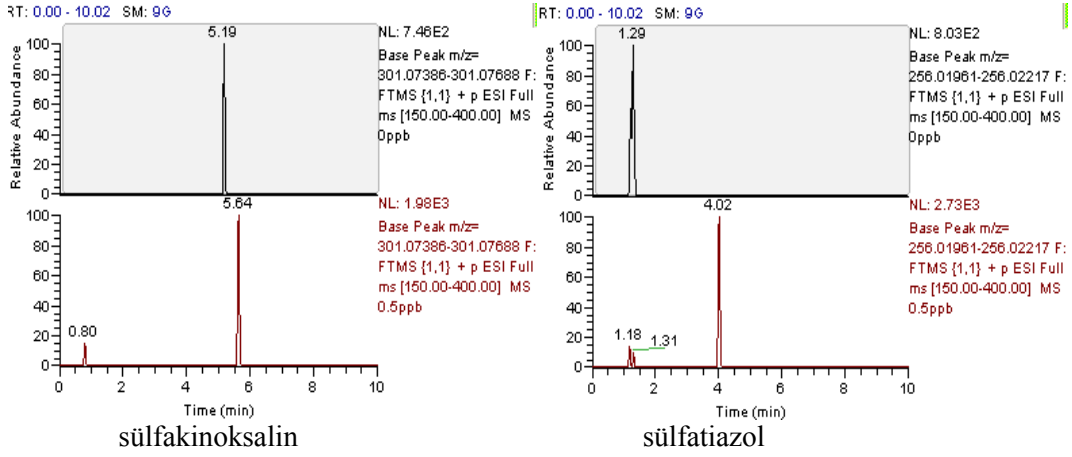
Şekil 4.86. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) et ürünleri içeren örneklere ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir)



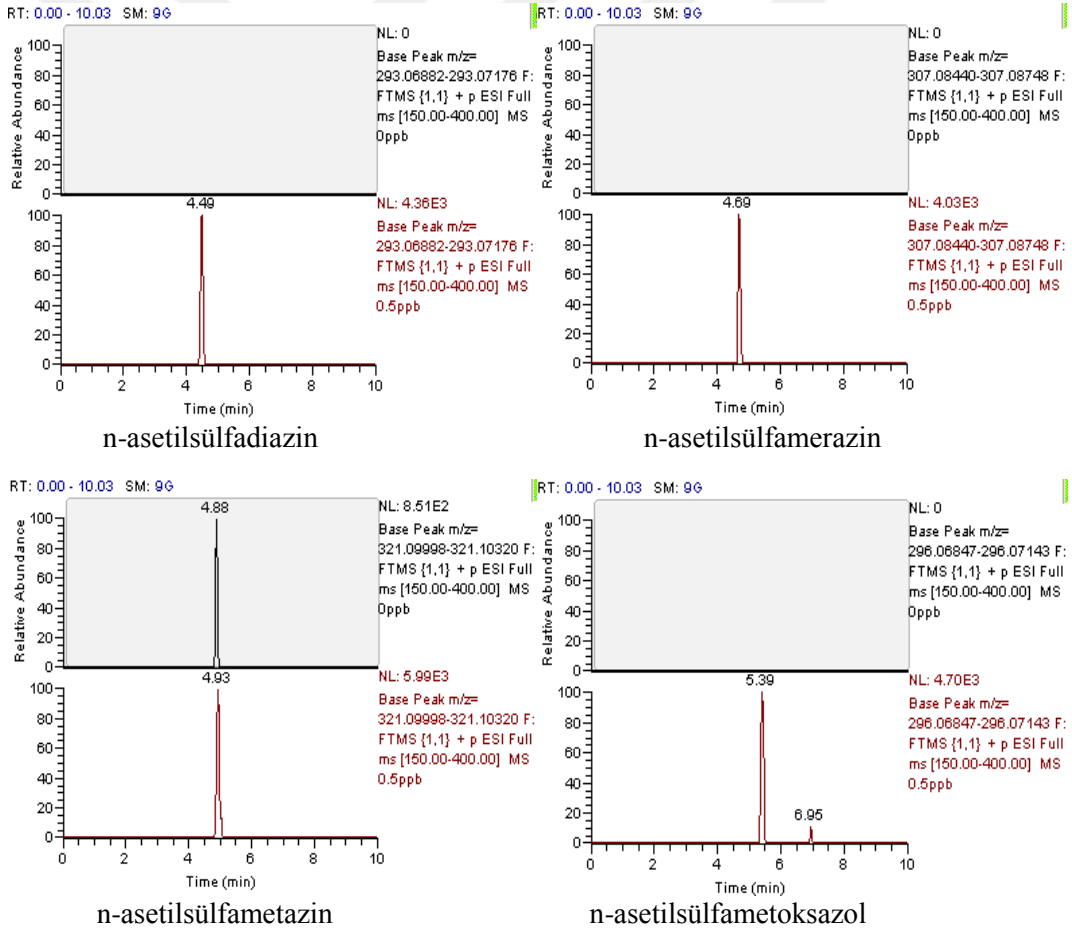
Şekil 4.86. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) et ürünleri içeren örneklerle ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir) (devamı)



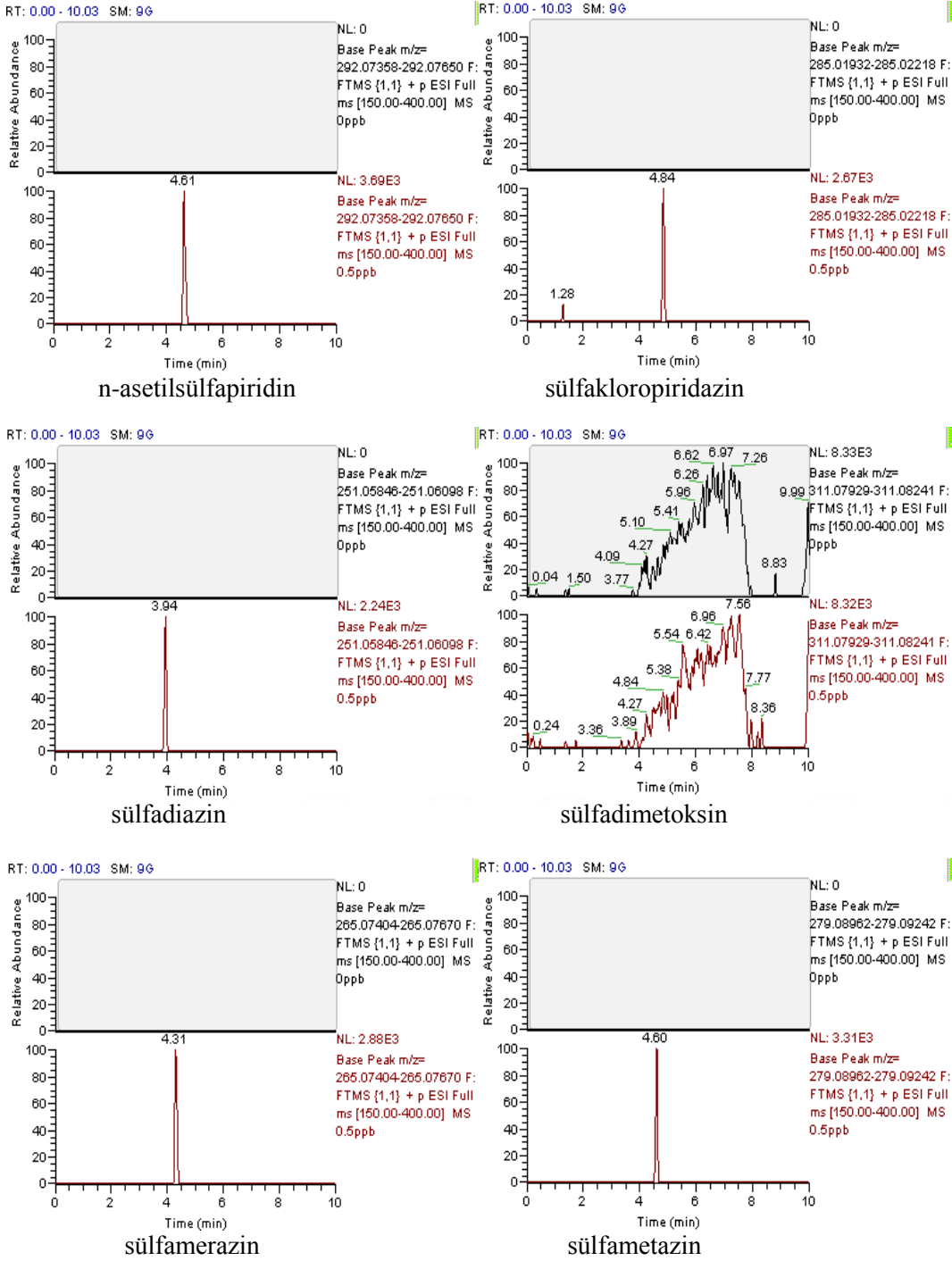
Şekil 4.86. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) et ürünleri içeren örneklerle ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir) (devamı)



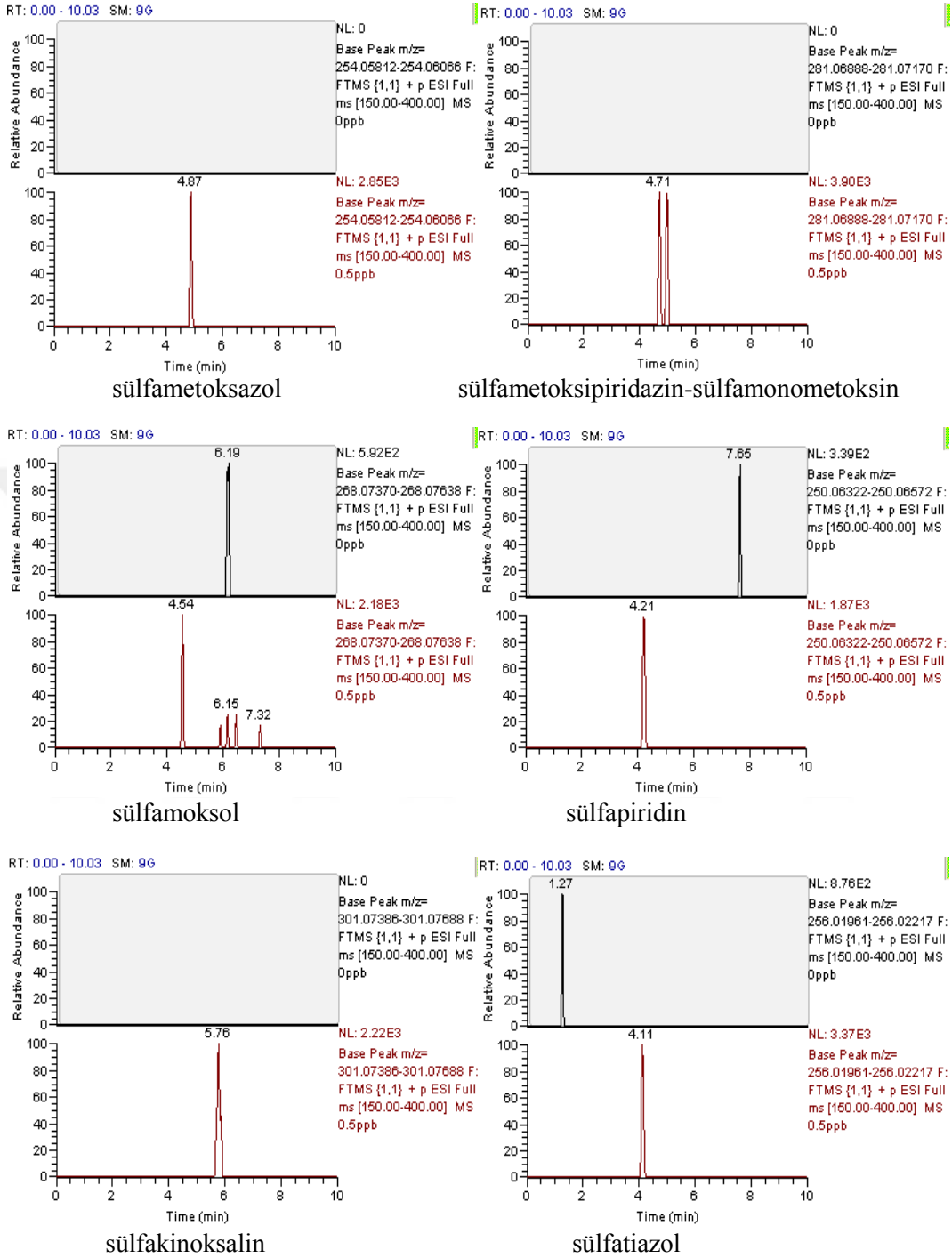
Şekil 4.86. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) et ürünleri içeren örneklere ait kromatogramlar (ekstraktlar ASE ile elde edilmiştir) (devamı)



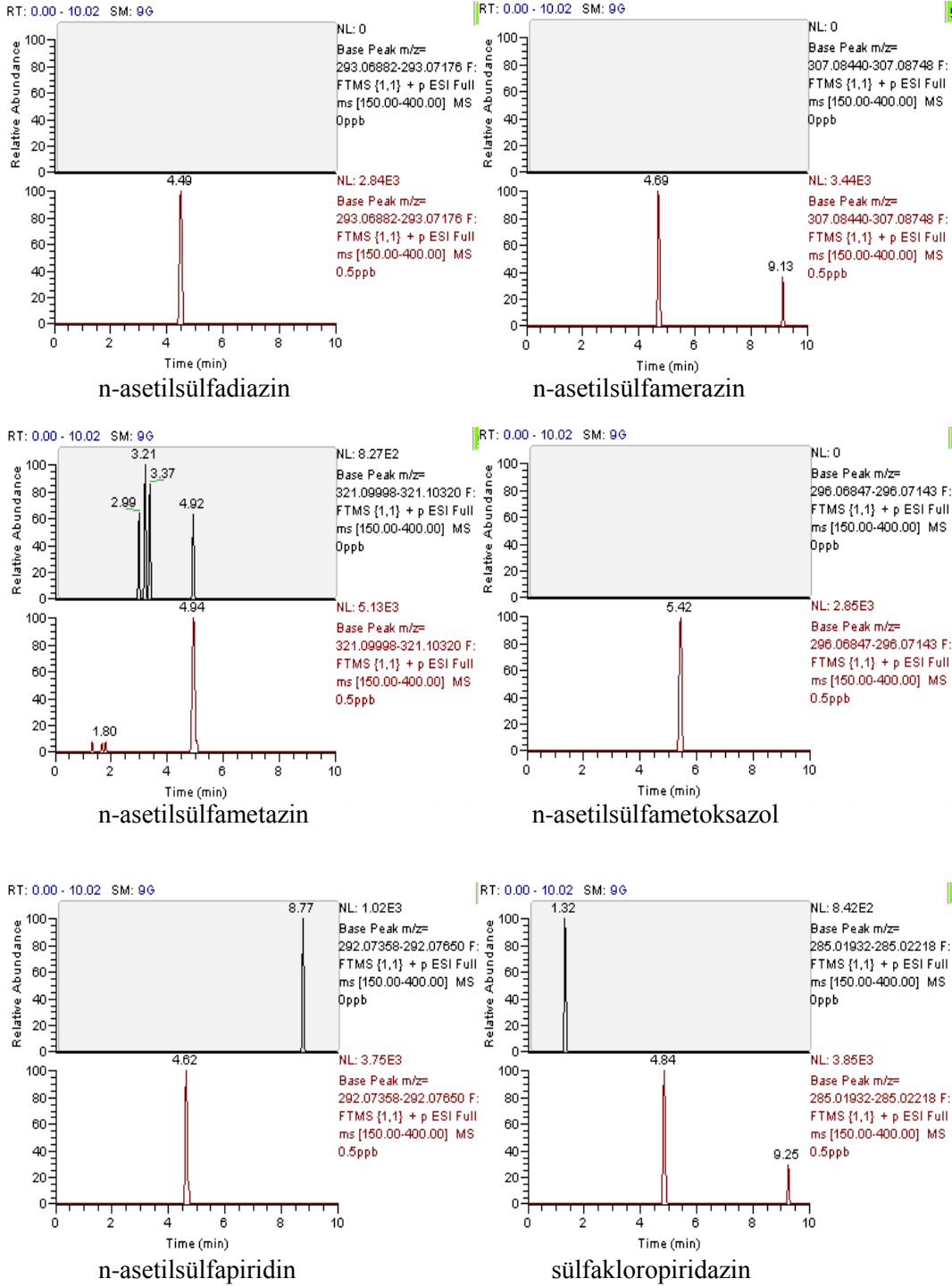
Şekil 4.87. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) bebek sütü örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)



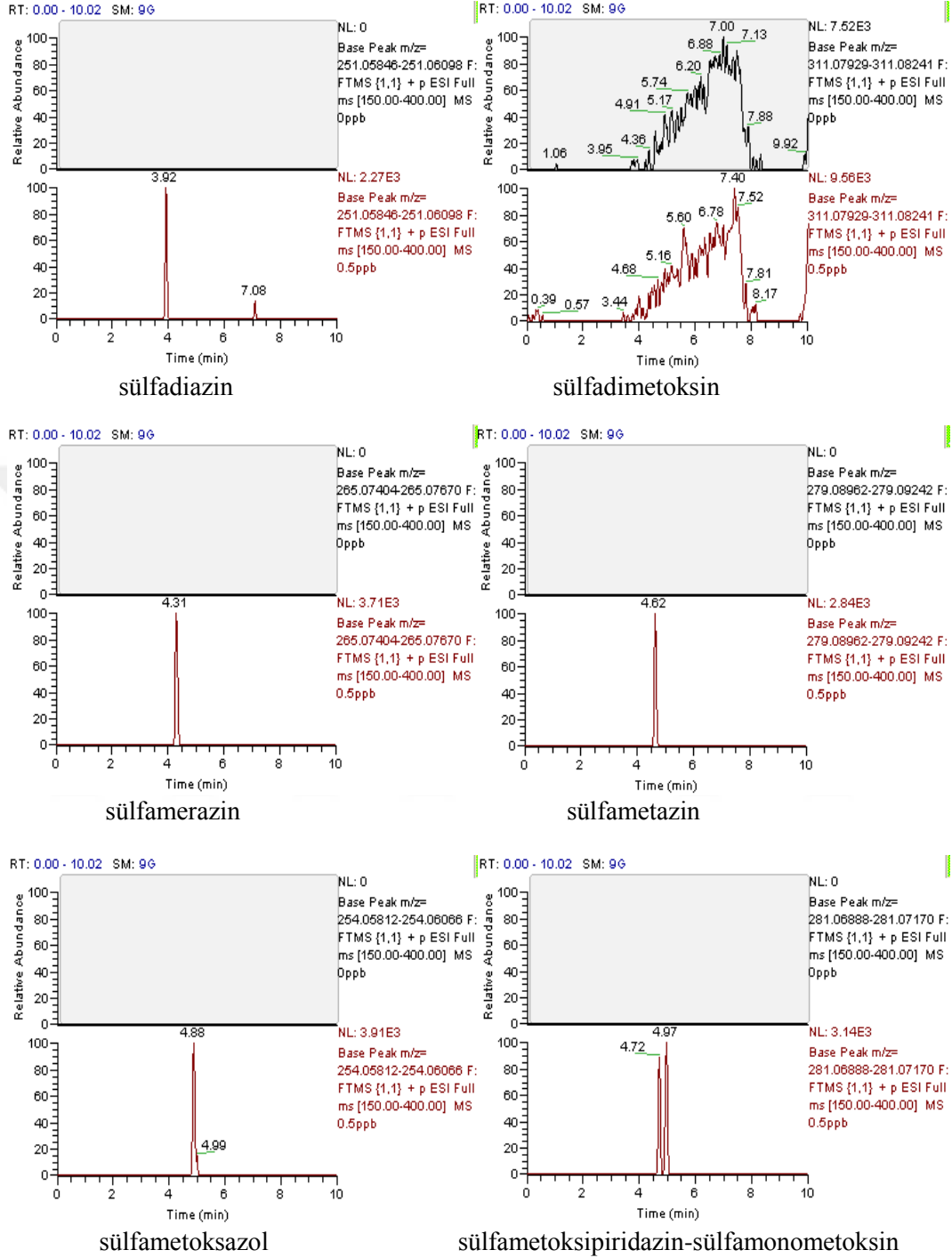
Şekil 4.87. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) bebek sütü örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir) (devamı)



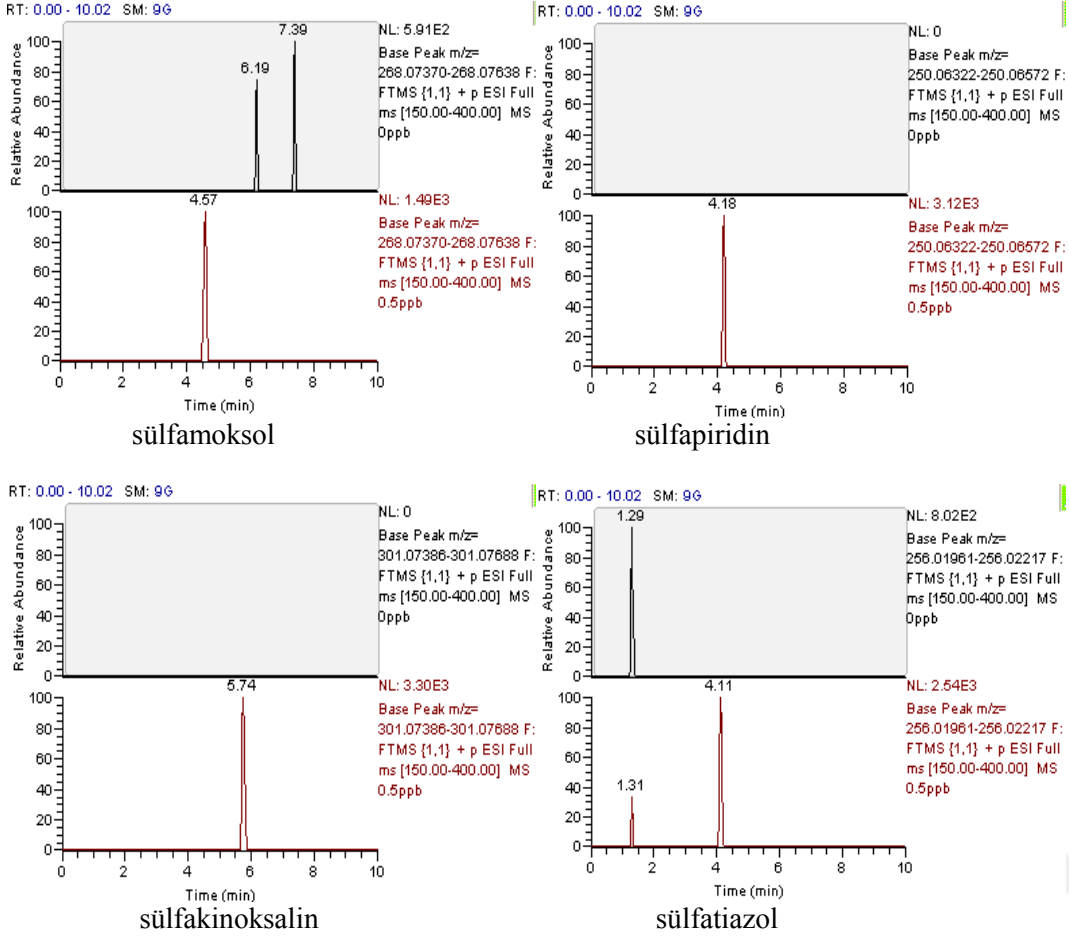
Şekil 4.87. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) bebek sütü örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir) (devamı)



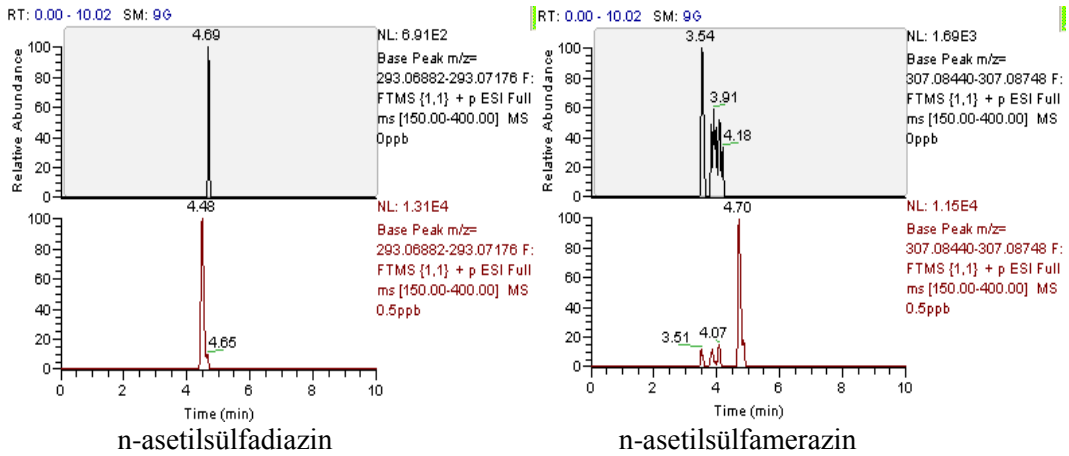
Şekil 4.88. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) ek gıda örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)



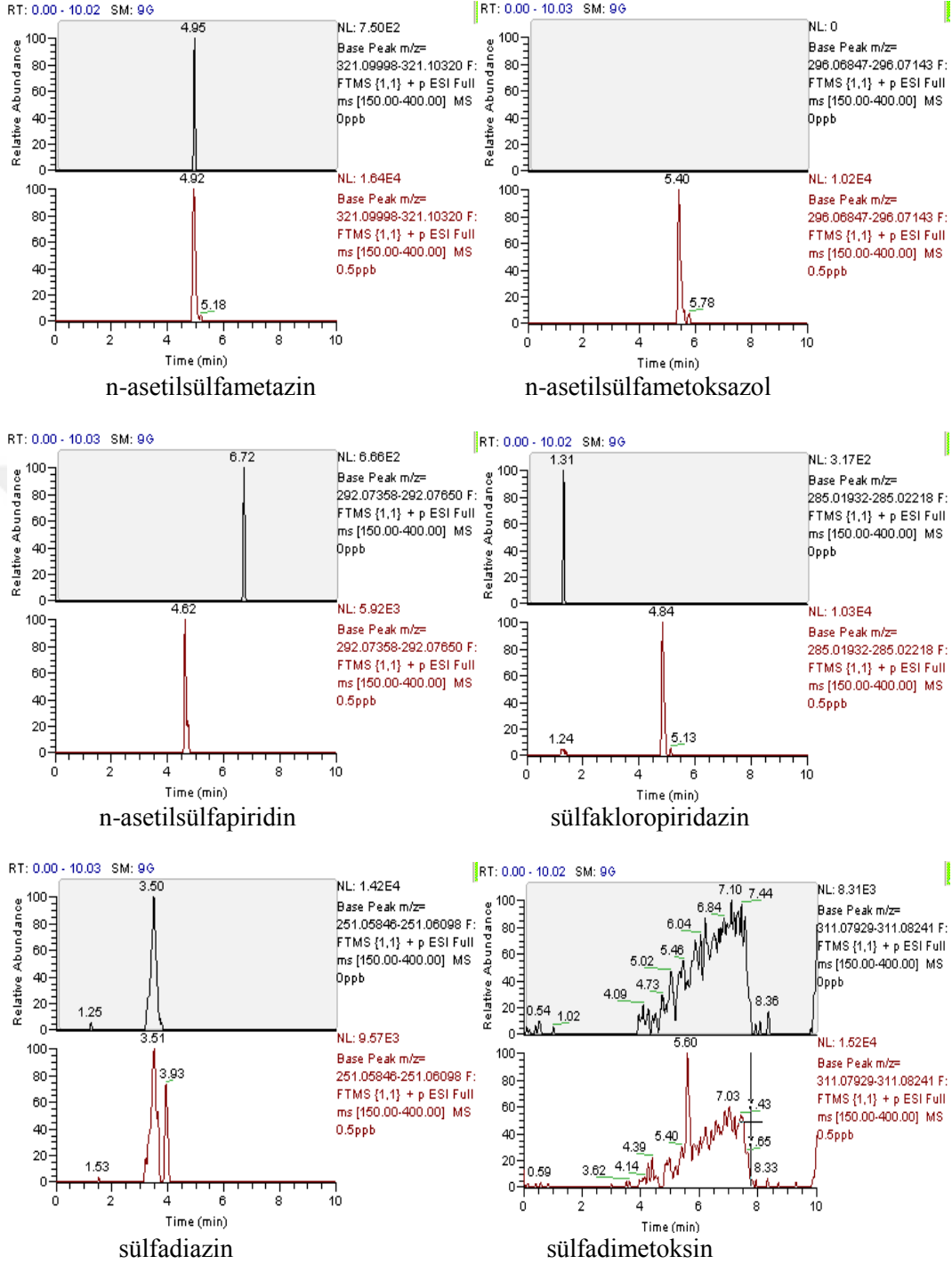
Şekil 4.88. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) ek gıda örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir) (devamı)



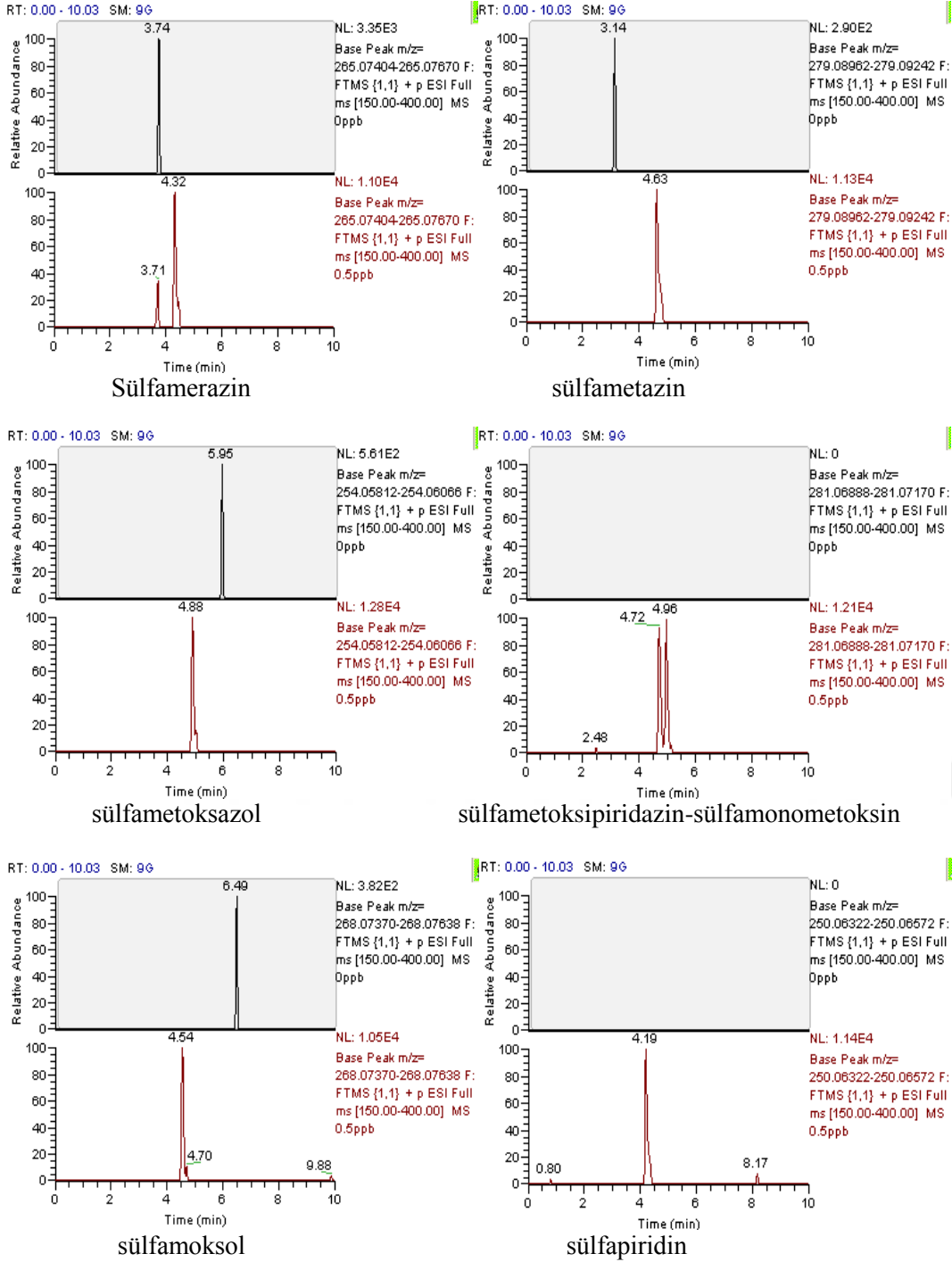
Şekil 4.88. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) ek gıda örneklerine ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir) (devamı)



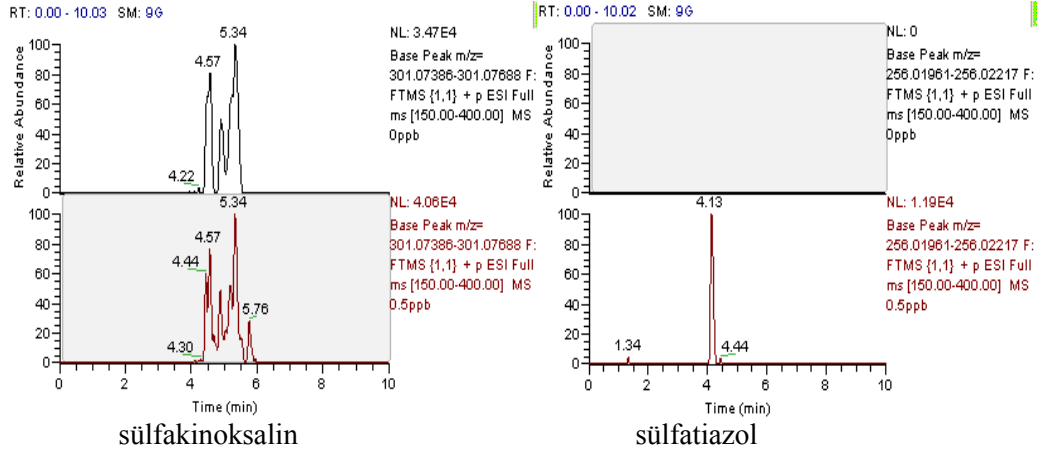
Şekil 4.89. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) et ürünleri içeren örneklere ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir)



Şekil 4.89. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) et ürünleri içeren örneklere ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir) (devamı)



Şekil 4.89. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) et ürünleri içeren örneklerle ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir) (devamı)



Şekil 4.89. Kör (0 ppb) ve standart karışım ilave edilmiş (0.5 ppb) et ürünleri içeren örneklerle ait kromatogramlar (ekstraktlar QuEChERS ile elde edilmiştir) (devamı)

Kütle spektrometrelerinin çalışma performansının değerlendirilmesinde cihazın çözünürlük değeri ile bağlantılı olan kütle doğruluğu parametresi de dikkate alınmalıdır. Yüksek doğrulukta yapılan ölçümler analitin diğer matriks bileşenlerinden ayrılmasını sağlayarak tanımlanmasını artırmaktadır. Kütle doğruluğu, analitin gerçek kütlesi ile cihazda ölçülen kütle değeri arasındaki fark ile hesaplanmaktadır (Olsen vd 2005). Gıdalarda kalıntı ve kontaminantların analizinde kullanılan cihazın yüksek çözünürlükte ve kütle doğruluğunda çalışabilmesi önemlidir. Karışık bileşime sahip matrikslerden eser miktarda analitlerin yüksek çözünürlükte (>50000) cihazlar kullanılarak yapılan analizinde 2 ppm'in altında tutarlı ve güvenilir kütle doğruluğuna ulaşılmıştır. Orbitrap analizörü ile 1 ppm ve altında kütle doğruluğuna ulaşmak mümkün olmaktadır (Makarov ve Scigelova 2010). Bu çalışmada, seçicilik çalışması için kullanılan 0,5 µg/kg standart karışım ilave edilen 3 farklı matriksteki analitlere ait kromatogramlar değerlendirilerek kütle doğruluğu belirlenmiştir ve Çizelge 4.28'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.28. Analitlere ait kütle doğruluğu (ppm) değerleri

	QuEChERS			ASE		
	Ek gıda	Bebek sütü	Et ürünleri içeren mama	Ek gıda	Bebek sütü	Et ürünleri içeren mama
n-asetilsülfadiazin	0,1	0,5	0,7	1,1	0,9	1,7
n-asetilsülfamerazin	0,9	0,2	1,5	0,3	0,7	0,7
n-asetilsülfametazin	0,8	0,3	0,7	0,9	0,3	1,3
n-asetilsülfametoksazol	0,1	0,3	0,2	0,1	1,0	1,8
n-asetilsülfapiridin	1,1	0,5	2,0	0,5	0,9	1,3
sülfakloropiridazin	0,7	1,2	1,0	0,1	0,4	0,6
sülfadiazin	0,3	2,0	1,3	0,8	0,2	2,0
sülfadimetoksin	1,3	1,9	0,2	1,5	2,5	2,0
sülfamerazin	1,1	0,2	0,6	0,4	1,2	2,0
sülfametazin	0,2	0,9	0,2	1,1	0,9	1,6
sülfametoksazol	0,3	1,1	0,7	0,2	1,6	1,9
sülfametoksipiridazin	0,1	1,0	1,1	1,0	1,7	1,9
sülfamonometoksin	1,3	1,2	0,7	0,6	1,3	1,8
sülfamoksol	0,8	0,1	0,8	0,1	1,1	1,5
sülfapiridin	0,2	0,2	0,5	1,2	2,0	1,5
sülfakinoksalin	0,2	0,7	0,8	0,9	0,7	1,7
sülfatiazol	0,9	0,1	0,3	0,9	1,1	1,8

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde birçok analitin 1 ppm'in altında kütle doğruluğu ile analiz edildiği, ancak genel olarak değerlendirildiğinde kütle doğruluğunun 2 ppm'in altında olduğu tespit edilmiştir. Bu değer çalışmanın yüksek doğrulukta yapıldığını ifade etmektedir. Literatürde farklı gıda matrislerinde Orbitrap analizörü kullanılarak yapılan antibiyotik kalıntı çalışmalarında 1 ppm'in (Aguilera-Luiz vd 2013), 2 ppm'in (Romero-González vd 2011), 3 ppm'in (Gómez-Pérez vd 2012) ve 5 ppm'in (Abdallah vd 2014) altında; bebek gıdalarında ise 2 ppm'in (Jia vd 2014) ve 5 ppm'in (Gómez-Pérez vd 2015) altında kütle doğruluğu ile analizler gerçekleştirilmiştir.

4.4.3. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)

Analitler için bulunan LOQ değerlerinin, o analite ait MRL değerinin altında veya daha çok tercih edilen miktar olan $\frac{1}{2}$ MRL değerinde olması gerekmektedir (Kay ve MacNeil 2012). Daha önce de belirtildiği üzere, hem Avrupa Birliği'nde hem de ülkemizde bebek gıdalarında ilaç kalıntı limitlerini tanımlayan geçerli herhangi bir mevzuat bulunmadığından dolayı bu çalışmanın amacına uygun olarak, elde edilen LOQ değerlerinin mümkün olduğunca düşük olması metodun eser miktarda analitlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için yeterli olduğunu göstermektedir (Aguilera-Luiz vd 2013). Bu çalışmada analitlerin LOQ değerleri 0,1-0,5 $\mu\text{g/kg}$ aralığında tespit edilmiştir (Çizelge 4.29). Literatürde bebek gıdaları ile yapılan sülfonamid grubu antibiyotiklerin analizinde ASE sistemi kullanılarak elde edilen ekstraktlar LC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiştir ve analitlerin LOQ değerinin 1,2-5,1 $\mu\text{g/kg}$ aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Gentili vd 2004). Aguilera-Luiz vd (2012) tarafından bebek gıdalarında yapılan diğer bir çalışmada QuEChERS ekstraksiyonu sonucunda LC-MS/MS cihazında analiz edilen örneklerdeki sülfonamid grubu antibiyotiklerin LOQ değerlerinin 0,7-6,7 $\mu\text{g/kg}$ aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.29. Analitlere ait LOD ($\mu\text{g/kg}$) ve LOQ değerleri ($\mu\text{g/kg}$)

	QuEChERS						ASE					
	Ek gıda		Bebek sütü		Et ürünleri içeren mama		Ek gıda		Bebek sütü		Et ürünleri içeren mama	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
n-asetilsülfadiazin	0,04	0,14	0,11	0,37	0,05	0,18	0,11	0,35	0,10	0,33	0,07	0,24
n-asetilsülfamerazin	0,07	0,24	0,09	0,28	0,06	0,20	0,08	0,28	0,08	0,27	0,07	0,22
n-asetilsülfametazin	0,05	0,17	0,09	0,31	0,13	0,42	0,06	0,21	0,05	0,17	0,07	0,22
n-asetilsülfametoksazol	0,06	0,20	0,16	0,55	0,06	0,20	0,12	0,41	0,05	0,17	0,10	0,34
n-asetilsülfapiridin	0,11	0,35	0,11	0,35	0,10	0,35	0,09	0,31	0,09	0,31	0,07	0,23
sülfakloropiridazin	0,08	0,26	0,07	0,24	0,06	0,19	0,09	0,29	0,14	0,47	0,07	0,24
sülfadiazin	0,07	0,22	0,08	0,25	0,08	0,26	0,16	0,52	0,20	0,39	0,07	0,23
sülfadimetoksin	0,06	0,21	0,06	0,21	0,06	0,19	0,08	0,26	0,08	0,27	0,05	0,15
sülfamerazin	0,03	0,10	0,12	0,39	0,05	0,18	0,13	0,44	0,16	0,53	0,09	0,29
sülfametazin	0,04	0,14	0,15	0,49	0,05	0,16	0,11	0,38	0,05	0,18	0,11	0,35
sülfametoksazol	0,07	0,22	0,13	0,43	0,07	0,22	0,07	0,24	0,09	0,31	0,07	0,24
sülfametoksipiridazin	0,06	0,19	0,09	0,29	0,05	0,15	0,09	0,28	0,06	0,19	0,09	0,31
sülfamonometoksin	0,06	0,19	0,13	0,42	0,07	0,23	0,06	0,19	0,10	0,35	0,11	0,38
sülfamoksol	0,07	0,22	0,08	0,28	0,07	0,24	0,07	0,22	0,10	0,34	0,13	0,42
sülfapiridin	0,11	0,35	0,12	0,39	0,09	0,30	0,15	0,49	0,09	0,29	0,09	0,31
sülfakinoksalin	0,03	0,09	0,12	0,41	0,05	0,15	0,08	0,28	0,07	0,25	0,07	0,25
sülfatiazol	0,12	0,41	0,09	0,29	0,12	0,42	0,13	0,38	0,17	0,57	0,10	0,34

Bebek gıdalarında yapılan diğer bir çalışmada, Zhan vd (2013) tarafından LC-MS/MS cihazı ile antibiyotik kalıntı analizi yapılmıştır ve sülfonamid grubu antibiyotiklerin LOQ değerlerinin 0,1-0,5 µg/kg aralığında olduğu belirlenmiştir. Jia vd (2014) tarafından bebek gıdalarında bulunan farklı kalıntı gruplarının (pestisit ve antibiyotik) analizinde Q-Orbitrap cihazı kullanılmıştır. Kalıntı gruplarının içerisinde 7 tane sülfonamid grubu antibiyotik de bulunmaktadır. Ekstraktlar QuEChERS yönteminin ilk aşamasının modifiye edilmesi ile elde edildikten sonra filtreden geçirilerek analiz edilmiştir. Analitlerin LOQ değerleri 0,43-1,95 µg/kg aralığında değişmektedir. Gómez-Pérez vd (2015) tarafından yapılan bebek gıdalarında kalıntı analizinde sülfonamid grubu antibiyotiklerinde (16 tane) içinde bulunduğu analitler %1 formik asit içeren asetonitril çözeltisi ile ekstrakte edildikten sonra Orbitrap-Exactive cihazı ile analiz edilmiştir ve analitlerin LOQ değerlerinin 0,5-25 µg/kg aralığında olduğu tespit edilmiştir.

4.4.4. Doğruluk ve kesinlik

Literatür kısmında da belirtildiği gibi doğruluk, analiz sonucunda elde edilen değer ile gerçek değer birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Doğruluğun tespiti için sertifikalı referans madde ve referans metot kullanılmaktadır. Ancak, bunların bulunmadığı durumlarda doğruluk geri kazanım çalışması ile belirlenmektedir. Bu çalışmada, geliştirilen analiz metodunun doğruluk çalışması için kör numuneler olarak seçilen bebek sütüne, ek gıdaya ve et içeren mamalara 0.5, 1 ve 2.5 µg/kg olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda standart karışımdan ilave edilmiştir. Bu değerler çalışmanın ölçüm aralığında bulunmaktadır ve geri kazanım çalışması her bir konsantrasyonda 6 tekrarlı yapılmıştır. Kesinlik ise ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade etmektedir ve birbirinden bağımsız analiz sonuçlarının arasındaki tutarlılığı göstermektedir. Kesinlik, doğruluğun bir bileşenidir ve tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik olarak 2 ölçümü mevcuttur. Bu çalışmada, tekrarlanabilirlik aynı gün içerisinde kör numunelerin 3 farklı konsantrasyonda (0.5, 1 ve 2.5 µg/kg) zenginleştirilerek her bir konsantrasyonda 6 tekrarlı yapılan analiz sonucunda elde edilen değerlerin; tekrarüretilebilirlik ise tekrarlanabilirlik çalışmasının 3 farklı günde yapılması sonucunda elde edilen değerlerin bağıl standart sapması (%RSD) hesaplanarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.30-4.32’de iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktların analiz edilmesi sonucunda elde edilen verilere göre hesaplanan % geri kazanım oranları ve bağıl standart sapma değerleri verilmiştir. Çizelgelerde tekrarlanabilirlik gün içi RSD ve tekrarüretilebilirlik ise günler arası RSD olarak belirtilmiştir.

Literatürde gıdalarda sülfonamid grubu antibiyotik kalıntılarının yapıldığı analizlerde genel olarak validasyon çalışması için bu grubun MRL değeri olan 100 µg/kg veya bu değer 1/2 konsantrasyonu (0,5 MRL) kullanılmıştır. Ancak, Orbitrap Exactive yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile balda (Gómez-Pérez vd 2012, Aguilera-Luiz vd 2013) ve sütte (Romero-González vd 2011) yapılan antibiyotik kalıntı analizinde metot validasyonunda kullanılan en düşük konsantrasyonlar 5 veya 10 µg/kg’dır. Analitik metotların validasyon çalışmasında baz alınan Avrupa Birliği Komisyon Kararı’na göre 10 µg/kg konsantrasyonda yapılan çalışmalar için geri kazanım değeri %60-115, tekrarlanabilirlik RSD’si <%20, tekrarüretilebilirlik RSD’si

ise <%30 olarak kararlaştırılmıştır. Metot validasyonunun bu konsantrasyonun altındaki değerlerde yapıldığı durumlarda RSD değerlerinin mümkün olduğunca düşük olması gerektiği belirtilmiştir (Anonymous 2002).

Elde edilen sonuçlara göre, analitlerin geri kazanım oranlarının ek gıdada QuEChERS yönteminde %60,9-85,8 ve ASE yönteminde %78,9-96,6; bebek sütünde QuEChERS yönteminde %61,9-85,9 ve ASE sisteminde %76,5-94,1 ve et içeren mamalarda QuEChERS yönteminde %69,8-81,6 ve ASE sisteminde %75,5-93,5 değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir. Gün içi RSD değerlerinin ek gıdada QuEChERS yönteminde %3,3-16,8 ve ASE yönteminde %1,7-10,8; bebek sütünde QuEChERS yönteminde %5,6-19,1 ve ASE sisteminde %2,1-10,7 ve et içeren mamalarda QuEChERS yönteminde %3,4-11,7 ve ASE sisteminde %1,1-10,1 değerleri arasında; günler arası RSD değerlerinin ek gıdada QuEChERS yönteminde %1,9-15,8 ve ASE yönteminde %0,6-8,0; bebek sütünde QuEChERS yönteminde %4,0-17,7 ve ASE sisteminde %1,2-9,0 ve et içeren mamalarda QuEChERS yönteminde %1,5-10,6 ve ASE sisteminde %1,1-8,6 değerleri arasında değiştiği belirlenmiştir.

Veriler incelendiğinde bu çalışmada elde edilen sonuçların standartlara uygun olduğu gözlemlenmiştir. ASE yöntemiyle analitlerin daha yüksek oranda geri kazanımının yapıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen değerlerin hem gün içi hem de günler arası RSD değerleri QuEChERS yöntemi ile elde edilen değerlere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Gentili vd (2004) tarafından bebek gıdalarında yapılan sülfonamid grubu antibiyotik analizinde validasyon çalışması 100 µg/kg düzeyinde yapılmıştır ve ASE sisteminde geri kazanım değerleri %10'un altında bağıl standart sapma ile %70-101 aralığında elde edilmiştir. Aguilera-Luiz vd (2012) tarafından bebek gıdalarında yapılan diğer bir çalışmada ise QuEChERS ekstraksiyonu kullanılmıştır ve validasyon çalışması 3 farklı konsantrasyonda (10, 50 ve 100 µg/kg) gerçekleştirilmiştir. En düşük konsantrasyonda geri kazanım değerlerinin %8-22 bağıl standart sapma ile %97-120 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Zhan vd (2013) tarafından içerisinde sülfonamid grubu antibiyotiklerinde bulunduğu farklı antibiyotik gruplarının bebek gıdalarından asetonitril ile ekstraksiyonu yapılmıştır. Çalışmada validasyon aşaması 200 µg/kg konsantrasyonda yapılmıştır ve geri kazanım değerlerinin %2-13 bağıl standart sapma ile %77-111 aralığında olduğu belirlenmiştir. Jia vd (2014) tarafından içerisinde sülfonamid grubu bulunan kalıntı analizinde modifiye QuEChERS yöntemi (sadece 1. aşama) ile %83-102 (%RSD <%8) aralığında geri kazanım elde edilmiştir. Validasyon çalışması her analitin LOQ değerine bağlı olarak 3 farklı (LOQ, 2xLOQ ve 4xLOQ) konsantrasyonda olmak üzere 0,5-8 µg/kg aralığında gerçekleştirilmiştir. Gómez-Pérez vd (2015) tarafından yapılan bebek gıdalarında kalıntı analizinde sülfonamid grubu antibiyotiklerin de içinde bulunduğu analitlerin validasyon çalışmasında 3 farklı (10, 50 ve 100 µg/kg) konsantrasyon kullanılmıştır. Ekstraksiyon asidik (%1) asetonitril ile gerçekleştirilmiştir. En düşük konsantrasyonda %2-28 bağıl standart sapma ile geri kazanım değerinin %34-79 aralığında olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda bu değer %1-9 bağıl standart sapma ile %83-102 aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.30. Ek gıda ile yapılan analizlere ait geri kazanım oranları, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri

	QuEChERS									ASE								
	0,5 ppb			1 ppb			2,5 ppb			0,5 ppb			1 ppb			2,5 ppb		
	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD
n-asetilsülfadiazin	74,4	12,9	14,7	68,9	9,3	8,9	67,3	7,0	6,8	92,8	4,5	2,3	93,3	2,9	1,9	94,8	3,3	3,3
n-asetilsülfamerazin	74,1	15,5	15,2	73,7	6,5	6,9	69,9	6,8	4,7	85,9	7,9	8,0	95,1	2,8	1,1	96,2	2,4	0,8
n-asetilsülfametazin	85,8	7,9	7,6	79,1	10,1	10,1	74,6	6,6	5,9	89,6	5,8	4,1	93,5	3,6	3,3	95,5	3,2	3,0
n-asetilsülfametoksazol	72,8	14,3	15,0	69,9	8,9	9,0	68,0	5,1	2,8	87,2	5,9	6,7	92,3	3,9	3,3	93,9	3,6	3,4
n-asetilsülfapiridin	73,2	14,7	14,0	70,7	6,0	4,0	68,1	4,6	2,4	86,8	5,2	3,1	93,7	3,9	3,2	95,4	3,1	3,0
sülfakloropiridazin	65,9	13,5	13,0	67,6	9,3	7,2	70,0	3,3	1,9	81,9	7,9	7,6	93,1	3,5	3,0	92,8	5,4	5,3
sülfadiazin	69,5	13,3	13,1	62,9	8,7	7,8	70,9	6,4	4,9	78,9	10,8	5,9	92,9	3,2	2,6	96,2	2,2	1,6
sülfadimetoksin	78,3	9,5	9,0	78,3	10,6	9,7	72,6	5,3	5,6	86,2	7,0	5,2	91,2	3,9	3,4	92,8	5,1	4,6
sülfamerazin	72,1	14,3	14,9	68,9	4,2	3,4	68,9	5,4	4,4	81,5	7,1	6,0	94,2	1,7	1,0	96,6	2,7	2,1
sülfametazin	70,1	12,9	13,9	66,7	8,6	7,1	70,5	5,9	5,1	82,5	6,7	5,2	94,6	3,0	1,1	94,8	3,7	1,6
sülfametoksazol	71,7	11,4	9,7	72,4	9,2	8,3	73,7	3,9	2,5	86,8	6,8	6,2	91,5	4,2	4,0	95,7	2,2	1,6
sülfametoksipiridazin	64,5	14,9	15,2	65,9	8,3	6,0	67,9	5,7	2,4	84,2	9,0	6,4	94,0	3,1	1,2	94,6	3,2	1,9
sülfamonometoksin	65,5	14,3	15,8	64,7	5,9	4,7	67,6	5,2	5,2	82,9	7,4	2,4	93,1	3,2	2,4	95,2	2,5	1,8
sülfamoksol	60,9	16,6	14,3	64,6	9,1	5,8	63,2	7,3	7,2	79,3	8,8	8,0	89,8	5,4	5,2	92,1	4,9	5,1
sülfapiridin	64,9	16,8	15,2	64,5	11,1	10,9	65,9	6,7	6,9	82,8	7,8	3,6	93,8	3,9	3,3	95,7	1,9	1,0
sülfakinoksalin	70,9	11,1	11,2	69,1	6,9	7,3	71,9	5,2	5,0	86,0	6,0	3,2	92,8	4,2	3,8	95,9	1,8	1,3
sülfatiazol	62,6	12,9	10,7	61,4	6,9	6,8	66,7	8,4	4,8	81,3	6,3	4,1	91,4	3,3	0,6	96,0	2,0	1,0

Çizelge 4.31. Bebek sütü ile yapılan analizlere ait geri kazanım oranları, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri

	QuEChERS									ASE								
	0,5 ppb			1 ppb			2,5 ppb			0,5 ppb			1 ppb			2,5 ppb		
	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD
n-asetilsülfadiazin	75,2	14,0	10,6	74,9	11,5	9,7	69,8	5,7	4,1	83,8	7,1	6,3	86,4	5,6	5,3	91,8	4,8	4,6
n-asetilsülfamerazin	74,9	14,0	13,8	78,5	9,8	8,7	72,6	5,6	4,0	86,0	6,3	5,3	86,2	6,4	4,8	91,9	5,1	2,9
n-asetilsülfametazin	85,9	11,9	10,1	79,5	10,6	10,2	73,2	8,6	9,5	90,9	5,2	4,9	92,7	3,6	2,4	94,1	2,1	1,2
n-asetilsülfametoksazol	74,9	19,1	17,7	76,9	14,2	14,3	71,3	8,0	7,9	81,1	5,3	4,6	84,4	8,3	7,5	91,0	4,9	4,7
n-asetilsülfapiridin	71,5	13,2	13,1	74,7	10,3	10,0	70,6	7,3	8,0	81,1	6,5	4,8	83,4	7,6	6,4	91,1	3,7	3,3
sülfakloropiridazin	64,4	15,4	17,0	70,5	14,2	15,3	69,9	8,0	7,8	80,4	6,3	4,2	82,9	7,1	4,8	92,7	4,2	2,9
sülfadiazin	68,4	12,8	11,5	70,1	10,8	10,1	72,4	8,8	7,6	76,5	10,1	7,7	87,1	6,4	4,3	93,0	4,5	3,0
sülfadimetoksin	74,9	9,0	5,9	72,1	8,9	6,4	72,8	5,8	5,2	87,0	4,9	2,7	88,4	4,4	3,3	92,5	3,1	2,5
sülfamerazin	71,1	11,8	6,7	70,1	10,6	6,3	71,9	5,9	4,7	77,9	10,4	4,0	83,0	7,1	5,6	92,3	5,2	4,5
sülfametazin	69,3	14,8	11,5	69,9	12,9	10,8	73,4	6,9	5,9	88,5	5,9	3,8	86,7	7,0	5,3	92,9	4,2	3,0
sülfametoksazol	75,3	14,2	14,3	78,1	10,9	9,4	77,4	8,3	8,4	80,0	5,4	2,5	85,1	6,9	6,4	91,7	5,5	4,5
sülfametoksipiridazin	69,3	11,6	10,0	70,0	10,8	7,3	71,7	8,5	9,3	84,7	6,7	5,3	84,0	5,7	4,4	91,5	4,9	4,2
sülfamonometoksin	65,6	15,1	13,9	66,9	9,6	9,4	73,6	5,9	5,0	86,5	5,9	6,6	86,4	6,7	5,5	93,8	3,9	4,2
sülfamoksol	65,4	8,3	5,0	63,6	11,1	8,2	69,8	7,9	5,8	79,6	6,4	7,0	82,2	8,9	8,3	92,2	5,0	4,2
sülfapiridin	65,1	14,3	11,7	66,1	10,9	10,9	75,1	6,6	5,4	81,4	10,7	8,9	86,6	7,2	5,6	92,2	4,2	3,1
sülfakinoksalin	68,7	12,5	9,7	71,6	9,6	9,1	71,5	7,8	7,7	88,9	6,5	4,5	86,8	5,7	4,2	93,3	4,9	4,0
sülfatiazol	61,9	10,9	9,3	62,4	8,4	8,2	68,5	8,4	8,3	77,1	9,5	7,1	81,4	9,1	9,0	88,1	8,4	7,0

Çizelge 4.32. Et içeren mamalar ile yapılan analizlere ait geri kazanım oranları, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri

	QuEChERS									ASE								
	0,5 ppb			1 ppb			2,5 ppb			0,5 ppb			1 ppb			2,5 ppb		
	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD	% ortalama geri kazanım	Gün içi, %RSD	Günler arası, %RSD
n-asetilsülfadiazin	74,1	7,8	7,0	73,4	7,0	6,8	70,1	3,4	1,5	85,2	6,3	4,5	90,9	4,9	3,6	93,5	4,2	3,2
n-asetilsülfamerazin	70,8	8,0	6,0	76,8	6,2	2,8	75,7	4,2	3,5	82,8	4,7	3,4	85,9	4,2	2,8	90,3	4,9	3,9
n-asetilsülfametazin	75,1	9,3	6,8	75,9	4,8	4,0	73,7	3,7	2,6	87,4	3,6	2,1	92,6	3,0	1,6	92,3	3,7	3,0
n-asetilsülfametoksazol	75,7	6,3	5,1	77,4	5,5	5,1	76,8	4,9	3,4	84,3	8,9	7,4	90,1	2,9	1,1	92,4	3,4	1,1
n-asetilsülfapiridin	78,9	7,2	5,0	73,9	6,8	5,2	72,0	8,7	9,5	82,9	8,0	6,8	88,1	3,6	3,5	88,2	6,0	4,5
sülfakloropiridazin	74,5	10,5	7,3	76,4	11,7	10,6	77,3	6,0	5,4	75,6	6,4	3,6	84,7	4,1	2,5	87,8	6,1	4,2
sülfadiazin	73,8	8,1	6,8	73,6	6,6	5,2	76,8	6,8	3,7	75,5	8,5	7,3	86,2	5,8	5,1	89,2	6,8	4,8
sülfadimetoksin	81,4	7,5	7,0	80,9	7,2	6,8	76,9	6,7	5,9	82,1	6,8	6,9	88,1	4,1	3,0	92,7	4,5	2,8
sülfamerazin	78,1	6,6	6,8	80,7	6,7	5,0	79,7	6,6	3,8	77,3	5,4	4,3	87,3	5,3	3,8	90,1	5,5	4,9
sülfametazin	73,9	7,2	4,3	77,4	5,3	4,3	76,7	7,2	6,9	81,7	5,9	2,8	89,3	4,1	3,1	89,8	4,5	2,5
sülfametoksazol	76,5	7,9	5,5	80,8	5,5	4,5	80,9	6,5	5,0	81,8	5,8	3,2	89,9	3,7	3,1	89,6	5,7	4,8
sülfametoksipiridazin	74,1	5,8	4,4	78,6	6,9	5,4	74,9	6,0	3,7	86,3	4,9	3,2	89,5	3,9	2,0	86,8	4,1	4,0
sülfamonometoksin	77,7	6,7	5,4	80,9	8,9	9,5	81,6	6,8	6,4	86,4	6,3	5,9	88,8	5,7	3,8	89,3	5,0	4,1
sülfamoksol	69,8	9,7	7,0	73,9	7,6	6,5	78,3	5,6	3,8	78,3	8,8	7,6	85,8	5,4	4,3	85,6	5,7	4,7
sülfapiridin	73,6	10,5	8,5	75,1	5,9	4,6	76,8	5,5	4,9	77,6	10,1	4,1	83,6	4,4	2,5	88,6	6,5	3,2
sülfakinoksalin	76,3	6,1	3,9	79,1	8,2	8,3	77,6	6,5	3,6	84,4	6,4	4,4	87,9	3,6	3,5	90,1	7,1	5,4
sülfatiazol	73,5	9,9	9,0	73,6	4,3	1,9	74,9	3,9	3,1	75,9	9,6	7,0	82,3	9,4	8,6	87,4	7,6	5,4

5. SONUÇ

Veteriner ilaç kalıntıları, gıdalarda bulunabilen ve insan sağlığını tehdit eden başlıca kimyasal gruplardan bir tanesidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve diğer uluslararası örgütler, hem insan hem de hayvan tıbbında antibakteriyel tedavilerin aşırı veya yanlış uygulanması sonucunda ortaya çıkan risklere dikkat çekmektedir. Gıdalarda bilinçsiz kullanım sonucunda oluşabilecek antibiyotik kalıntıları insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Kalıntıların neden olduğu sağlık problemleri özellikle bebek ve çocuklarda daha da önem arz etmektedir. Bu açıdan gıdalarda eser miktarda bulunabilecek kalıntı ve kontaminantların belirlenmesi günümüzde giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu çalışmada, bebek gıdalarında eser miktarda bulunabilecek 17 tane (5 tanesi metabolit) sülfonamid grubu antibiyotik kalıntılarının UHPLC-HR/MS (Orbitrap-Exactive) cihazı kullanılarak yüksek çözünürlükte ve kütle doğruluğunda analizi yapılmıştır. Analitlerin matriksten ekstraksiyonu için ASE sistemi ve QuEChERS ekstraksiyonu olmak üzere 2 farklı yöntem kullanılmıştır.

QuEChERS ekstraksiyonu genel olarak gıdalardaki pestisit kalıntılarının analizinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin son yıllarda antibiyotik kalıntı analizinde de uygulandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, bu ekstraksiyon işlemi için standart AOAC 2007.01 yöntemi uygulanmıştır. ASE sisteminde ekstraksiyonun yapıldığı standart bir yöntem bulunmamaktadır. Analiz edilecek bileşiklerin fiziksel ve kimyasal yapısına ve özelliklerine bağlı olarak farklı çeşitte analitler için uygulanabilmektedir. Bu çalışmada bebek gıdalarından sülfonamid grubu antibiyotiklerin yüksek verimlilikte ekstraksiyonunun gerçekleşmesi amacıyla ekstraksiyonda kullanılan çözgen bileşimi, sıcaklığı, hacmi (yıkama hacmi ve döngü sayısı) ve matriksle etkileşim süresi (statik süresi) parametreleri optimize edilmiştir. Ekstraksiyonda kullanılacak çözgenin seçiminde analitlerin matriksten ekstrakta yüksek oranda, diğer matriks bileşenlerinin ise en az miktarda geçmesi amaçlanmıştır. Bu durum göz önünde bulundurularak asetonitril %80 ve metanol %20 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. Cihaz parametrelerinin optimizasyonu sonucunda en yüksek verim yıkama hacmi %60, döngü sayısı 3 ve statik süresi 5 dk değerlerinde elde edilmiştir.

Ekstrakte edilen analitler tek bir enjeksiyon ile 10 dk (6 dk analitlerin tespiti-4 dk kolon yıkama ve şartlandırma) içerisinde tespit edilmiştir. Kütle spektrometresinde analitlerin miktar tayini için doğru sonuçların elde edilmesi amacıyla sıvı kromatografisi kısmında düzgün pik şeklini ve yeterli sinyal büyüklüğünü sağlayan bir metot geliştirilmiştir. Metot geliştirme aşamasında hareketli fazın akış hızı, kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi parametreleri açısından en uygun koşullar belirlenmiştir. Bu çalışmada en iyi analiz koşulu olarak akış hızı 0,5 mL/dk, kolon sıcaklığı 30 °C ve enjeksiyon hacmi 5 µL seçilmiştir.

Kütle spektrometresinde ise analit miktarlarının yüksek seçicilikte ve hassasiyette tespit edilebilmesi için cihaz parametreleri optimize edilmiştir. Analitlerin HR/MS cihazının, LC-MS/MS cihazına göre en büyük avantajlarından bir tanesi bu cihazda kuadropol sistemlerde olduğu gibi analitlerin çarpışma enerjilerinin (CE) bilinmesine veya analitlerin MS'e enjekte edilerek bu değerlerin bulunmasına gerek olmamasıdır. Çünkü HR/MS cihazında analitler parçalanmadan iyonlaştırılarak (M+H)

tam kütlesi üzerinden tespit edilmektedir. Analitlerin tespiti ve miktarının belirlenmesi 100000 kütle çözünürlüğünde ve 5 ppm kütle toleransında yapılmıştır. Bu değerler analizin yüksek seçilimde ve doğrulukta yapıldığının göstergesidir. ESI kısmında analitlerin iyonlaşmasını ve oluşan iyonların kütle analizörüne iletimini sağlayan parametrelerin optimizasyonu sonucunda analitlerden MS’de en iyi yanıtın, sheath ve auxiliary gazların akış hızları sırasıyla 40 ve 10, kapiler ve heater sıcaklıkları sırasıyla 250 °C ve 350 °C ve spray voltajı değeri 4 kV olduğu durumda alındığı belirlenmiştir.

Geliştirilen analiz yönteminin güvenilirliğini ve tutarlılığını test etmek amacıyla metot validasyonu çalışması gerçekleştirilmiştir. Bunun için 3 farklı matrikste (bebek sütü, ek gıda ve et içeren mamalar) 3 farklı konsantrasyonda (0.5, 1 ve 2.5 µg/kg) ve 3 farklı günde 6 tekrarlı geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar 2 farklı ekstraksiyon yönteminde uygulanmıştır. Bu çalışmada 3 farklı matrikste tüm analitlerin matriks uyumlu kalibrasyon ile elde edilen korelasyon katsayılarının karesi 0,999’un üzerinde elde edilmiştir. Ekstraksiyon veriminin belirlenmesi amacıyla yapılan geri kazanım çalışmalarında, QuEChERS yöntemi ile analitlerin en fazla %85,9’u ekstrakte edilebilirken, ASE sisteminde bu oran %96,6’ya çıkmıştır. Ayrıca ASE sistemi ile elde edilen verilerin bağlı standart sapmasının, QuEChERS yöntemi ile elde edilenden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bağlı standart sapmanın düşük olması, ASE yöntemiyle elde edilen verilerin daha doğru ve kesin olduğunu ifade etmektedir. Validasyon çalışması sonucunda analitlerin LOQ değerleri 0,1-0,5 µg/kg aralığında tespit edilmiştir. LOQ değerinin düşük olması, cihazın performansının eser miktarda analitlerin tespiti ve miktarının belirlenmesi açısından uygun olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile bebek gıdalarında eser miktarda bulunan sülfonamid grubu antibiyotiklerin ve metabolitlerinin hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonu ile yüksek oranda matriksten alınması sağlanmıştır ve analitlerin analizi yüksek seçicilik, doğruluk ve kesinlikte gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen analiz metodu kullanılarak 47 tane bebek mamasında yapılan analiz sonuçlarına göre örneklerin sülfonamid grubu antibiyotik kalıntılarını ve metabolitlerini içermediği tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- ABDALLAH, H., ARNAUDGUILHEM, C., JABER, F. and LOBINSKI, R. 2014. Multiresidue analysis of 22 sulfonamides and their metabolites in animal tissues using quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and high resolution mass spectrometry (hybrid linear iontrap-Orbitrap). *Journal of Chromatography A*, 1355: 61-72.
- AGUILERA, J.M. 2003. Solid-liquid extraction. In: C. Tzia G. Liadakis (Editors), *Extraction Optimization in Food Engineering*, Marcel Dekker, pp.52-72, Basel, Switzerland.
- AGUILERA-LUIZ, M.M., MARTÍNEZ VIDAL, J.L., ROMERO-GONZÁLEZ, R. and FRENICH, A.G. 2008. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1205: 10-16.
- AGUILERA-LUIZ, M.M., MARTÍNEZ VIDAL, J.L., ROMERO-GONZÁLEZ, R. and FRENICH, A.G. 2012. Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 132: 2171-2180.
- AGUILERA-LUIZ, M.M., ROMERO-GONZÁLEZ, R., PLAZA-BOLAÑOS, P., MARTÍNEZ VIDAL, J.L. and FRENICH, A.G. 2013. Rapid and semiautomated method for the analysis of veterinary drug residues in honey based on turbulent-flow liquid chromatography coupled to ultrahigh-performance liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry (TFC-UHPLC-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*, 141: 829-839.
- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D. and SCHENCK, F.J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal Of AOAC International*, 86: 412- 431.
- ANONİM. 2012. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği.
- ANONYMOUS. 2002. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC).
- ANONYMOUS. 2007. Commission Regulation 1353/2007/EC of 20 November, amending Council Regulation 2377/90/EC laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Official Journal of the European Union L 303.

- ANONYMOUS. 2009a. Exactive™ Operating Manual. Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany.
- ANONYMOUS. 2009b. Exactive™ QuickStart Guide. Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany.
- ANONYMOUS. 2010a. Council Regulation No. 37/2010, On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, Official Journal of the European Communities L 15.
- ANONYMOUS. 2010b. Accela LC System getting connected guide. Thermo Fisher Scientific, United State.
- ANONYMOUS. 2011. Dionex ASE 350 Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual. Thermo Fisher Scientific, United State.
- ANONYMOUS. 2013. Thermo Scientific Hypersil GOLD HPLC Columns, Phase Overview. Thermo Fisher Scientific, United State.
- ANONYMOUS. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A laboratory guide to method validation and related topics, In: B. Magnusson U. Örnemark (Editors), www.eurachem.org
- ANONYMOUS. 2015. <http://www.trc-canada.com/>
- AOAC. 2007. AOAC Official Method 2007.01. Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. http://www.weber.hu/PDFs/QuEChERS/AOAC_2007_01.pdf
- ARAUJO, P. 2009. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877: 2224-2234.
- ARDREY, R.E. 2003. Mass spectrometry. In: D.J. Ando (Editor), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: an introduction*, Wiley, pp.131-173, England.
- BACHMANN, K. 2009. Drug metabolism. In: M. Hacker K. Bachmann W. Messer (Editors), *Pharmacology: Principles and Practice*, Elsevier, pp.131-173, London, UK.
- BALIZS, G. and HEWITT, A. 2003. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 492: 105-131.
- BANERJEE, S. and MAZUMDAR, S. 2012. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012:1-40.

- BARAN, W., ADAMEK, E., ZIEMIAŃSKA, J. and SOBCZAK, A. 2011. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials*, 196: 1-15.
- BATEMAN, K.P., KELLMANN, M., MUENSTER, H., PAPP, R. and TAYLOR, L. 2009. Quantitative-qualitative data acquisition using a benchtop orbitrap mass spectrometer. *American Society for Mass Spectrometry*, 20:1441-1450.
- BERKEL, G.J.V. and KERTESZ, V. 2007. Using the electrochemistry of the electrospray ion source. *Analytical Chemistry*, 79: 5510-5520.
- BIAŁK-BIELIŃSKA, A., KUMIRSKA, J., PALAVINSKAS, R. and STEPNOWSKI, P. 2009. Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC-MS/MS. *Talanta*, 80: 947-953.
- BLASCO, C. and PICÓ, Y. 2007. Liquid-chromatography-mass spectrometry. In: Y. Picó (Editor), *Food Toxicants Analysis*, Elsevier, pp.509-559, London, UK.
- BOTSOGLU, N.A. and FLETOURIS, D.J. 2001a. Antibacterial drugs. In: N.A. Botsoglou D.J. Fletouris (Editors), *Drug Residues in Food: Pharmacology, Food Safety, and Analysis*, Marcel Dekker, pp.27-103, Basel, Switzerland.
- BOTSOGLU, N.A. and FLETOURIS, D.J. 2001b. Some pharmacokinetic considerations. In: N.A. Botsoglou D.J. Fletouris (Editors), *Drug Residues in Food: Pharmacology, Food Safety, and Analysis*, Marcel Dekker, pp.11-24, Basel, Switzerland.
- BOURDAT-DESCHAMPS, M., LEANG, S., BERNET, N., DAUDIN, J.J. and NÉLIEU, S. 2014. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction–ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction. *Journal of Chromatography A*, 1349: 11-23.
- BÖKMAN, C.F. 2002. Analytical aspects of atmospheric pressure ionisation in mass spectrometry. Ph.D. Thesis, Uppsala University, 46p.
- BRINKMALM, A. and BRINKMALM, G. 2009. A mass spectrometer's building blocks. In: R. Ekman J. Silberring A. Westman-Brinkmalm A. Kraj (Editors), *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*, Wiley, pp.15-88, Canada.
- BRUZZONITI, M.C., CHECCHINI, L., DE CARLO, R.M., ORLANDINI, S., RIVOIRA, L. and DEL BUBBA, M. 2014. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406: 4089-4116.

- BULDINI, P.L., RICCI, L. and SHARMA, J.L. 2002. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 975: 47-70.
- BUSCH, K.L. 2000. Mass spectrometry. In: I. Wilson C. Poole M. Cooke (Editors), *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, pp. 174-189, San Diego, CA.
- CAI, Z., ZHANG, Y., PAN, H., TIE, X. and REN, Y. 2008. Simultaneous determination of 24 sulfonamide residues in meat by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1200: 144-155.
- CARABIAS-MARTÍNEZ, R., RODRÍGUEZ-GONZALO, E., REVILLA-RUIZ, P. and HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. 2005. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A*, 1089: 1-17.
- CARDA-BROCH, S. and BERTHOD, A. 2004. Countercurrent chromatography for the measurement of the hydrophobicity of sulfonamides amphoteric compounds. *Chromatographia*, 59: 79-87.
- CAVALIERE, C., CURINI, R., DI CORCIA, A., NAZARI, M. and SAMPERI, R. 2003. A simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and egg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 558-566.
- CECH, N.B. and ENKE, C.G. 2001. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization Fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, 20: 362-387.
- CEPURNIEKS, G., RJABOVA, J., ZACS, D. and BARTKEVICS, V. 2015. The development and validation of a rapid method for the determination of antimicrobial agent residues in milk and meat using ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102: 184-192.
- CHÁFER-PERICÁS, C., MAQUIEIRA, A. and PUCHADES, R. 2010. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29: 1038-1049.
- CHITESCU, C.L., NICOLAU, A.I., CSUMA, A. and MOISOIU, C. 2011. Simultaneous analysis of four sulfonamides in chicken muscle tissue by HPLC. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28: 1013-1020.
- CIELECKA-PIONTEK, J., ZALEWSKI, P., JELIŃSKA, A. and GARBACKI, P. 2013. UHPLC: The greening face of liquid chromatography. *Chromatographia*, 76: 1429-1437.

- COOKS, R.G. 2010. Desorption ionization and spray ionization: connections and progress. In: R.B.Cole (Editor), *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, Wiley, pp. vii-xxi, Canada.
- DASS, C. 2007. Basics of mass spectrometry. In: C. Dass (Editor), *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Wiley, pp. 3-194, Canada.
- DAVIES, J., SPIEGELMAN, G.B. and YIM, G. 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentration. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 445-453.
- DEAN, J.R. 2009. Comparison of extraction methods. In: J.R. Dean (Editor), *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, Wiley, pp. 221-240, United Kingdom.
- DI CORCIA, A. and NAZZARI, M. 2002. Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *Journal of Chromatography A*, 974: 53–89.
- DMITRIENKO, S.G., KOCHUK, E.V., APYARI, V.V., TOLMACHEVA, V.V. and ZOLOTOV, Y.A. 2014. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection-a review. *Analytical Chimica Acta*, 850: 6-25.
- DONG, M.W. 2006. Basic terms and concepts. In: M.W. Dong (Editor), *Modern HPLC for Practicing Scientists*, Wiley, pp. 16-46, New Jersey.
- DUBREIL-CHÉNEAU, E., PIROTAIS, Y., VERDON, E. and HURTAUD-PESSEL, D. 2014. Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring plans: Validation according to European Union Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, 1339: 128-136.
- EL-ANEED, A., COHEN, A. and BANOUB, J. 2009. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44: 210-230.
- EMMERT, J. 2006. Mobile phase additives for LC-MS. Part 1: Acids. www.sigma-aldrich.com.
- EMMERT, J. and LEITNER, A. 2006. Mobile phase additives for LC-MS. Part 3: Neutral salts. www.sigma-aldrich.com.
- EVANS, S. 1990. Detectors. In: J.L. Cole (Editor), *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 61-86, San Diego, CA.
- FONT, G., JUAN-GARCÍA, A. and 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 Chromatography A*, 1159: 233-241.

- FORTI, A.F. and SCORTICHINI, G. 2009. Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 637: 214-219.
- FRENICH, A.G., ROMERO-GONZÁLEZ, R. and AGUILERA-LUIZ, M.M. 2015. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, 63: 158-169.
- GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M.C., BAEZA-BAEZA, J.J. and RAMIS-RAMOS, G. 2015. Reversed phase liquid chromatography. In: J.L. Anderson A. Berthod V.P. Estévez A.M. Stalcup (Editors), *Analytical Separation Science*, Wiley, pp. 159-198, New Jersey.
- GARCÍA-GALÁN, M.J., DÍAZ-CRUZ, M.S. and BARCELÓ, D. 2008. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *Trends in Analytical Chemistry*, 27: 1008-1022.
- GARCÍA-GALÁN, M.J., DIAZ-CRUZ, S. and BARCELÓ, D. 2013. Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1275: 32-40.
- GENTILI, A., PERRET, D., MARCHESE, S., SERGI, M., OLMÍ, C. and CURINI, R. 2004. Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4614-4624.
- GENTILI, A., PERRET, D. and MARCHESE, S. 2005. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 704-733.
- GIERGIELEWICZ-MOŻAJSKA, H., DĄBROWSKI, L. and NAMIEŚNIK, J. 2001. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples-Some aspects of theory and practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31:149-165.
- GÓMEZ-PÉREZ, M.L., PLAZA-BOLAÑOS, P., ROMERO-GONZÁLEZ, R., MARTÍNEZ VIDAL, J.L. and FRENICH, A.G. 2012. Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1248: 130-138.
- GÓMEZ-PÉREZ, M.L., ROMERO-GONZÁLEZ, R., MARTÍNEZ VIDAL, J.L. and FRENICH, A.G. 2015. Analysis of pesticide and veterinary drug residues in

baby food by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 131: 1-7.

GRANELLI, K., ELGERUD, C., LUNDSTRÖM, Å., OHLSSON, A. and SJÖBERG, P. 2009. Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 637: 87-91.

GRANT, G., FRISON, S. and SPORNS, P. 2003. A sensitive method for the detection of sulfamethazine and N⁴-acetylsulfamethazine residues in environmental samples using solid phase immunoextraction coupled with MALDI-TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5367-5375.

GREENLEES, K.J., FRIEDLANDER, L.G. and BOXALL, A. 2012. Antibiotic residues in food and drinking water, and food safety regulations. In: J. Wang J.D. MacNeil J.F. Kay (Editors), *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, Wiley, pp. 111-123, New Jersey.

GREŇ, I. 2012. Microbial transformation of xenobiotics. *CHEMIK*, 66: 835-842.

GUILLARME, D., SCHAPPLER, J., RUDAZ, S. and VEUTHEY, J.L. 2010. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 29: 15-27.

HART-SMITH, G. and BLANKSBY, S.J. 2012. Mass analysis. In: C. Barner-Kowollik T. Gruendling J. Falkenhagen S. Weidner (Editors), *Mass Spectrometry in Polymer Chemistry*, Wiley, pp. 5-32, New Jersey.

HERRERA-HERRERA, A.V., HERNÁNDEZ-BORGES, J., RODRIGUEZ-DELGADO, M.A., HERRERO, M. and CIFUENTES, A. 2011. Determination of quinolone residues in infant and young children powdered milk combining solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218: 7608-7614.

HO, C.S., LAM, C.W.K., CHAN, M.H.M., CHEUNG, R.C.K., LAW, L.K., LIT, L.C.W., NG, K.F., SUEN, M.W.M. and TAI, H.L. 2003. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 24: 3-12.

HOFF, R.B., RÜBENSAM, G., JANK, L., BARRETO, F., PERALBA, M.C.R., PIZZOLATO, T.M., DÍAZ-CRUZ, M.S. and BARCELÓ, D. 2015. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. *Talanta*, 132: 443-450.

HOLČAPEK, M., KOLÁŘOVÁ, L. and NOBILIS, M. 2008. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391: 59-78.

- HU, Q., NOLL, R.J., LI, H., MAKAROV, A., HARDMAN, M. and COOKS, R.G. 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 40: 430-443.
- HUBER, L. 2010. Validation of analytical methods. Agilent Technologies, Germany.
- JANUSSON, E., HESKETH, A.V., BAMFORD, K.L., HATLELID, K., HIGGINS, R. and MCINDOE, J.S. 2015. Spatial effects on electrospray ionization response. *International Journal of Mass Spectrometry*, 388: 1-8.
- JIA, W., CHU, X., LING, Y., HUANG, J. and CHANG, J. 2014. High-throughput screening of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1347: 122-128.
- JOSHI, S. 2002. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28: 795-809.
- JUAN-BORRÁS, M., PERICHE, A., DOMENECH, E. and ESCRICHE, I. 2015. Routine quality control in honey packaging companies as a key to guarantee consumer safety. The case of the presence of sulfonamides analyzed with LC-MS-MS. *Food Control*, 50: 243-249.
- KAKLAMANOS, G., VINCENT, U. and HOLST, C. 2013. Multi-residue method for the detection of veterinary drugs in distillers grains by liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1322: 38-48.
- KANTIANI, L., FARRÉ, M., FREIXEDAS, J.M.G. and BARCELÓ, D. 2010. Development and validation of a pressurised liquid extraction liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry method for β -lactams and sulfonamides in animal feed. *Journal of Chromatography A*, 1217: 4247-4254.
- KAUFMANN, B. and CHRISTEN, P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13: 105-113.
- KAUFMANN, A., BUTCHER, P., MADEN, K. and WIDMER, M. 2008. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1194: 66-79.
- KAUFMANN, A., BUTCHER, P., MADEN, K., WALKER, S. and 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: 86-94.

- KAUFMANN, A., BUTCHER, P., MADEN, K., WALKER, S. and WIDMER, M. 2014. Multi-residue quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and cleanup technique: salting out supported liquid extraction (SOSLE). *Analytica Chimica Acta*, 820: 56-68.
- KAY, J.F. and MACNEIL, J.D. 2012. Method development and method validation. In: J. Wang J.D. MacNeil J.F. Kay (Editors), *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, Wiley, pp. 278-308, New Jersey.
- KEBARLE, P. and VERKERK, U.H. 2010. On the mechanism of electrospray ionization mass spectrometry. In: R.B.Cole (Editor), *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, Wiley, pp. 1-46, Canada.
- KELLMANN, M., MUENSTER, H., ZOMER, P. and MOL, H. 2009. Full scan MS in comprehensive qualitative and quantitative residue analysis in food and feed matrices: how much resolving power is required? *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 20: 1464-1476.
- KINSELLA, B., O'MAHONY, J., MALONE, E., MOLONEY, M., CANTWELL, H., FUREY, A. and DANAHER, M. 2009. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216: 7977-8015.
- KISHIDA, K. and FURUSAWA, N. 2004. Application of shielded column liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their N⁴-acetyl metabolites in milk. *Journal of Chromatography A*, 1028: 175-177.
- KISHIDA, K. and FURUSAWA, N. 2005. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxy/N⁴-acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues, and eggs. *Talanta*, 67: 54-58.
- KISHIDA, K. 2007. Restricted-access media liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their N⁴-acetyl metabolites in eggs. *Food Chemistry*, 101: 281-285.
- KOESUKWIWAT, U., JAYANTA, S. and LEEPIPATPIBOON, N. 2007. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. *Journal of Chromatography A*, 1140: 147-156.
- KOWALSKI, P., PLENIS, A., OLĘDZKA, I. and KONIECZNA, L. 2011. Optimization and validation of the micellar electrokinetic capillary chromatographic method for simultaneous determination of sulfonamide and amphenicol-type drugs in poultry tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54: 160-167.

- KROMIDAS, S. 2000. How critical are temperature changes? In: S. Kromidas (Editor), Practical Problem Solving in HPLC, Wiley, pp. 45-46, New York.
- KROMIDAS, S. 2008. Which mobile phases are compatible with LC-MS? In: S. Kromidas (Editor), More Practical Problem Solving in HPLC, Wiley, pp. 195-196, New York.
- KRONHOLM, J., HARTONEN, K. and RIEKKOLA, M.L. 2007. Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *Trends in Analytical Chemistry*, 26: 396-412.
- KUNG, T., TSAI, C.W., KU, B.C. and WANG, W.H. 2015. A generic and rapid strategy for determining trace multiresidues of sulfonamides in aquatic products by using an improved QuEChERS method and liquid chromatography-electrospray quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 175: 189-196.
- KÜMMERER, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment-A review-Part I, *Chemosphere*, 75: 417-434.
- LAVAGNINI, I., MAGRO, F., SERAGLIA, R. and TRALDI, P. 2006. What instrumental approaches are available. In: I. Lavagnini J.D. MacNeil J.F. Kay (Editors), Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food, Wiley, pp. 111-123, New Jersey.
- LEBEDEV, A.T. 2009. Introduction to mass spectra interpretation. In: R. Ekman J. Silberring A. Westman-Brinkmalm A. Kraj (Editors), Mass Spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications, Wiley, pp. 119-178, New Jersey.
- LEHOTAY, S.J., MASTOVSKA, K. and LIGHTFIELD, A.R. 2005. Use of buffering to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, 88: 615- 629.
- LEHOTAY, S.J., ANASTASSIADES M. and MAJORS, R.E. 2010. The QuEChERS Revolution. <http://www.chromatographyonline.com/quechers-revolution>.
- LI, D.X., GAN, L., BRONJA, A. and SCHMITZ, O.J. 2015. Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Analytica Chimica Acta*, 891: 43-61.
- LI, H., SUN, H., ZHANG, J. and PANG, K. 2013. Highly sensitive and simultaneous determination of sixteen sulphonamide antibiotics, four acetyled metabolites and trimethoprim in meat by rapid resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Control*, 31: 359-365.

- LOPES, R.P., PASSOS, É.E.F., FILHO, J.F.A., VARGAS, E.A., AUGUSTI, D.V. and AUGUSTI, R. 2012. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. *Food Control*, 28: 192-198.
- LU, K.H., CHEN, C.Y. and LEE, M.R. 2007. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 72: 1082-1087.
- LUTHRIA, D., VINJAMOORI, D., NOEL, K. and EZZELL, J. 2004. Accelerated solvent extraction. In: D.L. Luthria (Editor), *Oil Extraction and Analysis: Critical Issues and Competitive Studies*, AOCS, pp. 25-38, Illinois.
- MACHEREY, A.C. and DANSETTE, P.M. 2008. Biotransformations leading to toxic metabolites: chemical aspect. In: C.G.Wermuth (Editor), *The Practice of Medicinal Chemistry*, Elsevier, pp. 674-694, Oxford.
- MAKAROV, A. and SCIGELOVA, M. 2010. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217: 3938-3945.
- MALIK, A.K., BLASCO, C. and PICÓ, Y. 2010. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A*, 1217: 4018-4040.
- MARSHALL, A.G. and HENDRICKSON, C.L. 2008. High resolution mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1: 579-599.
- MANISALI, I., CHEN, D.D.Y. and SCHNEIDER, B.B. 2006. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. *Trends in Analytical Chemistry*, 25: 243-256.
- MENDIOLA, J.A., HERRERO, M., CIFUENTES, A. and IBÁÑEZ, E. 2007. Use of compressed fluids for sample preparation: food applications. *Journal of Chromatography A*, 1152: 234-246.
- MEYER, V.R. 2010. Solvent properties. In: V.R. Meyer (Editor), *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Wiley, pp. 81-89, United Kingdom.
- MOLDOVEANU, S. and DAVID, V. 2015. Solid-phase extraction. In: S. Moldoveanu V. David (Editors), *Modern Sample Preparation for Chromatography*, Elsevier, pp. 191-286, USA.
- NIESSEN, W.M.A. 2006. Mass spectrometry. In: J. Cazes (Editor), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, CRC Press, pp. 23-50, Boca Raton.
- NIETO, A., BORRULL, F., POCURULL, E. and MARCÉ, R.M. 2010. Pressurized liquid extraction: A usefull technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, 29: 752-764.

- NISHA, A.R. 2008. Antibiotic residues-A global health hazard. *Veterinary World*, 1: 375-377.
- NGUYEN, D.T.T., GUILLARME, D., RUDAZ, S. and VEUTHEY, J.L. 2006. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Journal of Separation Science*, 29: 1836-1848.
- NOVÁKOVÁ, L., MATYSOVÁ, L. and SOLICH, P. 2006. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68: 908-918.
- OLSEN, J.V., DE GODOY, L.M.F., LI, G., MACEK, B., MORTENSEN, P., PESCH, R., MAKAROV, A., LANGE, O., HORNING, S. and MANN, M. 2005. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4: 2010-2021.
- OJANPERÄ, I., KOLMONEN, M. and PELANDER, A. 2012. Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403: 1203-1220.
- PAGE, J.S., KELLY, R.T., TANG, K. and SMITH, R.D. 2007. Ionization and transmission efficiency in an electrospray ionization-mass spectrometry interface. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 18: 1582-1590.
- PARKINSON, A., OGILVIE, B.W., BUCKLEY, D.B., KAZMI, F., CZERWINSKI, M. and PARKINSON, O. 2013. Biotransformation of xenobiotics. In: C.D. Klaassen (Editor), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill Education, pp.185-366, New York.
- PAVLOVIĆ, D.M., BABIĆ, S., HORVAT, A.J.M. and KAŠTELAN-MACAN, M. 2007. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry*, 26: 1062-1075.
- PERI-OKONNY, U.L. 2001. Effects of eluent pH and different types of acidic modifiers on the retention and electrospray ionization efficiency of basic analytes in LC-ESI-MS. Ph.D. Thesis, Seton Hall University, 175p.
- PÉREZ, M.L.G., ROMERO-GONZÁLEZ, R., VIDAL, J.L.M. and FRENICH, A.G. 2013. Analysis of veterinary drug residues in cheese by ultra-high-performance LC coupled to triple quadrupole MS/MS. *Journal of Separation Science*, 36: 1223-1230.
- PERRY, R.H., COOKS, R.G., NOLL, R.J. 2008. Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 27: 661-699.
- PETERS, F.T., DRUMMER, O.H. and MUSSHOF, F. 2007. Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165: 216-224.

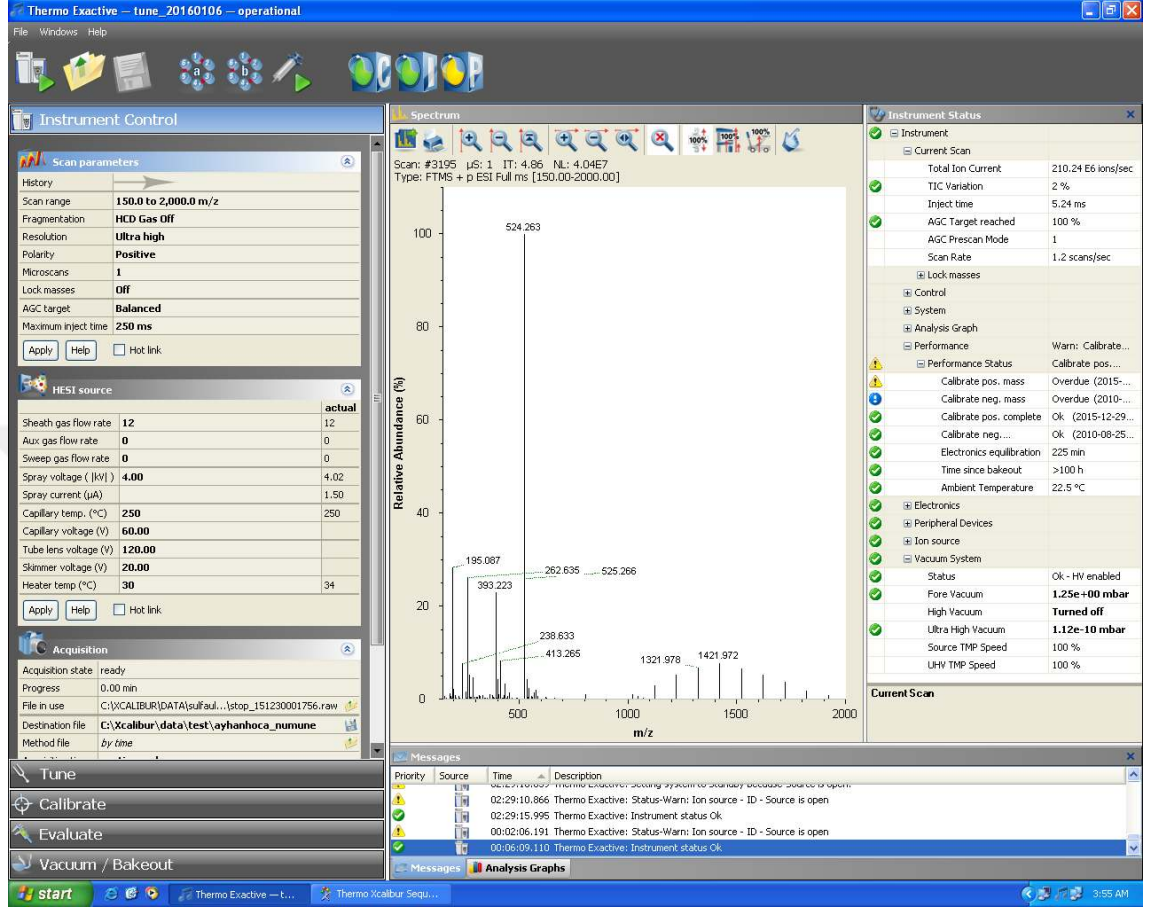
- PRONYK, C. and MAZZA, G. 2009. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. *Journal of Food Engineering*, 95: 215-226.
- RAMOS, L., KRISTENSON, E.M. and BRINKMAN, U.A.Th. 2002. Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975: 3-29.
- REEVES, P.T. 2012. Antibiotics: groups and properties. In: J. Wang J.D. MacNeil J.F. Kay (Editors), *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, Wiley, pp. 1-60, New Jersey.
- RICHTER, B.E., JONES, B.A., EZZELL, J.L., PORTER, N.L., AVDALOVIC, N. and POHL, C. 1996. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68: 1033-1039.
- RIDGWAY, K., LALLJIE, S.P.D. and SMITH, R.M. 2007. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153: 36-53.
- RODRIGUEZ, E., VILLOSLADA, F.N., MORENO-BONDI, M.C. and MARAZUELA, M.D. 2010. Optimization of a pressurized liquid extraction method by experimental design methodologies for the determination of fluoroquinolone residues in infant foods by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217: 605-613.
- ROMERO-GONZÁLEZ, R., AGUILERA-LUIZ, M.M., PLAZA-BOLAÑOS, P., FRENICH, A.G. and MARTÍNEZ VIDAL, J.L. 2011. Food contaminant analysis at high resolution mass spectrometry: application for the determination of veterinary drugs in milk. *Journal of Chromatography A*, 1218: 9353-9365.
- SAKAI, J.B. 2014. Pharmacokinetics: absorption, distribution, and excretion of drugs. In: J.B. Sakai (Editor), *Practical Pharmacology for the Pharmacy Technician*, Content Technologies, pp. 27-40.
- SAMANIDOU, V.F., TOLIKA, E.P. and PAPADOYANNIS, I.N. 2008. Chromatographic residue analysis of sulfonamides in foodstuffs of animal origin. *Separation and Purification Reviews*, 37: 325-371.
- SCHANTZ, M.M. 2006. Pressurized liquid extraction in environmental analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386: 1043-1047.
- SCIGELOVA, M. and MAKAROV, A. 2009. Advances in bioanalytical LC-MS using the OrbitrapTM mass analyzer. *Bioanalysis*, 1: 741-754.
- SCIGELOVA, M., HORNSHAW, M., GIANNAKOPOULOS, A. and MAKAROV, A. 2011. Fourier transform mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10: 1-19.

- SHE, Y., LIU, J., WANG, J., LIU, Y., WANG, R. and CAO, W. 2010. Determination of sulfonamides in bovine milk by ultra performance liquid chromatography combined with quadrupole mass spectrometry. *Analytical Letters*, 43: 2246-2256.
- SHERIDAN, R., POLICASTRO, B., THOMAS, S. and RICE, D. 2008. Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 3509-3516.
- SMITH, R.M. 2003. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000: 3-27.
- STOLKER, A.A.M. and BRINKMAN, U.A.TH. 2005. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review. *Journal of Chromatography A*, 1067: 15-53.
- STOLKER, A.A.M. and DANAHER, M. 2012. Sample preparation: extraction and clean-up. In: J. Wang J.D. MacNeil J.F. Kay (Editors), *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, Wiley, pp. 125-152, New Jersey.
- SUN, H., GE, X., LV, Y. and WANG, A. 2012. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography A*, 1237: 1-23.
- SUN, H., QI, H. and LI, H. 2013. Development of capillary electrophoretic method combined with accelerated solvent extraction for simultaneous determination of residual sulfonamides and their acetylated metabolites in aquatic products. *Food Analytical Methods*, 6: 1049-1055.
- SWARTZ, M.E. 2005. UPLCTM: An introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28: 1253-1263.
- TAFT, D.R. 2009. Drug excretion. In: M. Hacker K. Bachmann W. Messer (Editors), *Pharmacology: Principles and Practice*, Elsevier, pp.175-199, London, UK.
- TARBIN, J.A., POTTER, R.A., STOLKER, A.A.M. and BERENDSEN, B. 2012. Single-residue quantitative and confirmatory methods. In: J. Wang J.D. MacNeil J.F. Kay (Editors), *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, Wiley, pp. 227-262, New Jersey.
- TAVERNIERS, I., DE LOOSE, M. and BOCKSTAELE, E.V. 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23: 535-552.

- TURNER, C. 2006. Overview of modern extraction techniques for food and agricultural samples. In: C. Turner (Editor), *Modern Extraction Techniques for Food and Agricultural Samples*, American Chemical Society, pp. 3-19, Washington, DC.
- VILLIERS, A., LESTREMAU, F., SZUCS, R., GÉLÉBART, S., DAVID, F. and SANDRA, P. 2006. Evaluation of ultra performance liquid chromatography Part I. Possibilities and limitations. *Journal of Chromatography A*, 1127: 60-69.
- YU, H., TAO, Y., CHEN, D., WANG, Y., HUANG, L., PENG, D., DAI, M., LIU, Z., WANG, X. and YUAN, Z. 2011. Development of a high performance liquid chromatography method and a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method with the pressurized liquid extraction for the quantification and confirmation of sulfonamides in the foods of animal origin. *Journal of Chromatography B*, 879: 2653-2662.
- YU, C and HU, B. 2012. C18-coated stir bar sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for the analysis of sulfonamides in milk and milk powder. *Talanta*, 90: 77-84.
- WANG, S., ZHANG, H.Y., WANG, L., DUAN, Z.J. and KENNEDY, I. 2006. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review. *Food Additives and Contaminants*, 23: 362-384.
- WANG, J. and TURNIPSEED, S.B. 2012. Chemical analysis: quantitative and confirmatory methods. In: J. Wang J.D. MacNeil J.F. Kay (Editors), *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, Wiley, pp. 187-226, New Jersey.
- WESTMAN-BRINKMALM, A. and BRINKMALM, G. 2009. A mass spectrometer's building blocks. In: R. Ekman J. Silberring A. Westman-Brinkmalm A. Kraj (Editors), *Mass Spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications*, Wiley, pp. 15-88, New Jersey.
- WON, S.Y., LEE, C.H., CHANG, H.S., KIM, S.O., LEE, S.H. and KIM, D.S. 2011. Monitoring of 14 sulfonamide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS. *Food Control*, 22: 1101-1107.
- ZHAN, J., ZHONG, Y.Y., YU, X.J., PENG, J.F., CHEN, S., YIN, J.Y., ZHANG, J.J. and ZHU, Y. 2013. Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138: 827-834.

7. EKLER

EK 1. Cihazın ayarlama işlemi yapılırken ekran görüntüsü



EK-2. Bebek sütünde yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS)

n-asetilsülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,358	0,453	0,305	0,725	0,768	0,689	1,964	1,599	1,782
0,352	0,373	0,343	0,846	0,785	0,667	1,835	1,687	1,783
0,341	0,473	0,401	0,889	0,683	0,643	1,734	1,639	1,785
0,431	0,439	0,357	0,772	0,714	0,744	1,640	1,687	1,723
0,378	0,352	0,296	0,776	0,739	0,645	1,953	1,781	1,673
0,442	0,312	0,362	0,831	0,935	0,634	1,682	1,762	1,684
n-asetilsülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,409	0,448	0,291	0,785	0,778	0,718	1,954	1,765	1,915
0,328	0,461	0,332	0,799	0,759	0,696	2,034	1,788	1,756
0,342	0,400	0,300	0,860	0,829	0,718	1,704	1,749	1,868
0,386	0,363	0,344	0,858	0,750	0,673	1,909	1,768	1,795
0,420	0,435	0,375	0,763	0,801	0,723	1,760	1,795	1,711
0,381	0,426	0,303	0,974	0,903	0,742	1,968	1,703	1,719
n-asetilsülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,401	0,474	0,398	0,760	0,812	0,704	2,160	1,763	1,698
0,450	0,498	0,373	0,830	0,797	0,682	2,078	1,821	1,658
0,477	0,367	0,424	0,843	0,825	0,693	2,070	1,775	1,868
0,482	0,474	0,369	0,913	0,731	0,646	1,945	1,784	1,688
0,391	0,489	0,401	0,898	0,821	0,724	1,912	1,731	1,636
0,446	0,482	0,337	0,902	0,913	0,820	1,937	1,738	1,672
n-asetilsülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,378	0,497	0,354	0,880	0,822	0,734	1,903	1,725	1,810
0,324	0,392	0,289	0,779	0,694	0,743	2,110	1,610	1,861
0,396	0,342	0,335	0,938	0,701	0,600	1,985	1,717	1,647
0,466	0,338	0,275	0,817	0,801	0,598	1,824	1,592	1,810
0,470	0,452	0,334	0,965	0,805	0,613	1,861	1,744	1,600
0,478	0,354	0,269	0,883	0,798	0,687	1,924	1,721	1,648
n-asetilsülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,331	0,337	0,269	0,775	0,764	0,613	2,022	1,665	1,779
0,379	0,424	0,294	0,751	0,773	0,757	1,916	1,636	1,815
0,382	0,390	0,345	0,703	0,861	0,591	1,857	1,658	1,652
0,404	0,391	0,316	0,761	0,823	0,655	1,842	1,617	1,721
0,426	0,394	0,318	0,858	0,790	0,670	1,929	1,681	1,716
0,388	0,355	0,289	0,811	0,783	0,705	1,958	1,628	1,689

EK-2. Bebek sütünde yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

sülfakloropiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,363	0,320	0,253	0,834	0,691	0,550	1,963	1,662	1,584
0,342	0,284	0,266	0,790	0,698	0,627	1,994	1,784	1,668
0,377	0,285	0,257	0,743	0,734	0,676	1,725	1,690	1,624
0,400	0,288	0,289	0,787	0,673	0,607	1,772	1,866	1,614
0,400	0,345	0,292	0,929	0,720	0,585	2,012	1,730	1,584
0,397	0,306	0,328	0,816	0,643	0,586	1,880	1,648	1,646
sülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,382	0,347	0,301	0,686	0,693	0,673	2,193	1,624	1,853
0,328	0,403	0,363	0,788	0,678	0,605	1,959	1,676	1,985
0,392	0,362	0,279	0,711	0,634	0,614	1,864	1,637	1,838
0,344	0,372	0,259	0,782	0,855	0,628	1,989	1,793	1,839
0,384	0,375	0,271	0,812	0,664	0,617	1,722	1,798	1,570
0,363	0,310	0,317	0,799	0,709	0,671	1,813	1,820	1,589
sülfadimetoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,368	0,320	0,381	0,881	0,644	0,697	2,044	1,731	1,898
0,356	0,363	0,316	0,866	0,705	0,671	1,936	1,735	1,844
0,390	0,409	0,351	0,684	0,718	0,732	1,933	1,692	1,746
0,378	0,365	0,344	0,699	0,631	0,702	1,706	1,708	1,793
0,406	0,433	0,387	0,706	0,716	0,708	1,930	1,882	1,826
0,342	0,423	0,414	0,752	0,762	0,711	1,911	1,682	1,775
sülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,434	0,308	0,316	0,722	0,683	0,695	1,735	1,725	1,876
0,331	0,354	0,417	0,643	0,662	0,833	1,911	1,846	1,940
0,342	0,365	0,305	0,713	0,643	0,627	1,812	1,642	1,954
0,351	0,378	0,303	0,776	0,705	0,644	1,846	1,769	1,912
0,430	0,318	0,328	0,891	0,636	0,722	1,892	1,699	1,674
0,393	0,371	0,357	0,659	0,753	0,611	1,735	1,600	1,795
sülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,389	0,365	0,360	0,663	0,833	0,631	1,828	1,698	2,044
0,372	0,391	0,282	0,733	0,866	0,565	2,068	1,842	1,725
0,411	0,336	0,300	0,636	0,629	0,649	1,932	1,768	1,828
0,288	0,407	0,320	0,715	0,818	0,591	2,022	1,765	1,741
0,289	0,328	0,297	0,768	0,765	0,663	1,812	1,744	1,788
0,430	0,396	0,272	0,806	0,635	0,628	2,025	1,711	1,687

EK-2. Bebek sütünde yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

sülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,458	0,367	0,328	0,706	0,732	0,710	2,241	1,897	1,937
0,430	0,384	0,354	0,878	0,734	0,784	2,303	1,754	1,900
0,401	0,318	0,321	0,904	0,880	0,740	2,121	1,769	2,040
0,389	0,367	0,304	0,814	0,722	0,681	2,004	1,826	1,944
0,464	0,434	0,345	0,897	0,732	0,679	1,970	1,839	1,878
0,458	0,344	0,313	0,939	0,808	0,715	1,804	1,708	1,896
sülfametoksipiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,348	0,303	0,324	0,674	0,705	0,701	1,896	1,985	1,721
0,312	0,338	0,388	0,728	0,675	0,629	1,981	1,907	1,603
0,313	0,317	0,285	0,861	0,642	0,735	1,773	1,856	1,540
0,369	0,422	0,363	0,789	0,637	0,587	1,930	1,885	1,593
0,396	0,322	0,302	0,666	0,721	0,759	1,846	1,821	1,595
0,368	0,410	0,355	0,817	0,710	0,572	1,879	1,898	1,549
sülfamonometoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,374	0,327	0,316	0,681	0,624	0,668	1,807	1,705	1,857
0,358	0,350	0,349	0,708	0,597	0,638	2,000	1,684	1,856
0,310	0,277	0,356	0,788	0,630	0,593	1,847	1,678	1,980
0,427	0,266	0,293	0,722	0,692	0,654	1,762	1,866	1,944
0,425	0,317	0,279	0,827	0,609	0,614	1,834	1,804	1,888
0,339	0,269	0,273	0,718	0,625	0,663	2,052	1,691	1,845
sülfamoksol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,343	0,312	0,280	0,570	0,597	0,553	1,856	1,902	1,842
0,373	0,317	0,303	0,660	0,579	0,636	1,792	1,703	1,835
0,334	0,305	0,354	0,773	0,658	0,533	1,822	1,665	1,864
0,302	0,314	0,345	0,654	0,655	0,586	1,844	1,585	1,883
0,383	0,350	0,291	0,598	0,683	0,685	1,938	1,588	1,583
0,324	0,333	0,320	0,603	0,801	0,629	1,588	1,637	1,495
sülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,394	0,328	0,246	0,699	0,669	0,557	1,969	1,789	1,809
0,315	0,307	0,323	0,665	0,568	0,592	2,047	1,656	2,001
0,344	0,289	0,301	0,726	0,648	0,547	2,052	1,797	1,840
0,343	0,307	0,305	0,773	0,631	0,593	1,906	1,736	1,979
0,371	0,314	0,378	0,782	0,690	0,717	2,056	1,988	1,804
0,435	0,292	0,264	0,741	0,686	0,609	1,802	1,722	1,859

EK-2. Bebek sütünde yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

sülfakinoksalin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,348	0,363	0,305	0,696	0,750	0,654	1,927	1,832	1,726
0,365	0,334	0,323	0,721	0,728	0,692	2,144	1,782	1,697
0,334	0,382	0,307	0,772	0,741	0,674	1,751	1,791	1,620
0,311	0,322	0,343	0,830	0,795	0,572	1,895	1,712	1,730
0,422	0,394	0,297	0,816	0,746	0,694	1,911	1,776	1,599
0,437	0,317	0,282	0,698	0,726	0,586	1,965	1,729	1,605
sülfatiazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,332	0,343	0,249	0,543	0,656	0,586	1,921	1,561	1,746
0,301	0,267	0,305	0,622	0,608	0,685	1,981	1,692	1,571
0,359	0,300	0,243	0,602	0,602	0,591	1,773	1,683	1,657
0,350	0,288	0,313	0,685	0,641	0,582	1,726	1,532	1,679
0,324	0,307	0,317	0,717	0,570	0,629	1,968	1,708	1,577
0,356	0,290	0,335	0,727	0,564	0,628	1,878	1,523	1,664

EK-3. Ek gıdada yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS)

n-asetilsülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,381	0,394	0,351	0,738	0,672	0,612	1,797	1,682	1,755
0,411	0,417	0,341	0,755	0,739	0,729	1,784	1,462	1,777
0,403	0,401	0,340	0,763	0,661	0,556	1,796	1,576	1,597
0,407	0,389	0,283	0,764	0,657	0,648	1,763	1,473	1,584
0,397	0,418	0,282	0,736	0,723	0,641	1,789	1,572	1,802
0,393	0,408	0,279	0,772	0,631	0,617	1,737	1,566	1,758
n-asetilsülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,385	0,442	0,390	0,712	0,787	0,743	1,776	1,979	1,944
0,394	0,417	0,357	0,714	0,817	0,756	1,790	1,594	1,720
0,353	0,370	0,425	0,758	0,765	0,800	1,791	1,588	1,886
0,347	0,425	0,269	0,741	0,666	0,783	1,764	1,624	1,786
0,366	0,450	0,266	0,752	0,720	0,678	1,789	1,592	1,858
0,387	0,370	0,257	0,721	0,630	0,724	1,650	1,643	1,701
n-asetilsülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,437	0,438	0,450	0,839	0,771	0,755	1,936	1,737	1,678
0,424	0,460	0,423	0,896	0,741	0,715	2,070	1,704	1,796
0,440	0,464	0,411	0,938	0,726	0,835	2,045	1,876	1,783
0,457	0,422	0,369	0,893	0,698	0,740	1,899	1,985	1,927
0,450	0,484	0,362	0,873	0,718	0,656	2,007	1,678	1,784
0,450	0,410	0,374	0,852	0,764	0,829	1,929	1,929	1,808
n-asetilsülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,402	0,380	0,339	0,727	0,657	0,605	1,705	1,837	1,766
0,403	0,430	0,346	0,751	0,753	0,639	1,727	1,666	1,685
0,397	0,415	0,312	0,757	0,668	0,598	1,757	1,806	1,571
0,407	0,324	0,284	0,751	0,680	0,659	1,709	1,624	1,585
0,413	0,363	0,279	0,741	0,781	0,664	1,719	1,677	1,553
0,363	0,422	0,272	0,743	0,790	0,622	1,615	1,826	1,779
n-asetilsülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,391	0,387	0,307	0,716	0,693	0,704	1,695	1,719	1,754
0,374	0,313	0,296	0,718	0,753	0,700	1,646	1,581	1,649
0,392	0,394	0,285	0,750	0,655	0,628	1,616	1,761	1,790
0,434	0,371	0,402	0,734	0,746	0,625	1,681	1,667	1,875
0,443	0,399	0,346	0,723	0,758	0,733	1,694	1,630	1,779
0,450	0,307	0,297	0,752	0,661	0,676	1,677	1,804	1,616

EK-3. Ek gıdada yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

sülfakloropiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,324	0,309	0,336	0,571	0,660	0,753	1,746	1,685	1,677
0,393	0,337	0,355	0,653	0,752	0,628	1,803	1,667	1,745
0,391	0,266	0,287	0,655	0,786	0,673	1,801	1,744	1,860
0,378	0,293	0,282	0,654	0,642	0,691	1,804	1,734	1,809
0,380	0,343	0,281	0,601	0,701	0,701	1,753	1,815	1,672
0,378	0,338	0,256	0,627	0,795	0,623	1,783	1,696	1,707
sülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,382	0,340	0,270	0,694	0,609	0,575	1,818	1,578	1,683
0,388	0,394	0,302	0,647	0,558	0,592	1,847	1,561	1,889
0,377	0,307	0,329	0,650	0,670	0,527	1,805	1,822	1,543
0,358	0,346	0,286	0,686	0,586	0,695	1,881	1,812	1,854
0,419	0,393	0,273	0,660	0,612	0,627	1,862	1,726	1,811
0,406	0,353	0,334	0,672	0,556	0,707	1,884	1,713	1,802
sülfadimetoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,395	0,390	0,357	0,833	0,714	0,815	1,865	1,701	1,923
0,401	0,391	0,350	0,820	0,632	0,704	1,941	1,709	1,732
0,427	0,378	0,329	0,896	0,774	0,780	1,964	1,714	1,833
0,447	0,393	0,397	0,898	0,749	0,700	1,859	1,691	1,847
0,418	0,355	0,403	0,827	0,638	0,875	1,958	1,719	1,774
0,443	0,328	0,447	0,889	0,753	0,798	1,881	1,713	1,832
sülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,405	0,406	0,303	0,697	0,685	0,668	1,795	1,639	1,779
0,402	0,414	0,348	0,714	0,685	0,709	1,792	1,594	1,920
0,408	0,347	0,336	0,722	0,697	0,618	1,749	1,734	1,727
0,390	0,329	0,288	0,702	0,692	0,657	1,747	1,580	1,831
0,405	0,424	0,271	0,729	0,662	0,643	1,744	1,737	1,636
0,387	0,355	0,270	0,714	0,704	0,699	1,751	1,561	1,688
sülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,383	0,356	0,325	0,702	0,683	0,562	1,862	1,584	1,642
0,391	0,350	0,326	0,697	0,624	0,738	1,885	1,614	1,829
0,392	0,387	0,341	0,705	0,606	0,589	1,827	1,770	1,855
0,407	0,378	0,275	0,703	0,686	0,610	1,847	1,640	1,782
0,371	0,401	0,266	0,694	0,761	0,613	1,876	1,803	1,590
0,367	0,331	0,264	0,664	0,741	0,625	1,840	1,752	1,736

EK-3. Ek gıdada yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

sülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,357	0,363	0,310	0,798	0,700	0,658	1,830	1,745	1,906
0,352	0,356	0,319	0,830	0,678	0,718	1,891	1,660	1,814
0,393	0,376	0,358	0,801	0,775	0,669	1,861	1,899	1,803
0,409	0,337	0,379	0,744	0,633	0,606	1,822	1,805	1,801
0,394	0,418	0,292	0,733	0,740	0,747	1,781	1,908	1,980
0,412	0,350	0,274	0,834	0,687	0,675	1,898	1,888	1,876
sülfametoksipiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,357	0,345	0,299	0,704	0,569	0,649	1,737	1,895	1,894
0,381	0,341	0,239	0,696	0,695	0,634	1,732	1,636	1,587
0,384	0,267	0,298	0,721	0,666	0,618	1,680	1,734	1,531
0,356	0,277	0,310	0,681	0,751	0,677	1,737	1,594	1,594
0,393	0,315	0,262	0,625	0,761	0,621	1,699	1,713	1,649
0,393	0,281	0,308	0,591	0,607	0,609	1,743	1,665	1,744
sülfamonometoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,365	0,353	0,289	0,681	0,615	0,591	1,815	1,681	1,632
0,408	0,296	0,282	0,668	0,632	0,573	1,781	1,690	1,711
0,375	0,281	0,304	0,662	0,658	0,616	1,787	1,581	1,716
0,380	0,297	0,304	0,663	0,678	0,612	1,817	1,686	1,682
0,394	0,312	0,282	0,694	0,598	0,685	1,713	1,549	1,552
0,397	0,302	0,276	0,655	0,712	0,650	1,804	1,573	1,659
sülfamoksol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,358	0,344	0,253	0,636	0,540	0,627	1,498	1,476	1,592
0,353	0,302	0,294	0,641	0,589	0,710	1,497	1,449	1,767
0,311	0,247	0,253	0,642	0,618	0,712	1,472	1,585	1,778
0,365	0,295	0,226	0,663	0,574	0,574	1,414	1,685	1,712
0,366	0,397	0,244	0,635	0,724	0,686	1,491	1,698	1,694
0,321	0,263	0,291	0,621	0,659	0,768	1,495	1,558	1,592
sülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,389	0,309	0,307	0,689	0,609	0,538	1,631	1,513	1,820
0,322	0,299	0,233	0,727	0,656	0,667	1,662	1,582	1,643
0,384	0,337	0,272	0,720	0,597	0,607	1,696	1,523	1,702
0,411	0,393	0,328	0,750	0,672	0,657	1,624	1,637	1,847
0,404	0,341	0,268	0,692	0,616	0,533	1,673	1,464	1,811
0,326	0,283	0,243	0,751	0,614	0,520	1,641	1,493	1,722

EK-3. Ek gıdada yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

sülfakinoksalin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,400	0,406	0,336	0,712	0,697	0,648	1,849	1,871	1,875
0,385	0,328	0,361	0,735	0,680	0,610	1,852	1,684	1,700
0,398	0,349	0,307	0,772	0,712	0,642	1,864	1,850	1,768
0,388	0,329	0,329	0,745	0,636	0,673	1,884	1,621	1,773
0,394	0,337	0,278	0,785	0,655	0,691	1,892	1,667	1,827
0,403	0,353	0,300	0,715	0,652	0,673	1,932	1,667	1,790
sülfatiazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,288	0,291	0,270	0,679	0,548	0,599	1,560	1,750	1,868
0,383	0,310	0,311	0,696	0,570	0,606	1,744	1,500	1,491
0,278	0,329	0,259	0,670	0,546	0,646	1,798	1,613	1,571
0,352	0,294	0,320	0,628	0,583	0,569	1,741	1,722	1,563
0,402	0,326	0,297	0,615	0,608	0,639	1,794	1,507	1,725
0,366	0,269	0,289	0,600	0,619	0,639	1,725	1,433	1,900

EK-4. Et içeren mamalarda yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS)

n-asetilsülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,381	0,371	0,361	0,755	0,720	0,649	1,831	1,709	1,849
0,411	0,350	0,378	0,854	0,713	0,684	1,722	1,773	1,766
0,403	0,348	0,382	0,800	0,709	0,701	1,752	1,769	1,727
0,407	0,329	0,381	0,779	0,667	0,717	1,823	1,749	1,644
0,397	0,393	0,324	0,781	0,675	0,759	1,773	1,753	1,734
0,393	0,328	0,335	0,747	0,746	0,758	1,614	1,739	1,797
n-asetilsülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,385	0,350	0,318	0,787	0,814	0,747	1,761	1,904	1,864
0,394	0,348	0,399	0,814	0,706	0,745	1,816	1,994	1,898
0,353	0,326	0,358	0,817	0,738	0,746	1,831	1,906	1,974
0,347	0,304	0,390	0,738	0,725	0,817	1,907	1,967	1,793
0,366	0,327	0,356	0,734	0,859	0,724	1,871	1,931	1,904
0,387	0,337	0,324	0,839	0,704	0,764	1,747	1,995	2,014
n-asetilsülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,419	0,369	0,357	0,790	0,777	0,728	1,815	1,943	1,794
0,341	0,384	0,333	0,833	0,683	0,767	1,754	1,917	1,873
0,331	0,380	0,388	0,806	0,714	0,790	1,762	1,904	1,846
0,360	0,346	0,404	0,757	0,755	0,774	1,814	1,867	1,763
0,414	0,360	0,383	0,711	0,733	0,756	1,957	1,803	1,871
0,469	0,351	0,374	0,754	0,765	0,776	1,728	1,833	1,921
n-asetilsülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,402	0,362	0,374	0,832	0,799	0,774	1,965	1,984	2,022
0,403	0,348	0,373	0,835	0,788	0,695	1,849	1,858	2,142
0,397	0,345	0,358	0,831	0,808	0,725	1,899	1,907	1,793
0,407	0,410	0,396	0,750	0,759	0,760	2,022	1,929	1,847
0,413	0,344	0,360	0,821	0,772	0,698	2,000	1,887	1,771
0,363	0,365	0,392	0,766	0,742	0,773	1,815	1,980	1,880
n-asetilsülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,369	0,414	0,387	0,782	0,777	0,721	1,883	1,976	1,737
0,337	0,412	0,399	0,743	0,734	0,727	1,731	1,920	1,571
0,419	0,348	0,423	0,662	0,769	0,749	1,805	1,969	1,552
0,433	0,371	0,366	0,668	0,834	0,683	1,683	2,064	1,749
0,393	0,392	0,394	0,721	0,727	0,672	1,786	2,022	1,710
0,437	0,385	0,419	0,722	0,834	0,773	1,714	1,939	1,594

EK-4. Et içeren mamalarda yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

sülfakloropiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,365	0,322	0,345	0,820	0,840	0,641	1,903	2,030	1,899
0,394	0,351	0,355	0,811	0,824	0,634	1,759	2,054	1,948
0,391	0,440	0,337	0,709	0,868	0,690	1,888	2,063	1,704
0,421	0,433	0,377	0,748	0,936	0,643	1,898	2,060	1,904
0,380	0,425	0,300	0,768	0,772	0,713	1,951	2,090	2,033
0,378	0,347	0,346	0,900	0,711	0,729	1,729	1,986	1,877
sülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,388	0,333	0,346	0,799	0,688	0,775	2,067	1,963	2,012
0,412	0,365	0,361	0,757	0,760	0,717	1,778	2,081	1,910
0,365	0,375	0,375	0,698	0,679	0,732	1,826	2,000	1,926
0,411	0,316	0,372	0,657	0,714	0,795	2,016	1,997	1,720
0,383	0,379	0,327	0,666	0,702	0,787	2,023	1,939	1,659
0,419	0,384	0,330	0,759	0,742	0,817	1,707	1,909	2,037
sülfadimetoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,407	0,419	0,399	0,811	0,844	0,876	2,016	1,886	2,069
0,429	0,405	0,386	0,719	0,820	0,754	1,739	1,845	2,095
0,448	0,416	0,330	0,730	0,840	0,860	1,810	2,012	2,151
0,439	0,377	0,391	0,721	0,842	0,877	1,792	1,878	1,803
0,422	0,373	0,411	0,770	0,862	0,790	1,832	1,999	2,081
0,465	0,396	0,412	0,737	0,899	0,804	1,729	1,922	1,941
sülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,426	0,365	0,389	0,809	0,839	0,837	1,952	1,926	2,217
0,425	0,382	0,374	0,900	0,769	0,886	1,759	1,987	2,019
0,438	0,392	0,406	0,820	0,769	0,839	2,002	2,094	2,107
0,429	0,368	0,364	0,844	0,797	0,795	2,035	2,030	1,755
0,405	0,353	0,370	0,762	0,718	0,873	2,052	1,985	2,148
0,387	0,373	0,380	0,714	0,749	0,797	1,738	1,967	2,078
sülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,383	0,342	0,360	0,733	0,800	0,799	1,815	2,103	2,052
0,391	0,397	0,411	0,712	0,766	0,824	1,881	2,017	2,015
0,392	0,353	0,341	0,725	0,778	0,780	1,698	2,022	1,954
0,407	0,334	0,399	0,739	0,796	0,753	1,939	2,089	1,707
0,371	0,363	0,329	0,693	0,768	0,810	1,741	2,055	1,914
0,380	0,368	0,338	0,824	0,832	0,808	1,674	1,944	1,913

EK-4. Et içeren mamalarda yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

sülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,357	0,323	0,369	0,846	0,831	0,794	2,069	2,003	2,248
0,424	0,395	0,383	0,903	0,763	0,866	1,881	1,982	2,190
0,393	0,348	0,424	0,812	0,802	0,775	1,974	2,117	2,127
0,409	0,386	0,357	0,775	0,815	0,860	2,014	1,922	1,781
0,394	0,378	0,391	0,746	0,766	0,841	2,194	2,046	1,968
0,412	0,414	0,330	0,788	0,743	0,784	1,781	2,070	2,079
sülfametoksipiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,357	0,377	0,368	0,876	0,832	0,783	2,019	1,969	1,847
0,381	0,414	0,346	0,768	0,765	0,774	1,825	1,945	1,794
0,384	0,376	0,368	0,814	0,836	0,730	1,928	1,934	1,995
0,356	0,384	0,348	0,755	0,808	0,717	1,780	1,996	1,565
0,348	0,363	0,370	0,834	0,775	0,781	1,883	1,833	1,866
0,393	0,404	0,330	0,752	0,874	0,665	1,712	1,894	1,921
sülfamonometoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,360	0,360	0,433	0,737	0,800	0,901	1,939	2,026	2,200
0,391	0,366	0,382	0,750	0,767	0,881	1,888	1,947	2,239
0,412	0,345	0,368	0,843	0,815	0,875	1,968	2,032	2,230
0,398	0,362	0,402	0,756	0,775	0,902	2,067	2,035	1,943
0,417	0,387	0,394	0,728	0,741	0,895	1,960	2,018	2,262
0,439	0,392	0,381	0,798	0,691	0,923	1,767	1,970	2,219
sülfamoksol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,358	0,411	0,319	0,735	0,796	0,673	2,089	2,136	1,981
0,353	0,335	0,338	0,807	0,713	0,748	1,893	1,993	1,889
0,311	0,350	0,314	0,826	0,788	0,723	1,901	1,958	1,792
0,398	0,357	0,315	0,713	0,721	0,711	2,091	2,066	1,730
0,366	0,420	0,305	0,708	0,813	0,675	1,933	2,063	1,924
0,321	0,353	0,355	0,756	0,793	0,701	1,833	1,974	1,972
sülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,414	0,341	0,316	0,704	0,866	0,734	1,891	2,100	1,870
0,415	0,403	0,339	0,735	0,719	0,707	1,855	1,999	1,831
0,332	0,383	0,333	0,727	0,748	0,667	1,925	2,051	1,860
0,368	0,325	0,379	0,759	0,722	0,789	1,840	2,045	1,709
0,423	0,362	0,397	0,755	0,769	0,763	1,987	2,012	1,897
0,432	0,320	0,343	0,793	0,805	0,762	1,748	1,958	2,002

EK-4. Et içeren mamalarda yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (QuEChERS) (devamı)

sülfakinoksalin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,407	0,413	0,359	0,890	0,754	0,777	2,030	1,942	2,119
0,394	0,389	0,337	0,907	0,679	0,816	1,768	1,771	2,049
0,379	0,343	0,377	0,861	0,748	0,825	2,024	1,978	1,923
0,367	0,378	0,393	0,810	0,730	0,796	2,111	1,943	1,759
0,395	0,400	0,379	0,808	0,800	0,722	2,076	1,829	2,061
0,421	0,386	0,354	0,866	0,700	0,749	1,807	1,771	1,948
sülfatiazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,426	0,382	0,341	0,693	0,779	0,782	1,873	1,897	2,003
0,405	0,343	0,375	0,722	0,712	0,692	1,825	1,828	1,933
0,430	0,405	0,348	0,734	0,705	0,794	1,743	1,886	1,949
0,391	0,300	0,362	0,748	0,753	0,740	1,800	1,864	1,789
0,310	0,390	0,357	0,729	0,716	0,702	1,921	1,963	1,844
0,328	0,367	0,354	0,729	0,730	0,784	1,766	1,925	1,928

EK-5. Bebek sütünde yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE)

n-asetilsülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,414	0,435	0,412	0,779	0,848	0,898	2,047	2,167	2,348
0,429	0,461	0,420	0,752	0,873	0,895	2,263	2,224	2,236
0,431	0,442	0,381	0,848	0,816	0,932	2,271	2,273	2,178
0,389	0,470	0,436	0,851	0,929	0,894	2,270	2,453	2,275
0,372	0,413	0,423	0,885	0,883	0,858	2,400	2,412	2,387
0,360	0,405	0,450	0,816	0,905	0,894	2,261	2,392	2,462
n-asetilsülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,450	0,449	0,390	0,801	0,745	0,908	2,203	2,381	2,400
0,439	0,448	0,442	0,895	0,891	0,947	2,314	2,023	2,310
0,446	0,487	0,417	0,881	0,918	0,899	2,344	2,384	2,201
0,458	0,420	0,403	0,830	0,834	0,931	2,174	2,420	2,242
0,414	0,418	0,405	0,812	0,847	0,869	2,150	2,388	2,271
0,459	0,381	0,417	0,771	0,867	0,863	2,262	2,369	2,497
n-asetilsülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,466	0,464	0,446	0,924	0,884	0,935	2,341	2,380	2,367
0,420	0,472	0,457	0,950	0,942	0,929	2,306	2,399	2,357
0,455	0,486	0,479	0,971	0,925	0,908	2,447	2,365	2,300
0,472	0,429	0,445	0,861	0,892	0,940	2,337	2,382	2,354
0,465	0,463	0,408	0,928	0,877	0,968	2,326	2,308	2,398
0,487	0,412	0,454	0,980	0,914	0,952	2,244	2,409	2,314
n-asetilsülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,391	0,421	0,405	0,898	0,806	0,851	2,148	2,315	2,290
0,401	0,422	0,401	0,854	0,826	0,840	2,228	2,355	2,254
0,366	0,420	0,380	0,746	0,767	0,921	2,289	2,369	2,237
0,402	0,439	0,385	0,768	0,943	0,953	2,084	2,340	2,257
0,401	0,456	0,389	0,756	0,873	0,931	2,233	2,428	2,351
0,407	0,396	0,414	0,744	0,813	0,896	2,013	2,340	2,438
n-asetilsülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,391	0,439	0,400	0,741	0,825	0,916	2,186	2,267	2,260
0,366	0,433	0,447	0,720	0,864	0,829	2,224	2,231	2,224
0,400	0,379	0,373	0,782	0,778	0,949	2,426	2,303	2,189
0,425	0,360	0,409	0,832	0,749	0,816	2,205	2,342	2,420
0,428	0,378	0,432	0,867	0,853	0,866	2,136	2,339	2,382
0,411	0,422	0,405	0,827	0,876	0,921	2,241	2,284	2,343

EK-5. Bebek sütünde yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE) (devamı)

sülfakloropiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,371	0,391	0,412	0,760	0,930	0,895	2,234	2,337	2,334
0,440	0,409	0,367	0,746	0,723	0,841	2,312	2,385	2,278
0,410	0,452	0,422	0,770	0,770	0,833	2,234	2,370	2,371
0,424	0,378	0,384	0,832	0,854	0,864	2,149	2,494	2,284
0,408	0,389	0,372	0,844	0,815	0,927	2,134	2,343	2,489
0,436	0,391	0,384	0,837	0,874	0,800	2,392	2,230	2,329
sülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,411	0,343	0,414	0,808	0,851	0,970	2,392	2,224	2,357
0,392	0,351	0,415	0,910	0,806	0,858	2,470	2,452	2,379
0,331	0,347	0,445	0,935	0,786	0,896	2,372	2,326	2,381
0,419	0,392	0,443	0,924	0,932	0,859	2,264	2,436	2,177
0,414	0,358	0,384	0,828	0,940	0,893	2,232	2,278	2,394
0,355	0,332	0,340	0,854	0,802	0,827	2,431	2,151	2,149
sülfadimetoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,390	0,398	0,431	0,854	0,845	0,859	2,300	2,359	2,307
0,434	0,423	0,445	0,842	0,945	0,893	2,167	2,240	2,437
0,450	0,452	0,448	0,840	0,861	0,929	2,268	2,357	2,391
0,442	0,430	0,454	0,873	0,913	0,927	2,221	2,409	2,320
0,431	0,442	0,419	0,878	0,841	0,965	2,246	2,340	2,361
0,448	0,413	0,482	0,853	0,904	0,886	2,298	2,238	2,345
sülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,419	0,361	0,365	0,744	0,890	0,858	2,207	2,207	2,415
0,342	0,427	0,451	0,753	0,786	0,979	2,313	2,313	2,394
0,326	0,364	0,385	0,851	0,751	0,870	2,437	2,437	2,270
0,409	0,438	0,441	0,820	0,806	0,894	2,445	2,445	2,278
0,346	0,414	0,403	0,840	0,812	0,841	2,243	2,243	2,420
0,425	0,361	0,331	0,766	0,842	0,837	2,389	2,389	2,419
sülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,415	0,441	0,420	0,788	0,764	0,929	2,261	2,354	2,429
0,406	0,470	0,479	0,798	0,905	0,944	2,198	2,201	2,438
0,444	0,482	0,411	0,844	0,969	0,897	2,426	2,462	2,348
0,445	0,475	0,453	0,795	0,812	0,845	2,229	2,398	2,369
0,419	0,416	0,428	0,835	0,869	0,903	2,168	2,261	2,234
0,429	0,449	0,484	0,877	0,881	0,950	2,248	2,450	2,302

EK-5. Bebek sütünde yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE) (devamı)

sülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,409	0,397	0,370	0,776	0,772	0,879	2,125	2,301	2,249
0,360	0,393	0,443	0,840	0,851	0,921	2,248	2,351	2,418
0,382	0,436	0,403	0,803	0,775	0,889	2,278	2,494	2,242
0,401	0,395	0,418	0,776	0,875	0,911	2,251	2,420	2,395
0,383	0,387	0,387	0,799	0,815	0,959	2,046	2,150	2,438
0,421	0,396	0,419	0,877	0,922	0,886	2,123	2,415	2,298
sülfametoksipiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,415	0,441	0,458	0,798	0,747	0,905	2,206	2,307	2,334
0,415	0,462	0,439	0,813	0,869	0,911	2,051	2,391	2,401
0,414	0,456	0,370	0,807	0,877	0,821	2,203	2,133	2,251
0,424	0,408	0,438	0,824	0,849	0,870	2,168	2,407	2,206
0,420	0,420	0,375	0,764	0,864	0,890	2,216	2,384	2,347
0,459	0,378	0,430	0,843	0,792	0,884	2,277	2,442	2,439
sülfamonometoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,426	0,450	0,456	0,801	0,805	0,976	2,315	2,386	2,417
0,432	0,480	0,423	0,854	0,881	0,939	2,280	2,398	2,358
0,419	0,468	0,447	0,893	0,843	0,860	2,305	2,471	2,379
0,398	0,401	0,464	0,793	0,939	0,914	2,149	2,356	2,376
0,438	0,393	0,439	0,774	0,863	0,933	2,216	2,446	2,344
0,439	0,395	0,420	0,821	0,830	0,829	2,177	2,404	2,431
sülfamoksol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,384	0,424	0,398	0,757	0,723	0,942	2,096	2,295	2,442
0,388	0,435	0,388	0,743	0,897	0,979	2,258	2,334	2,340
0,408	0,397	0,394	0,828	0,750	0,886	2,262	2,297	2,389
0,381	0,374	0,423	0,788	0,809	0,808	2,078	2,368	2,234
0,402	0,359	0,441	0,797	0,781	0,884	2,115	2,411	2,471
0,375	0,358	0,434	0,740	0,812	0,875	2,389	2,338	2,384
sülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,375	0,458	0,351	0,783	0,825	0,978	2,346	2,346	2,384
0,333	0,439	0,376	0,823	0,902	0,954	2,302	2,302	2,304
0,419	0,426	0,412	0,884	0,795	0,818	2,350	2,350	2,326
0,386	0,402	0,371	0,777	0,835	0,976	2,359	2,359	2,386
0,396	0,415	0,483	0,880	0,865	0,927	2,327	2,327	2,246
0,427	0,361	0,493	0,845	0,847	0,878	2,399	2,399	2,410

EK-5. Bebek sütünde yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE) (devamı)

sülfakinoksalin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,451	0,460	0,432	0,762	0,837	0,941	2,286	2,487	2,289
0,477	0,427	0,381	0,860	0,890	0,905	2,284	2,361	2,442
0,455	0,425	0,451	0,863	0,828	0,910	2,449	2,393	2,327
0,463	0,460	0,477	0,899	0,833	0,917	2,040	2,461	2,321
0,475	0,408	0,409	0,780	0,899	0,931	2,355	2,352	2,312
0,470	0,476	0,411	0,869	0,858	0,834	2,101	2,386	2,342
sülfatiazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,379	0,404	0,450	0,690	0,773	0,833	1,924	2,317	2,494
0,395	0,458	0,408	0,829	0,833	0,869	2,146	2,028	2,420
0,334	0,356	0,430	0,723	0,818	0,868	2,143	2,326	2,318
0,339	0,377	0,383	0,758	0,841	0,983	1,977	2,407	2,395
0,343	0,371	0,387	0,744	0,856	0,855	2,081	2,123	2,063
0,405	0,342	0,374	0,681	0,830	0,862	2,014	2,431	2,022

EK-6. Ek gıdada yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE)

n-asetilsülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,493	0,478	0,452	0,878	0,937	0,944	2,318	2,406	2,468
0,446	0,476	0,473	0,942	0,926	0,929	2,280	2,453	2,429
0,474	0,479	0,448	0,902	0,904	0,953	2,380	2,387	2,320
0,412	0,464	0,498	0,924	0,921	0,926	2,279	2,399	2,467
0,475	0,447	0,447	0,943	0,901	0,985	2,236	2,436	2,417
0,463	0,480	0,446	0,962	0,968	0,957	2,230	2,332	2,433
n-asetilsülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,411	0,461	0,450	0,954	0,958	0,950	2,430	2,467	2,466
0,384	0,466	0,464	0,932	0,968	0,983	2,422	2,378	2,393
0,363	0,430	0,437	0,935	0,928	0,935	2,378	2,430	2,311
0,401	0,456	0,485	0,934	0,952	0,917	2,397	2,483	2,326
0,391	0,459	0,446	0,974	0,976	0,972	2,367	2,280	2,453
0,390	0,411	0,427	0,975	0,886	0,983	2,429	2,399	2,458
n-asetilsülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,414	0,463	0,487	0,880	0,952	0,984	2,338	2,437	2,460
0,432	0,427	0,420	0,856	0,913	0,937	2,268	2,478	2,453
0,423	0,442	0,478	0,905	0,921	0,926	2,339	2,405	2,444
0,464	0,456	0,405	0,926	0,984	0,948	2,243	2,374	2,432
0,458	0,472	0,429	0,927	0,950	0,959	2,251	2,470	2,439
0,435	0,479	0,484	0,950	0,976	0,940	2,409	2,430	2,320
n-asetilsülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,455	0,416	0,455	0,877	0,937	0,942	2,299	2,442	2,404
0,468	0,429	0,460	0,863	0,937	0,860	2,152	2,282	2,444
0,460	0,407	0,453	0,874	0,940	0,951	2,205	2,365	2,377
0,390	0,476	0,442	0,910	0,979	0,946	2,239	2,416	2,337
0,424	0,437	0,405	0,928	0,966	0,965	2,338	2,432	2,333
0,433	0,442	0,392	0,912	0,903	0,921	2,374	2,428	2,399
n-asetilsülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,408	0,410	0,433	0,935	0,902	0,857	2,291	2,480	2,459
0,461	0,435	0,477	0,946	0,904	0,948	2,310	2,325	2,469
0,391	0,447	0,460	0,904	0,886	0,984	2,272	2,342	2,441
0,434	0,440	0,447	0,965	0,910	0,950	2,414	2,437	2,443
0,439	0,433	0,407	0,955	0,991	0,969	2,309	2,325	2,453
0,402	0,436	0,449	0,945	0,982	0,941	2,285	2,393	2,465

EK-6. Ek gıdada yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE)
(devamı)

sülfakloropiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,404	0,374	0,428	0,878	0,943	0,936	2,167	2,477	2,409
0,356	0,379	0,451	0,912	0,913	0,955	2,286	2,326	2,426
0,369	0,398	0,457	0,943	0,922	0,946	2,144	2,246	2,449
0,377	0,424	0,434	0,948	0,962	0,961	2,123	2,272	2,472
0,366	0,416	0,439	0,856	0,954	0,942	2,085	2,446	2,372
0,438	0,432	0,434	0,873	0,938	0,969	2,299	2,373	2,396
sülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,396	0,416	0,410	0,889	0,873	0,935	2,348	2,431	2,442
0,377	0,360	0,338	0,910	0,957	0,960	2,442	2,453	2,490
0,468	0,320	0,433	0,894	0,951	0,967	2,265	2,415	2,439
0,403	0,359	0,349	0,907	0,904	0,967	2,446	2,406	2,376
0,398	0,445	0,411	0,907	0,960	0,934	2,340	2,385	2,378
0,341	0,430	0,443	0,913	0,951	0,940	2,428	2,439	2,383
sülfadimetoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,394	0,416	0,425	0,891	0,913	0,921	2,416	2,340	2,470
0,441	0,433	0,449	0,858	0,888	0,876	2,122	2,376	2,411
0,455	0,413	0,446	0,918	0,953	0,939	2,092	2,384	2,373
0,436	0,455	0,486	0,897	0,976	0,937	2,108	2,398	2,381
0,420	0,447	0,445	0,847	0,931	0,924	2,234	2,360	2,280
0,378	0,380	0,486	0,864	0,919	0,956	2,231	2,345	2,453
sülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,379	0,437	0,444	0,962	0,941	0,910	2,429	2,452	2,430
0,410	0,440	0,397	0,925	0,953	0,938	2,416	2,445	2,478
0,366	0,449	0,407	0,932	0,949	0,949	2,194	2,464	2,482
0,442	0,401	0,384	0,950	0,919	0,963	2,405	2,428	2,388
0,394	0,425	0,418	0,938	0,916	0,944	2,355	2,423	2,416
0,411	0,376	0,352	0,955	0,967	0,940	2,352	2,437	2,471
sülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,395	0,403	0,441	0,973	0,925	0,955	2,396	2,479	2,413
0,379	0,438	0,434	0,906	0,942	0,882	2,419	2,457	2,436
0,345	0,414	0,440	0,957	0,979	0,961	2,260	2,185	2,353
0,434	0,420	0,432	0,981	0,962	0,937	2,356	2,423	2,447
0,430	0,396	0,377	0,900	0,985	0,954	2,401	2,343	2,427
0,384	0,432	0,430	0,929	0,937	0,954	2,204	2,264	2,378

EK-6. Ek gıdada yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE)
(devamı)

sülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,397	0,445	0,444	0,832	0,954	0,934	2,375	2,402	2,339
0,418	0,458	0,450	0,877	0,958	0,939	2,312	2,431	2,431
0,378	0,469	0,463	0,855	0,925	0,946	2,355	2,274	2,377
0,380	0,435	0,406	0,901	0,912	0,937	2,357	2,411	2,478
0,424	0,449	0,435	0,905	0,974	0,898	2,377	2,421	2,464
0,427	0,452	0,484	0,922	0,931	0,865	2,410	2,415	2,419
sülfametoksipiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,366	0,387	0,379	0,914	0,918	0,944	2,369	2,417	2,272
0,394	0,425	0,476	0,951	0,972	0,956	2,368	2,238	2,415
0,397	0,420	0,482	0,962	0,942	0,899	2,359	2,426	2,273
0,417	0,394	0,481	0,945	0,946	0,895	2,231	2,286	2,370
0,416	0,480	0,414	0,927	0,954	0,983	2,370	2,463	2,428
0,376	0,440	0,433	0,942	0,888	0,987	2,382	2,466	2,446
sülfamonometoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,418	0,405	0,446	0,922	0,918	0,979	2,484	2,413	2,385
0,397	0,396	0,419	0,931	0,887	0,986	2,432	2,245	2,384
0,419	0,444	0,401	0,907	0,934	0,932	2,334	2,329	2,334
0,424	0,454	0,403	0,903	0,942	0,891	2,292	2,430	2,391
0,385	0,473	0,383	0,889	0,927	0,960	2,443	2,428	2,371
0,389	0,353	0,454	0,938	0,938	0,974	2,376	2,413	2,363
sülfamoksol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,396	0,376	0,412	0,874	0,937	0,899	2,260	2,262	2,474
0,358	0,434	0,410	0,821	0,890	0,929	2,331	2,375	2,420
0,352	0,377	0,456	0,827	0,946	0,941	2,188	2,350	2,332
0,376	0,378	0,450	0,901	0,848	0,935	2,107	2,304	2,435
0,362	0,365	0,468	0,808	0,927	0,947	2,110	2,337	2,350
0,389	0,387	0,394	0,857	0,907	0,965	2,092	2,362	2,344
sülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,381	0,408	0,428	0,944	0,846	0,883	2,433	2,413	2,429
0,367	0,389	0,462	0,948	0,880	0,934	2,345	2,394	2,442
0,423	0,430	0,415	0,938	0,948	0,940	2,344	2,454	2,370
0,448	0,390	0,372	0,935	0,939	0,984	2,408	2,324	2,289
0,456	0,448	0,437	0,972	0,950	0,960	2,416	2,423	2,389
0,362	0,391	0,443	0,982	0,929	0,978	2,352	2,421	2,421

EK-6. Ek gıdada yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE)
(devamı)

sülfakinoksalin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,384	0,421	0,411	0,919	0,924	0,965	2,415	2,366	2,448
0,427	0,472	0,477	0,880	0,936	0,944	2,345	2,429	2,482
0,428	0,433	0,417	0,909	0,974	0,952	2,392	2,373	2,430
0,446	0,413	0,473	0,859	0,962	0,943	2,381	2,351	2,360
0,388	0,425	0,429	0,924	0,943	0,972	2,327	2,379	2,378
0,419	0,448	0,429	0,852	0,874	0,968	2,390	2,442	2,463
sülfatiazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,382	0,396	0,343	0,870	0,848	0,902	2,431	2,367	2,495
0,385	0,440	0,418	0,945	0,957	0,911	2,341	2,362	2,321
0,369	0,417	0,427	0,924	0,952	0,935	2,430	2,405	2,456
0,389	0,398	0,402	0,915	0,891	0,919	2,387	2,306	2,467
0,418	0,437	0,420	0,905	0,954	0,895	2,401	2,406	2,395
0,421	0,431	0,421	0,895	0,889	0,940	2,415	2,410	2,420

EK-7. Et içeren mamalarda yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE)

n-asetilsülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,398	0,427	0,376	0,932	0,886	0,958	2,331	2,338	2,418
0,421	0,466	0,433	0,882	0,948	0,959	2,221	2,019	2,452
0,431	0,424	0,380	0,840	0,788	0,950	2,293	2,333	2,370
0,432	0,451	0,422	0,928	0,910	0,946	2,353	2,315	2,381
0,397	0,480	0,430	0,892	0,873	0,910	2,311	2,303	2,441
0,441	0,415	0,446	0,925	0,914	0,935	2,383	2,390	2,399
n-asetilsülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,398	0,426	0,402	0,827	0,879	0,911	2,338	2,298	2,101
0,410	0,435	0,408	0,860	0,867	0,901	2,295	2,053	2,342
0,402	0,419	0,432	0,914	0,868	0,842	2,369	2,044	2,327
0,437	0,436	0,437	0,837	0,800	0,849	2,355	2,188	2,231
0,385	0,435	0,393	0,873	0,780	0,874	2,402	2,174	2,300
0,384	0,426	0,389	0,825	0,882	0,864	2,203	2,226	2,386
n-asetilsülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,429	0,435	0,443	0,868	0,936	0,945	2,309	2,329	2,335
0,431	0,463	0,423	0,917	0,927	0,906	2,360	2,112	2,457
0,460	0,440	0,452	0,974	0,902	0,888	2,298	2,211	2,290
0,440	0,432	0,435	0,933	0,897	0,921	2,253	2,368	2,198
0,411	0,404	0,439	0,945	0,936	0,955	2,203	2,357	2,419
0,425	0,452	0,454	0,909	0,941	0,969	2,315	2,385	2,339
n-asetilsülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,429	0,398	0,462	0,894	0,926	0,940	2,342	2,415	2,235
0,343	0,430	0,442	0,895	0,923	0,867	2,203	2,182	2,390
0,387	0,473	0,464	0,906	0,882	0,929	2,328	2,241	2,308
0,368	0,407	0,473	0,850	0,895	0,927	2,340	2,298	2,372
0,435	0,415	0,425	0,884	0,930	0,866	2,282	2,439	2,361
0,365	0,446	0,422	0,924	0,874	0,901	2,393	2,179	2,286
n-asetilsülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,372	0,429	0,448	0,812	0,905	0,875	2,035	2,237	2,314
0,415	0,452	0,417	0,884	0,923	0,844	2,263	2,184	2,168
0,406	0,359	0,439	0,866	0,892	0,840	2,088	2,021	2,358
0,372	0,389	0,471	0,870	0,845	0,894	2,128	2,318	2,428
0,398	0,387	0,452	0,885	0,867	0,904	2,198	2,333	2,301
0,378	0,439	0,438	0,917	0,905	0,929	2,036	1,982	2,304

EK-7. Et içeren mamalarda yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE) (devamı)

sülfakloropiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,390	0,361	0,370	0,817	0,811	0,822	2,193	2,254	2,160
0,358	0,416	0,390	0,886	0,879	0,893	2,112	2,024	2,043
0,365	0,377	0,356	0,883	0,883	0,882	2,103	2,065	2,421
0,384	0,349	0,378	0,841	0,881	0,800	2,184	2,040	2,377
0,345	0,355	0,407	0,838	0,832	0,844	2,314	2,325	2,322
0,366	0,415	0,422	0,818	0,779	0,856	2,044	2,137	2,380
sülfadiazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,393	0,347	0,382	0,825	0,835	0,918	2,392	2,377	2,289
0,404	0,342	0,392	0,805	0,904	0,853	2,321	2,367	2,309
0,370	0,381	0,392	0,736	0,905	0,831	2,193	1,971	2,090
0,343	0,366	0,435	0,890	0,936	0,844	2,214	1,960	2,328
0,410	0,333	0,369	0,878	0,896	0,861	2,292	2,188	2,390
0,366	0,330	0,438	0,864	0,916	0,811	2,027	2,041	2,403
sülfadimetoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,387	0,392	0,451	0,853	0,852	0,884	2,355	2,445	2,230
0,366	0,412	0,410	0,907	0,874	0,940	2,403	2,424	2,329
0,382	0,409	0,459	0,869	0,805	0,932	2,295	2,044	2,294
0,413	0,394	0,434	0,885	0,912	0,858	2,325	2,376	2,412
0,401	0,406	0,469	0,858	0,835	0,880	2,117	2,294	2,353
0,388	0,392	0,426	0,906	0,874	0,937	2,285	2,338	2,416
sülfamerazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,377	0,397	0,392	0,742	0,902	0,926	2,221	2,394	2,217
0,370	0,390	0,374	0,851	0,921	0,931	2,316	2,356	2,120
0,378	0,414	0,406	0,896	0,891	0,900	2,122	2,280	2,117
0,374	0,400	0,376	0,864	0,874	0,853	2,399	2,389	2,286
0,415	0,349	0,383	0,893	0,871	0,914	2,226	1,995	2,456
0,399	0,347	0,419	0,831	0,824	0,838	2,248	2,110	2,271
sülfametazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,386	0,391	0,379	0,898	0,900	0,896	2,270	2,244	2,133
0,437	0,416	0,404	0,824	0,913	0,935	2,117	2,099	2,375
0,426	0,422	0,373	0,912	0,861	0,963	2,235	2,213	2,243
0,384	0,415	0,369	0,874	0,849	0,951	2,138	2,202	2,108
0,428	0,440	0,437	0,860	0,862	0,922	2,327	2,418	2,294
0,427	0,387	0,430	0,901	0,880	0,873	2,258	2,335	2,412

EK-7. Et içeren mamalarda yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE) (devamı)

sülfametoksazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,400	0,458	0,411	0,932	0,925	0,940	2,252	2,045	2,359
0,397	0,440	0,398	0,906	0,875	0,937	1,997	2,223	2,342
0,423	0,391	0,402	0,898	0,861	0,934	2,332	2,012	2,392
0,392	0,439	0,410	0,912	0,898	0,926	2,113	2,345	2,121
0,385	0,434	0,408	0,860	0,812	0,908	2,264	2,315	2,325
0,395	0,359	0,418	0,886	0,877	0,894	2,211	2,348	2,321
sülfametoksipiridazin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,413	0,432	0,458	0,828	0,920	0,919	2,083	2,107	2,265
0,430	0,442	0,441	0,901	0,855	0,869	2,122	2,052	2,214
0,450	0,456	0,444	0,873	0,895	0,941	2,249	2,069	2,140
0,367	0,434	0,451	0,925	0,908	0,942	2,073	2,233	2,346
0,414	0,430	0,417	0,918	0,863	0,851	2,137	2,109	2,287
0,445	0,418	0,422	0,863	0,890	0,946	2,137	2,127	2,290
sülfamonometoksin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,382	0,433	0,469	0,860	0,922	0,940	2,158	2,217	2,326
0,424	0,458	0,452	0,873	0,857	0,889	2,154	2,073	2,260
0,382	0,435	0,455	0,891	0,931	0,962	2,132	2,056	2,360
0,427	0,455	0,429	0,883	0,916	0,964	2,329	2,111	2,185
0,411	0,417	0,428	0,826	0,802	0,850	2,148	2,315	2,394
0,404	0,481	0,432	0,915	0,793	0,914	2,214	2,309	2,420
sülfamoksol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,415	0,398	0,366	0,868	0,872	0,889	2,026	2,276	2,364
0,431	0,360	0,402	0,858	0,812	0,920	1,989	1,994	2,176
0,454	0,366	0,363	0,825	0,736	0,913	1,925	2,065	2,088
0,368	0,372	0,429	0,900	0,866	0,935	2,204	2,250	2,295
0,424	0,331	0,365	0,852	0,839	0,865	2,119	2,165	2,210
0,446	0,378	0,382	0,831	0,822	0,840	2,004	2,117	2,230
sülfapiridin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,367	0,324	0,363	0,810	0,762	0,882	2,229	2,436	2,147
0,391	0,378	0,380	0,786	0,801	0,873	2,117	2,332	2,234
0,358	0,452	0,405	0,873	0,868	0,844	2,257	1,915	2,264
0,430	0,453	0,422	0,856	0,803	0,855	2,210	2,010	2,133
0,361	0,335	0,422	0,812	0,885	0,829	2,279	2,283	2,366
0,333	0,414	0,392	0,834	0,804	0,863	2,357	1,974	2,347

EK-7. Et içeren mamalarda yapılan validasyon çalışması sonucunda elde edilen ham veriler (ASE) (devamı)

sülfakinoksalin								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,392	0,421	0,406	0,812	0,913	0,886	2,071	2,440	2,268
0,406	0,441	0,429	0,858	0,927	0,864	2,016	2,324	2,293
0,439	0,430	0,441	0,895	0,905	0,885	2,331	2,115	2,452
0,370	0,378	0,445	0,873	0,841	0,904	1,898	2,182	2,383
0,380	0,423	0,443	0,858	0,825	0,890	2,225	2,115	2,439
0,440	0,456	0,456	0,894	0,875	0,912	2,239	2,388	2,373
sülfatiazol								
0,5 ppb			1ppb			2,5 ppb		
1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
0,439	0,401	0,341	0,746	0,787	0,912	2,324	2,366	2,125
0,392	0,439	0,404	0,707	0,788	0,917	2,129	2,362	2,377
0,376	0,381	0,362	0,711	0,794	0,875	1,924	2,086	2,433
0,391	0,392	0,421	0,724	0,762	0,953	2,096	2,146	2,383
0,358	0,378	0,344	0,816	0,826	0,808	2,246	1,988	2,168
0,344	0,294	0,372	0,895	0,894	0,896	1,968	1,946	2,273

ÖZGEÇMİŞ



Ülgen İlknur KONAK 1984 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Antalya'da H.M.M. Bileydi Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimine 2003 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde devam ederek 2007 yılında bölüm üçüncüsü olarak mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda TÜBİTAK Yüksek Lisans Bursu ile yüksek lisans eğitimine başladı. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda 2010-2016 yılları arasında Araştırma Görevlisi olarak çalıştı ve 2010-2015 yılları arasında TÜBİTAK Doktora Bursu aldı.