



**SÜTTE ve ETTE SÜLFONAMİD
BİLEŞİKLERİNİN
LC-IDMS YÖNTEMİYLE TAYİNİ**

Işın AYDIN ÜNSAL

Doktora Tezi

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat TAŞAN

2.Danışman: Doç. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN

2017

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SÜTTE VE ETTE SÜLFONAMİD BİLEŞİKLERİNİN
LC-IDMS YÖNTEMİYLE TAYİNİ

İŞİN AYDIN ÜNSAL

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. MURAT TAŞAN
2.DANIŞMAN: DOÇ. DR. AHMET CEYHAN GÖREN

TEKİRDAĞ-2017

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Murat TAŞAN danışmanlığında Işın Aydın ÜNSAL tarafından hazırlanan “Sütte ve Ette Sülfonamid Bileşiklerinin LC-IDMS Yöntemiyle Tayini” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Murat TAŞAN (Danışman)

İmza:

Üye: Prof. Dr. Turgut KILIÇ

İmza:

Üye: Prof. Dr. H. Ersin ŞAMLI

İmza:

Üye: Doç. Dr. Mehmet ALTUN

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

SÜTTE VE ETTE SÜLFONAMİD BİLEŞİKLERİNİN LC-IDMS YÖNTEMİYLE TAYİNİ

Işın AYDIN ÜNSAL

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Murat TAŞAN

2.Danışman: Doç.Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN

Sülfonamidler, benzene bağlı amin ve sülfon gruplarını bulunduran antibiyotikler olup, oldukça geniş etkiye sahip olmaları ve ucuzluğu nedeniyle tıpta ve veterinerlikte oldukça yaygın kullanılmaktadır. Sülfonamidler veterinerlikte enfeksiyöz hastalıkların sağaltımında ve gıda değeri olan çiftlik hayvanlarının büyümelerini ve verimlerini teşvik edici olarak kullanılabilir. Bu tür uygulamalar hayvansal kaynaklı gıdalarda sülfonamid kalıntılarına yol açmaktadır. Bu kalıntılar, alerjik reaksiyon, patojenik bakterilerde antibiyotik direncinin artması, çeşitli hematolojik, gastrointestinal ve nörolojik hastalıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hazırlanan 2015 Ulusal Kalıntı İzleme Planında et ve süt ürünlerindeki varlığı belli derişimlerle sınırlandırılmıştır. Bu sınır değeri, tekil sülfonamid bileşigi için 20 ng/g, toplamda ise 100 ng/g'dır. Bu bağlamda, sülfonamidlerin analizlerinin doğru ve kesin bir yaklaşımla analiz edilmesi önem arz etmektedir. Yapılan bu çalışmada süt örnekleri için 14 adet sülfonamid bileşiginin (sülfatiazol, sülfapridin, sülfametazin, sülfamerazin, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfametoksazol, sülfadoksin, sülfisoksazol, sülfafenazol, sülfakuinoksalin, sülfakloropridazin, sülfametizol, sülfametoksipridazin) ve et örneklerinde 12 adet sülfonamid bileşiginin (sülfatiazol, sülfapridin, sülfametazin, sülfamerazin, sülfadiazin, sülfametoksazol, sülfadoksin, sülfisoksazol, sülfakuinoksalin, sülfakloropridazin, sülfametizol, sülfametoksipridazin) tayinine yönelik LC-IDMS yöntemi geliştirilip, metodun geçerli kılınması raporlanmıştır. Metotta, bileşiklerin süttten ekstraksiyonu için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi, etten ekstraksiyonu için katı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Örnekler LC-MS-MS cihazı ile analiz edilmiştir. Geliştirilen metodun UHT, pastörize ve sokak sütlerine uygulaması yapılmıştır. Geliştirilen metotla geri kazanım değerlerinin sütte %91-114 aralığında, ette ise %82-116 aralığında ve bağlı ölçüm belirsizliğinin sütte %7-13 aralığında, ette %7-14 arasında olduğu belirlenmiştir. Uygulaması yapılan süt örneklerinde analit miktarlarının yasal limit olarak belirtilen değerlerin altında olduğu (sülfametazin: $6,46 \pm 0,76$ ng/g ve sülfisoksazol: $7,3 \pm 0,71$ ng/g) tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Sülfonamid bileşikleri, izotop seyreltme yöntemi, Tandem sıvı kromatografi kütle spektroskopisi (Tandem LC-MS/MS), metot geçerli kılma, belirsizlik bütçesi

ABSTRACT

PhD. Thesis

DETERMINATION of SULFONAMIDE COMPOUNDS in MILK and MEAT

by LC-IDMS

Işın AYDIN ÜNSAL

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Advisor: Prof. Dr. Murat TAŞAN

Coadvisor: Associated Prof. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN

Sulfonamides are antibiotics containing sulfone and amine groups bonded to benzene. They are widely used in medicine and veterinary because of their broad impact and cheapness. In veterinary practise they are used in the treatment of infectious diseases also stimulating the growth and yield of farm animals. These applications may lead to residues in food of animal origin. These residues cause allergic reactions, increase in antibiotic resistance in pathogenic bacteria and various hematological, gastrointestinal and neurological disorders. Therefore the national residue monitoring plan prepared by the Turkish Ministry of Food, Agriculture and Livestock limited the sulfonamides presence in meat and dairy products to certain concentration. The limit value is 20 ng/g for singular sulfonamide compound and 100 ng/g for the total. In this context accurate and precise analysis of sulfonamides is very important. In our study LC-IDMS method for the determination of 14 sulfonamide compounds (sulfathiazole, sulfapyridine, sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, sulfadoxin, sulfisoxazole, sulfaphenazole, sulfaquinoxaline, sulfachloropyridazine, sulfamethizole, sulfamethoxypyridazine) and 12 sulfonamide compounds (sulfathiazole, sulfapyridine, sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadiazine, sulfamethoxazole, sulfadoxin, sulfisoxazole, sulfaquinoxaline, sulfachloropyridazine, sulfamethizole, sulfamethoxypyridazine) was developed and validated. Liquid-liquid extraction method was used for milk samples. Solid-liquid extraction method was used for meat samples. Samples were analysed by LC-MS-MS analyser. Recovery results were in the range of 91%-114% for milk samples; 82%-116% for meat samples respectively. The relative measurement uncertainty of milk samples was between 7%-13%. In meat samples the relative measurement uncertainty was determined to be in the range of 7%-14%. Developed method was applied to UHT, pasteurised and street vendors milk. It was determined that the amount of analyte in applied samples was below the legal limit value (sulfamethazine: $6,46 \pm 0,76$ ng/g and sulfisoxazole: $7,3 \pm 0,71$ ng/g).

Keywords: Sulfonamide compounds, isotop dilution method, Tandem liquid chromatography mass spectrometry (Tandem LC-MS/MS), validation, uncertainty budget

2017, 239 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışması süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım ve tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Murat Taşan ve Sayın Doç. Dr. Ahmet Ceyhan Gören'e, ayrıca Sayın Taner Gökçen'e, Sayın Dr. Burcu Binici'ye ve Sayın Gökhan Bilsel'e,

Tez çalışmasındaki deneysel çalışmaların yürütülmesi için laboratuvar alt yapısını kullanıma açan değerli TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü (UME) yöneticilerine,

Karşılaştığım her zorlukta beni cesaretlendiren, maddi ve manevi desteklerini üzerimde hissettiğim annem Hüsniye Can Aydın'a, babam Dr. Hulusi Aydın'a ve eşim Dr. Mehmet Ünsal'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mart, 2017

Işın AYDIN ÜNSAL

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	7
2.1. Antibiyotikler.....	7
2.1.1. Sülfonamid Grubu Antibiyotikler.....	8
2.1.2. Sülfonamidlerin kimyasal yapıları.....	13
2.1.3. Sülfonamidlerin Sınıflandırılması	17
2.1.3.1. Kısa ve orta etki süreli sülfonamidler	17
2.1.3.2. Uzun etkili (depo) sülfonamidler.....	17
2.1.3.3. Absorbe olmayan sülfonamidler.....	17
2.1.3.4. Özel kullanımlı sülfonamidler	17
2.2. Gıda Değeri Olan Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımı.....	18
2.3. Gıda Değeri Olan Hayvanlarda Sülfonamidlerin Kullanımı	18
2.4. Gıda Değeri Olan Hayvanlarda İlaç Kullanımına ve Bunların Kalıntılarının İzlenmesine Dair Mevzuat	22
2.5. Gıda Ürünlerinde Sülfonamid Kalıntılarının İnsan Sağlığına Etkileri	25
2.6. Sülfonamid Kalıntılarının Tespitinde Kullanılan Metotlar.....	26
2.6.1. Enzim İlintili Immün Test (Elisa).....	26
2.6.2. Mikrobiyolojik Yöntemler.....	26
2.6.3. Biyosensörler	27
2.6.4. Elektroforetik yöntemler.....	27
2.6.5. Kromatografi.....	27
2.6.6. Sıvı kromatografi/kütle spektrometrisi (LC/MS)	29
2.6.6.1. Pompalama sistemi	30
2.6.6.2. Enjeksiyon sistemleri.....	31
2.6.6.3. Kolonlar... ..	31
2.6.6.4. Dedektörler	32

2.7. Kütle Spektrometrenin Kullanıldığı İkili Teknikler	34
2.8. Kütle Spektrometre	34
2.8.1. İyon Kaynakları	35
2.8.1.1. Atmosferik Basınç İyonizasyon.....	36
2.8.1.2. Elektrosprey İyonizasyon (ESI).....	36
2.8.1.3. Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon (APCI).....	37
2.8.1.4. Matriks yardımıyla lazerle desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI)	38
2.8.1.5. Elektron Etki İyonlaştırma.....	39
2.8.1.6. Kimyasal İyonlaştırma (CI)	40
2.8.1.7. Alan İyonlaştırma	40
2.8.1.8. Hızlı Atom Bombardımanı ve Sıvı Sekonder İyon Kütle Spektrometresi	41
2.8.1.9. Plazma Desorbsiyon	41
2.8.1.10. Lazer Desorbsiyon	41
2.9. Kütle Analizörleri	42
2.9.1. Kuadropol analizörler	42
2.9.2. Manyetik Sektör Analizörler	43
2.9.3. Uçuş Zamanlı Kütle Analizörleri.....	43
2.9.4. İyon Tuzaklı Analizörler.....	44
2.10. Kütle Spektrometre/Kütle Spektrometre (Tandem Kütle Spektrometre MS-MS)	44
2.11. Kararlı İzotop Oranı Kütle Spektrometri	46
2.12. İzotop Seyreltme Kütle Spektrometri (IDMS)	47
2.13. Sülfonamidlerin Ekstraksiyon Teknikleri.....	48
2.13.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon	49
2.13.2. Katı faz ekstraksiyon	49
2.13.3. Basınçlı Çözgen Ekstraksiyonu	50
2.13.4. Moleküler baskılı polimerler (MIPs) tekniği	50
2.13.5. Katı faz mikroekstraksiyon (SPME).....	51
2.13.6. Tek damla mikroekstraksiyon (SDME).....	51
2.13.7. Mikrodalga yardımcı ekstraksiyon	51
2.13.8. QUECHERS ekstraksiyonu	52
2.13.9. Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon	52
2.14. Gıda Ürünlerinde Sülfonamid Bileşikler Kalıntılarına Dair Araştırmalar	52
2.15. Kimyasal Analizlerde Kalite Kontrol	66

2.16. Metot Geçerli Kılma (Validasyon)	67
2.17. Metot Geçerli Kılma Araçları	69
2.17.1. Körler.....	69
2.17.1.1. Reaktif körü	69
2.17.1.2. Numune körü	69
2.17.2. Rutin test numuneleri.....	69
2.17.3. Kirletilmiş malzemeler/çözeltiler	69
2.17.4. İçinde doğal olarak analit bulunan numuneler.....	69
2.18. Ölçüm Standartları.....	69
2.18.1. Sertifikalı referans malzeme	70
2.18.2. Doğrusallık ve çalışma aralığı	70
2.18.3. Doğruluk	71
2.18.4. Tekrarlanabilirlik	71
2.18.5. Algılama sınırı (LOD)	72
2.18.6. Tayin sınırı (LOQ).....	72
2.18.7. Seçicilik	73
2.18.8. Sağlamlık	73
2.18.9. Geri kazanım.....	73
2.18.10. Ölçüm belirsizliği	73
2.19. Ölçüm belirsizlik bütçesinin oluşturulması	73
2.20. Belirsizlik Kaynakları	76
2.21. Metrolojik izlenebilirlik.....	78
3. MATERYAL ve YÖNTEM	79
3.1. Materyal	79
3.1.1. Kimyasallar.....	79
3.1.2. Kullanılan teknik cihazlar.....	79
3.1.3. Standart çözeltiler	80
3.1.4. Süt numuneleri.....	81
3.1.5. Et numuneleri.....	81
3.2. Süt ve Et Numunelerinde LC-MS/MS Analiz Şartları	81
3.2.1. Kromatografik koşullar.....	82
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	84
4.1. Metotlar ve Metotlardan Elde Edilen Bulgular	84

4.1.1. LC-IDMS Metodu	84
4.1.1.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Oluşturulması	88
4.1.1.2. Matriks etkisi	89
4.1.2. Sütte 14 adet sülfonamid bileşiklerinin tayinine yönelik metodun kalibrasyon eğrileri	90
4.1.3. Ette 12 adet sülfonamid bileşiklerinin tayinine yönelik metodun kalibrasyon eğrileri .	119
4.1.4. Sülfonamidlerin süttten ekstraksiyon alışması.....	142
4.1.5. Sülfonamidlerin etten ekstraksiyon alışması	143
4.2. Metot Geçerli Kılma ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplamaları	144
4.2.1. Sütte sülfonamid tayininde metodun geçerli kılınması	144
4.2.1.1. Performans kriterleri	144
4.2.1.2. Algılama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	147
4.2.1.3. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik.....	148
4.2.1.4. Gerçeklik/Geri kazanım.....	149
4.2.1.5. Doğrusallık ve çalışma aralığının oluşturulması	151
4.2.1.6. Sağlamlık.	152
4.2.2. Sütte ölçüm belirsizliği hesaplamaları.....	153
4.2.3. Ette Sülfonamid Tayininde Metodun Geçerli Kılınması	154
4.2.3.1. Performans kriterleri	154
4.2.3.2. Algılama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	156
4.2.3.3. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik.....	157
4.2.3.4. Gerçeklik/Geri kazanım.....	159
4.2.3.5. Doğrusallık ve çalışma aralığının oluşturulması	160
4.2.3.6. Sağlamlık	161
4.2.4. Ette ölçüm belirsizliği hesaplamaları.....	162
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	164
5.1. Ette ve Sütte LC/MS-MS Analiz Parametrelerinin Optimizasyonu	164
5.2. Örnek Hazırlama Metodu Optimizasyonu	171
5.2.1. Süt örneklerini hazırlama metodu optimizasyonu	171
5.2.1.1. Katı faz ekstraksiyonu alışmaları.....	171
5.2.1.2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu.....	172
5.2.1.3. Modifiye QUECHERS metodu	173
5.2.1.4. Modifiye sıvı-sıvı ekstraksiyonu	173
5.2.1.5. Metodun geri kazanımının irdelenmesi	174

5.2.1.6. Matriks etkisinin incelenmesi	174
5.2.2. Et Örneklerini Hazırlama Metodu Optimizasyonu.....	176
5.2.2.1. Katı-sıvı özütleme.....	176
5.2.2.2. Ultratorax ve vorteks işleminin karşılaştırılması	178
5.3. Metot Geçerli Kılma ve Belirsizlik Hesapları	179
5.3.1. Sütte 14 adet sülfonamid bileşiklerinin tayinine yönelik metodun geçerli kılınması ve belirsizlik hesapları.....	179
5.3.2. Ette 12 adet sülfonamid bileşiğinin tayinine yönelik metodun geçerli kılınması ve belirsizlik hesapları.....	180
5.4. Metodun Piyasadaki Örnekler Üzerine Uygulanışı	182
6. KAYNAKLAR	185
7. EKLER	201
EK-1	201
EK-2	216
EK-3	217
EK-4	222
EK-5	234
EK-6	235
ÖZGEÇMİŞ	239

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1 Hayvanlarda sülfonamid dozaj örnekleri (Prescott ve ark. 2013)	19
Çizelge 2.2 Hayvanlarda sülfonamid kombinasyonlarının dozajları (Prescott ve ark. 2013) ..	19
Çizelge 2.3 Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmeliğine göre tayin edilmesi gereken sülfonamidler ve yasal limitleri	22
Çizelge 3.1 Sülfonamidlerin ve izotoplarının Tandem Gold LC-MS/MS.....	83
Çizelge 4.1 Sülfonamid iyonlarının MS-MS parametrelerinin belirlenmesi.....	85
Çizelge 4.2 Doğal sülfamerazin konsantrasyonu/izotop sülfamerazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfamerazin alanı/izotop sülfamerazin alanı değerleri	91
Çizelge 4.3 Doğal sülfadiazin konsantrasyonu/izotop sülfadiazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfadiazin alanı/izotop sülfadiazin alanı değerleri	93
Çizelge 4.4 Doğal sülfisoksazol konsantrasyonu/izotop sülfisoksazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfisoksazol alanı/izotop sülfisoksazol alanı değerleri	95
Çizelge 4.5 Doğal sülfametoksazol konsantrasyonu/izotop sülfametoksazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfametoksazol alanı/izotop sülfametoksazol alanı değerleri	97
Çizelge 4.6 Doğal sülfatiazol konsantrasyonu/izotop sülfatiazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfatiazol alanı/izotop sülfatiazol alanı değerleri	99
Çizelge 4.7 Doğal sülfadimetoksin konsantrasyonu/izotop sülfadimetoksin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfadimetoksin alanı/izotop sülfadimetoksin alanı değerleri	101
Çizelge 4.8 Doğal sülfapridin konsantrasyonu/izotop sülfapridin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfapridin alanı/izotop sülfapridin alanı değerleri	103
Çizelge 4.9 Doğal sülfametizol konsantrasyonu/izotop sülfametizol konsantrasyonu	105
Çizelge 4.10 Doğal sülfakloropridazin konsantrasyonu/izotop sülfakloropridazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfakloropridazin alanı/izotop sülfakloropridazin alanı değerleri	107
Çizelge 4.11 Doğal sülfadoksin konsantrasyonu/izotop sülfadoksin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfadoksin alanı/izotop sülfadoksin alanı değerleri ..	109
Çizelge 4.12 Doğal sülfafenazol konsantrasyonu/izotop sülfafenazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfafenazol alanı/izotop sülfafenazol alanı değerleri	111

Çizelge 4.13 Doğal sülfametazin konsantrasyonu/izotop sülfametazin konsantrasyonu	113
Çizelge 4.14 Doğal sülfakuinoksalin konsantrasyonu/izotop sülfakuinoksalin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfakuinoksalin alanı/izotop sülfakuinoksalin alanı değerleri	115
Çizelge 4.15 Doğal sülfametoksipridazin konsantrasyonu/izotop sülfametoksipridazin	117
Çizelge 4.16 Doğal sülfamerazin konsantrasyonu/izotop sülfamerazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfamerazin alanı/izotop sülfamerazin alanı değerleri	119
Çizelge 4.17 Doğal sülfadiazin konsantrasyonu/izotop sülfadiazin konsantrasyonu değerlerine	120
Çizelge 4.18 Doğal sülfisoksazol konsantrasyonu/izotop sülfisoksazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfisoksazol alanı/izotop sülfisoksazol alanı değerleri	122
Çizelge 4.19 Doğal sülfametoksazol konsantrasyonu/izotop sülfametoksazol konsantrasyonu	124
Çizelge 4.20 Doğal sülfatiazol konsantrasyonu/izotop sülfatiazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfatiazol alanı/izotop sülfatiazol alanı değerleri	126
Çizelge 4.21 Doğal sülfapridin konsantrasyonu/izotop sülfapridin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfapridin alanı/izotop sülfapridin alanı değerleri	128
Çizelge 4.22 Doğal sülfametizol konsantrasyonu/izotop sülfametizol konsantrasyonu değerlerine	130
Çizelge 4.23 Doğal sülfakloropridazin konsantrasyonu/izotop sülfakloropridazin konsantrasyonu	132
Çizelge 4.24 Doğal sülfadoksin konsantrasyonu/izotop sülfadoksin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfadoksin alanı/izotop sülfadoksin alanı değerleri...	134
Çizelge 4.25 Doğal sülfametazin konsantrasyonu/izotop sülfametazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfametazin alanı/izotop sülfametazin alanı değerleri	136
Çizelge 4.26 Doğal sülfakuinoksalin konsantrasyonu/izotop sülfakuinoksalin konsantrasyonu	138
Çizelge 4.27 Doğal sülfametoksipridazin konsantrasyonu/izotop sülfametoksipridazin	140
Çizelge 4.28 Sütte sülfonamid tayini metot geçerli kılma kabul kriterleri	145
Çizelge 4.29 Sütte sülfonamid tayininde metot geçerli kılma planı	146

Çizelge 4.30 Sütteki sülfonamid bileşiklerine ait IDMS analiz yöntemi LOD ve LOQ sonuçları.....	147
Çizelge 4.31 Sütteki sülfonamid bileşiklerine ait IDMS analiz yöntemi tekrarlanabilirlik ve ara	149
Çizelge 4.32 Sütteki sülfonamid bileşiklerine ait geri kazanım sonuçları	150
Çizelge 4.33 Sütteki 14 adet sülfonamid bileşiğinin kalibrasyon eğrisine ait regresyon katsayıları.....	151
Çizelge 4.34 Metodun basamaklarında sabit tutulan ve değiştirilen parametreler.....	152
Çizelge 4.35 Sütteki 14 adet sülfonamid bileşiklerinin belirsizlik hesaplamaları.....	154
Çizelge 4.36 Ette 12 adet sülfonamidin tayin metodunu geçerli kılma kabul kriterleri.....	154
Çizelge 4.37 Ette sülfonamid tayininde metod geçerli kılma planı	155
Çizelge 4.38 Ette 12 adet sülfonamid bileşiklerine ait LOD ve LOQ sonuçları	157
Çizelge 4.39 Ette 12 adet sülfonamid bileşiklerine ait tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçları.....	158
Çizelge 4.40 Ette 12 adet sülfonamid bileşiklerine ait geri kazanım sonuçları.....	160
Çizelge 4.41 Ette 12 adet sülfonamid bileşiklerinin kalibrasyon eğrilerine ait.....	161
Çizelge 4.42 Metodun basamaklarında sabit tutulan ve değiştirilen parametreler.....	162
Çizelge 4.43 Ette 12 adet sülfonamid bileşiğine ait belirsizlik hesaplamaları	163
Çizelge 5.1 Doğal ve izotop sülfonamid bileşikleri için LC-MS/MS optimum koşulları.....	165
Çizelge 5.2 Matriste ve çözücüde sülfonamid bileşiklerinin yanıt faktör yüzde oranları	175
Çizelge 5.3 Geliştirilen metodun piyasa sütlerine uygulanması ile elde edilen değerler (ng/g)	183

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 Prontosil'in kimyasal yapısı	8
Şekil 2.2 Sülfanilamidin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.3 p-aminobenzoik asit (PABA)	9
Şekil 2.4 Sülfonamidlerin etki mekanizması	11
Şekil 2.5 Trimetoprim kimyasal formülü	11
Şekil 2.6 Sülfonamid analizleri yapılan gıda grupları	13
Şekil 2.7 Sülfonamidlerin kimyasal formülü	13
Şekil 2.8 14 adet sülfonamid bileşiklerinin kimyasal yapıları	16
Şekil 2.9 Sıvı kromatografi cihazının şematik görüntüsü	30
Şekil 2.10 LC/MS sisteminin blok diyagramı	34
Şekil 2.11 Elektrosprey iyon kaynağı şekli	37
Şekil 2.12 Atmosferik iyon kaynağı	38
Şekil 2.13 Kuadrupol analizörü	42
Şekil 2.14 Manyetik sektör analizörü	43
Şekil 2.15 Ayırma tüpü	44
Şekil 2.16 Elektron multiplier iyon dedektörü	44
Şekil 2.17 Tandem Gold kütle spektrometre	46
Şekil 4.1 Sütte ve ette sülfonamid bileşiklerine ait tekil kromatogram görüntüsü	86
Şekil 4.2 Sülfamerazin için kalibrasyon eğrisi	92
Şekil 4.3 Sülfadiazin için kalibrasyon eğrisi	94
Şekil 4.4 Sülfisoksazol için kalibrasyon eğrisi	96
Şekil 4.5 Sülfametoksazol için kalibrasyon eğrisi	98
Şekil 4.6 Sülfatiazol için kalibrasyon eğrisi	100
Şekil 4.7 Sülfadimetoksin için kalibrasyon eğrisi	102
Şekil 4.8 Sülfapridin için kalibrasyon eğrisi	104
Şekil 4.9 Sülfametizol için kalibrasyon eğrisi	106
Şekil 4.10 Sülfakloropridazin için kalibrasyon eğrisi	108
Şekil 4.11 Sülfadoksin için kalibrasyon eğrisi	110
Şekil 4.12 Sülfafenazol için kalibrasyon eğrisi	112
Şekil 4.13 Sülfametazin için kalibrasyon eğrisi	114
Şekil 4.14 Sülfakuinoksalin için kalibrasyon eğrisi	116

Şekil 4.15 Sülfametoksiptridazin için kalibrasyon eğrisi	118
Şekil 4.16 Sülfamerazin için kalibrasyon eğrisi	119
Şekil 4.17 Sülfadiazin için kalibrasyon eğrisi	121
Şekil 4.18 Sülfisoksazol için kalibrasyon eğrisi	123
Şekil 4.19 Sülfametoksazol için kalibrasyon eğrisi	125
Şekil 4.20 Sülfatiazol için kalibrasyon eğrisi	127
Şekil 4.21 Sülfapridin için kalibrasyon eğrisi	129
Şekil 4.22 Sülfametizol için kalibrasyon eğrisi	131
Şekil 4.23 Sülfakloropridazin için kalibrasyon eğrisi	133
Şekil 4.24 Sülfadoksin için kalibrasyon eğrisi	135
Şekil 4.25 Sülfametazin için kalibrasyon eğrisi	137
Şekil 4.26 Sülfakuinoksalin için kalibrasyon eğrisi	139
Şekil 4.27 Sülfametoksiptridazin için kalibrasyon eğrisi	141

SİMGELER DİZİNİ

AcCN	:Asetonitril
ASE	:Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
CID	:Çarpışma kaynaklı ayrılma
DDS	:Dapson
EA	:Etilasetat
HPLC	:Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IDMS	:İzotop seyreltme kütle spektrometri
LOD	:Algılama sınırı
LC	:Sıvı kromatografisi
LIF	:Lazer uyarmalı floresans
LOQ	:Tayin sınırı
LLE	:Sıvı-sıvı ekstraksiyon
LLE-FPVL	:Sıvı-sıvı ekstraksiyon çok düşük sıcaklıkta hızlı dağılım
MS	:Kütle spektrometre
MS/MS	:Tandem kütle spektrometre
MSPD	:Matriks katı faz dağılımı
RF	:Yanıt faktörü
SAM	:Sülfaasetamid
SBA	:Sülfabenzamid
SCP	:Sülfakloropridazin
SDD	:Sülfadimidin
SDM	:Sülfadimetoksin
SDO	:Sülfadoksin
SDZ	:Sülfadiazin
SGN	:Sülfaguanidin
SIX	:Sülfisoksazol
SMMX	:Sülfamonometoksin
SMP	:Sülfametoksipridazin
SMR	:Sülfamerazin
SMZ	:Sülfamethazin
SMT	:Sülfametizol
SMX	:Sülfametoksazol

SNM	:Sülfanilamid
SNZ	:Sülfafenazol
SP	:Sülfapiridin
SPE	:Katı faz ekstraksiyonu
SPME	:Katı faz mikroekstraksiyon
SSZ	:Sülfasalazin
STR	:Sülfitroksazol
STZ	:Sülfatiazol
SQX	:Sülfakuinoksalin
TCA	:Trikloroasetik asit
THF	:Tetrahidrofuran
Quechers	:Hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam, güvenli
UPLC	:Ultra performanslı sıvı kromatografisi

1.GİRİŞ

Gıda güvenliği, herkesin, her zaman, aktif ve sağlıklı bir yaşam için diyet ihtiyaçlarını ve besin tercihlerini karşılayan yeterli, güvenli ve besleyici gıdaya fiziksel, sosyal ve ekonomik erişime sahip olması durumunda ortaya çıkan bir durumdur (Anonim 2002a). Gıda güvenliği, toplum yaşamının sağlıklı olarak sürdürülebilirliği, ekonomiye yansımaları, hastalıklardan korunma gibi nedenlerden dolayı önemi giderek artan bir konu haline gelmiştir. Gıda güvenliği, ayrıca gıdalardaki mikroorganizmaların, kimyasalların, biyotoksinlerin, her çeşit katkı maddelerinin yasal limitler içinde bulunması gerekliliğini de kapsamaktadır. Gıda güvenliği, üretimde ve denetimde kalite gerektirmektedir. Bu nedenle, gıda güvenliği alanında devletlerin yürütme ve bürokrasi mekanizmalarının, araştırmacıların, kanun, yönetmelik ve mevzuat yapıcılarının, gıdalarda sağlığı tehdit edebilecek riskleri belirlemesi, tanımlaması ve gerekli tedbirleri oluşturması gerekmektedir. Söz konusu risklerin belirlenmesi ve tanımlanması aşaması analiz teknikleriyle sağlanabilmektedir. Bu hususta teknik ve teknolojinin geliştirilmesi önemli bir Ar-Ge konusudur. Özellikle tüm dünyada sıklıkla kullanılan gıda değeri olan hayvan ilaçlarının, pestisitlerin, herbisitlerin, insektisitlerin, biyotoksinlerin kalıntılarının analizleri, analiz tekniklerinin ve cihazlarının geliştirilmesi, tekniklerin ve teknolojilerin hassasiyetinin artırılması, sürecin kısaltılması, maliyetin azaltılması araştırmaların odak noktasını oluşturmaktadır.

Kalıntı; herhangi bir şekilde bulaşma yoluyla ya da ilaç uygulanmış hayvanlardan ve bitkilerden elde edilen gıdalarda bulunan farmakolojik etkiye sahip etkin maddenin kendisi, parçalanma ürünleri veya metabolizma ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde veteriner ilaçlarının bilinçsizce uygulanmaları sonucunda besinlerin veteriner ilaç kalıntıları ile kirlenme riski artmıştır. Bunun sonucunda, alerjiden, ölüme kadar değişen şiddetlerde zehirlenmelere, cinsiyet özellikleri ve davranışlarda değişikliklere, üreme bozukluklarına, teratojenik, mutajenik, karsinojenik etkilere ve dirençli suşların ortaya çıkması ile ilaçların sağaltıcı etkilerinin azalması gibi olumsuzluklara sebebiyet verebilmektedir (Uludağ, 2008).

Antibiyotikler bulaşıcı hastalıkların tedavisinde ve gıda değeri olan çiftlik hayvanlarının büyümelerini arttırıcı olarak yaygın olarak kullanımı olan ilaçlardır. Geniş çapta kullanılmaktadırlar. β -laktam, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, spektinomisin, linkozamid, nitrofuran, makrosiklik, nitroimidazol, trimethoprim, polimiksin, kinolon ve sülfonamid grubu ilaçlar belirtilen amaçlar için sahada en fazla kullanılan ilaçlardır.

Sülfonamidler ucuz olmalarından ve geniş spektrumda aktivite göstermelerinden dolayı diğer antibiyotiklere göre tercih edilir (Sarmah ve ark. 2006). Ancak antibiyotiklerin sahada uygun olmayan şekil ve dozda yasal olmayan kullanımları sonucu et, süt, yumurta, bal ve hayvanların yenilebilir diğer dokularında kalıntılar oluşmaktadır (Yibar ve Soyutemiz 2013).

Sülfonamidler, benzen çatısına katılmış amin ve sülfon gruplarını bulunduran antibiyotik özellikli bileşiklerdir. Geniş ve etkin spektrumu ve ekonomik olmalarından dolayı tıpta ve veterinerlikte sıklıkla kullanılırlar. Sülfonamidler, veterinerlikte özellikle bulaşıcı hastalıkların tedavisinde ve gıda değeri olan çiftlik hayvanlarının büyümelerini ve verimlerini artırıcı olarak kullanılmaktadırlar. Bu tür uygulamalarda hayvan bünyesine bu bileşiklerin alınması ile hayvansal kaynaklı gıdalarda sülfonamid kalıntıları oluşmaktadır. Sülfonamidlerin kalıntı varlığı, bu gıdaları tüketenlerde, alerjik reaksiyon, patojenik bakterilerde antibiyotik direncinin artması, çeşitli hematolojik, gastrointestinal ve nörolojik hastalıklara neden olurlar (Kim ve ark. 2003). Sülfonamidlere kontrolsüz maruz kalınması Steven Johnson sendromuna sebebiyet verebilmektedir (Ho Kim ve ark. 2011). Ayrıca kalıntılar etten ve süttten elde edilen fermente gıdaların kalitelerinde düşüklüğe neden olmaktadır. Tüm bu tehlikeli ve ciddi problemlerden dolayı da, gıda maddelerinde sülfonamid kalıntılarının tespiti önemli bir konu olmuştur. Etkin bir gıda güvenliğinin sağlanması için sahada bilinçsiz sülfonamid kullanımından kaçınılması ve gıdalardaki olası sülfonamid kalıntılarının sorumlu yasal otorite tarafından sıklıkla izlenmesi de gerekmektedir (Yibar ve ark. 2012).

Amerika ve Avrupa kıtalarında hatta birçok ülkede hayvansal kaynaklı gıdalardaki maksimum sülfonamidlerin kalıntı limiti 100 µg/kg olarak belirlenmiştir (Cai ve ark. 2008). Avrupa Birliği'nde veteriner ilaçları konusunda çok sayıda düzenleme ve bu düzenlemelerin değişiklikleri ve güncellemeleri mevcuttur. Temel düzenlemeler ise hormonal, tirostatik maddeler ve β-agonistlerin hayvanlarda kullanımını düzenleyerek, büyüme desteği olarak kullanılan maddelerin yasaklanmasında yasal dayanağı oluşturur. Kullanımına izin verilen ilaçlar konusundaki eski bir direktif ise yakın geçmişte güncellenerek izin verilen ilaçlar ve bunlarla ilgili maksimum kalıntı limitleri (MRL) konusunda kapsamlı bir liste oluşturulmuştur. Bu direktiflerin tamamı ulusal kanunlarımızda yer almaktadır. Türk Gıda Kodeksi 2002/30 sayılı tebliğinde “Hayvansal Gıda Maddelerindeki Maksimum Kalıntı Düzeyleri” (Anonim 2002b) belirlenmiştir. Sülfonamidler ülkemizde kullanımına izin verilen antibiyotikler arasında bulunmaktadır. Ülkemizde son yıllarda veteriner ilaç kalıntıları

konusunda Avrupa Birliği ile uyum yolunda önemli adımlar atılmış ve Ulusal Kalıntı İzleme Programı konusunda bazı ilerlemeler sağlanmıştır. Ulusal Gıda Kalıntı Planı uygulamasında Avrupa Birliği mevzuatı (96/23/EC ve 96/22/EC sayılı Konsey Direktifleri ile 98/179/EC sayılı Konsey Kararı) ile uyumu tamamlanmış ulusal mevzuat dikkate alınmaktadır. Bu kapsamda, ulusal kalıntı kontrolü “Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler İle Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik, resmi gazete, 17.12.2011, no. 28145” (Anonim 2011b) ve bu yönetmeliğe bağlı “2013/09 sayılı Canlı Hayvan ve Hayvansal Ürünlerde Kalıntı İzleme Genelgesi”nde (Anonim 2013b) belirtilen kurallara göre hazırlanan Ulusal Kalıntı İzleme Planı çerçevesinde yürütölmektedir.

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2000 yılından itibaren Ulusal Kalıntı İzleme Programı gerçekleştirilmektedir. Ulusal Kalıntı İzleme Planı kapsamında kinolon grubu ve sülfonamid grubu ilaçlar da dâhil olacak şekilde antibakteriyel ilaçlar kanatlı etleri, sığır eti, su ürünleri, süt ve bal ürünlerinde analiz edilmektedir. Söz konusu ürünlerde antibakteriyel ilaç kalıntılarının tespit edildiği de sonuç raporlarında ifade edilmektedir (Yarsan 2012). Söz konusu analizler Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’nın yetkilendirdiği Bakanlığa bağlı kurumlar tarafından yapılmakta olup, Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü (Charm II metodu ile beta-laktam, sülfonamidlerin analizi), Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü (sülfonamidler ve kinolonlar da dâhil antibakteriyel maddelerin ve kloramfenikolün analizleri) kurumlarıdır. Bu kurumlarda, sülfonamidlerin analiz metodlarının geçerli kılınması çalışmaları, 17 Ağustos 2002 tarihli 2002/657/EC sayılı Avrupa Birliği kararına göre yapılmaktadır. Ülkemizde de Gıda ve Kontrol Daire Başkanlığı Ulusal Kalıntı İzleme Planına (Anonim 2015a) göre sütte LC-MS/MS doğrulama metodu teşhis seviyesi her bir sülfonamid için 20 µg/kg, karar limiti toplamda 100 µg/kg’dır.

Gıda maddelerinde sülfonamid bileşiklerin tespitine yönelik çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Sülfonamid kalıntılarının farklı gıda maddelerinde tespiti için birçok nicel ölçüm cihazının analitik metotları kullanılmaktadır. ELISA, Charm II, HPLC ve LC-MS/MS kullanılan nicel ve nitel metotlar arasındadır. LC-MS/MS, kalıntı analizinde yüksek seçiciliği, belirleyiciliği ve hassasiyeti ile en uygun kalıntı analiz yöntemlerindendir. LC-MS/MS ile kalıntı sülfonamid analizlerinde daha doğru ve kesin sonuçlar için İzotop Seyreltme Kütle Spektrometrisi metodu (Isotop Dilution Mass Spectroscopy, IDMS) kullanılmaktadır (Hiba 2016, Abdallah 2014, Kim 2002).

Gıdalar (matriks), bünyesinde proteinler, yağlar, karbonhidratlar, oligosakkaritler, mono ve disakkaritler, aminoasitler, metaller, vitaminler gibi pek çok basit, supra ve kompleks moleküller bulunduran yapılardır. Gıdaların bu denli karmaşık yapıda olması nedeniyle içeriğindeki herhangi bir maddenin tespiti için bu maddenin ön işlem uygulanarak saflaştırılması gerekmektedir. Ayrıca, sülfonamidlerin doğasını bozmadan, matriksten alınıp, ölçüm limitlerinin üstünde analiz edebilmek için konsantrasyonunu artırmak gereklidir. Bunun için sülfonamidler matriksten özütlenir ve temizlenir. Ancak, sülfonamidlerin polaritelerinin birbirinden farklı olması nedeniyle gıdalardan özütlenmesi (ekstraksiyon) oldukça zordur. Özütlenmesi tamamlanan ve özütleme çözücüsüne taşınan sülfonamid bileşiklerinin, bu çözücü içindeki kalıntıların bertaraf edilmesi ve LC-MS/MS mobil fazına aktarılabilmesi için bu çözücünden temizlenmesi (clean up) uzaklaştırılması gerekir. Bu işlemde tamamlandıktan sonra sülfonamid bileşikleri tayin edilmek üzere LC-MS/MS cihazına gönderilir.

Ülkemizde sülfonamid bileşiklerinin analiz metodunun geliştirilmesi, validasyonu ve belirsizlik bütçesinin oluşturulması konularında son yıllarda bazı çalışmalar yapılmıştır. Kök (2016), İzmir İlindeki hipermarketlerde satışı yapılan kültür alabalık, çipura ve levrek balıklarının kas dokularında sülfonamid grubu antibiyotiklerin varlığının araştırılması konulu doktora tezi çalışmasında, ülkemizde oldukça fazla tüketilen kültür balıklarından çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve alabalıkta (*Oncorhynchus mykiss*) sülfonamid grubu antibiyotikler (sülfatiazol, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfamerazin, sülfametazin ve sülfametoksazol) yönünden antibiyotik kalıntılarının varlığını incelemiştir. Toplanan balık kas dokularından Charm II ve LC-MS/MS cihazı yardımıyla sülfonamid grubu antibiyotikler yönünden analizlerini yapmıştır. Konak (2016), Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi (UHPLC-HR/MS) ile bebek gıdalarında sülfonamid grubu antibiyotik kalıntılarının ve metabolitlerinin belirlenmesi için analiz metodu geliştirilmesi konulu doktora tezi çalışmasında, 12 adet sülfonamid bileşiğinin (sülfakloropiridazin, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametoksazol, sülfametoksipiridazin, sülfamonometoksin, sülfamoksol, sülfapiridin, sülfakinoksalin, sülfatiazol) ve 5 adet metabolitin (N-asetilsülfadiazin, N-asetilsülfamerazin, N-asetilsülfametazin, N-asetilsülfametoksazol, N-asetilsülfapiridin) analizini UHPLC-HR/MS ile yapmıştır. Analitler, ASE sistemi ve QuEChERS ekstraksiyonu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Geliştirilen analiz yönteminin güvenilirliğini test etmek amacıyla metot validasyonu yapmıştır. Saraç (2015), İstanbul'da satışa sunulan içme

sütlerinde antibiyotik kalıntı düzeylerinin araştırılması konulu yüksek lisans tezi çalışmasında, içme sütü örneklerinde tetrasiklin ve sülfonamid grubu antibiyotiklerinden doksisisiklin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, sülfatiazol, sülfakinoksalin, sülfapridin, sülfametoksazol, sülfamerazin, sülfadoksin, sülfadimetoksin, sülfadiazin, sülfakloropridazin, sülfamethazin, kalıntı düzeylerini belirlemiştir. Örnekleri, LC-MS/MS yöntemi kullanarak analiz etmiştir. Tashakkori (2013), balda sülfonamidlerin sıvı kromatografisi ile tayin öncesi admisel katı faz ekstraksiyonu sorbenti kullanarak ayrılması konulu yüksek lisans tezi çalışmasında, baldan sülfadiazin, sülfametazin, sülfamerazin ve sülfametoksazol bileşiklerinin ekstraksiyonu için yeni bir katı faz ekstraksiyonu yöntemi geliştirmiş ve bu sülfonamidleri HPLC-DAD ile analiz etmiştir. Özgenç (2011), süt ve balda sülfonamidlerin kromatografik tayin konulu yüksek lisans tezi çalışmasında, süt ve bal gibi gıda ürünlerine Triton X-114 yüzey aktif maddesi kullanarak önderiştirme işlemi uygulamış ve DAD dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile sülfadiazin ve sülfametoksazol tayini gerçekleştirmiştir. Şanlı (2007), bazı sülfonamidlerin sıvı kromatografi yöntemi ile tayini konulu doktora tezi çalışmasında, 7 adet sülfonamidi (sülfodiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfadoksin, sülfamonometoksin, sülfametoksazol) sıvı kromatografi (LC) ve LC-DAD yöntemleri ile tayin etmiştir. Şu ana kadar ülkemizde IDMS yöntemi kullanılarak sülfonamidlerin gıdalarda analizi konusunda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tezin amacı sütte 14 adet sülfonamid bileşiklerini (sülfatiazol, sülfapridin, sülfametazin, sülfamerazin, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfametoksazol, sülfadoksin, sülfisoksazol, sülfafenazol, sülfakuinoksalin, sülfakloropridazin, sülfametizol, sülfametoksipridazin) ve ette 12 adet sülfonamid bileşiklerini (sülfatiazol, sülfapridin, sülfametazin, sülfamerazin, sülfadiazin, sülfametoksazol, sülfadoksin, sülfisoksazol, sülfakuinoksalin, sülfakloropridazin, sülfametizol, sülfametoksipridazin) tayin etmeye yönelik metrolojik izlenebilirliği sağlanmış birincil (primer) bir yöntem geliştirmektir. Geliştirilen yöntemin güvenilirliğini ispatlamak için validasyon işleminin uygulanması, belirsizlik hesabının yapılması, izlenebilirliğinin sağlanması ve rutin saha kontrol laboratuvarları için yeni bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Metodun örnek hazırlama aşamasında süt ve et ürünleri için en uygun ekstraksiyon yöntemlerinin belirlenmesi ve ölçümler için LC-MS/MS kullanılması amaçlanmıştır. Güvenilir bir kantitatif değerlendirme için izotop dilüsyon kütle spektrometri (IDMS) yönteminin kullanılması ve elde edilen yöntemin UHT, pastörize ve sokak sütlerine uygulanması hedeflenmiştir. İlave olarak, IDMS metodu için analitin izotopça zenginleştirilmiş türevine ihtiyaç duyulmakta olup, literatür taraması sonucunda sülfonamidler

için gıdalarda yapılan kalıntı analizlerinde piyasada mevcut olan izotopça zenginleştirilmiş slfonamidlerden sınırlı sayıda, biri veya birkaçı iç standart olarak kullanıldığı göze çarpmaktadır. Bu tez çalışması ile geniş bir sülfonamid bileşik ailesinin eşlenik izotoplarının kullanımı gerçekleştirilmiştir.



2.KURAMSAL TEMELLER

2.1.Antibiyotikler

Antibiyotikler, bakteri, mantar ve aktinomisetler gibi canlı mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen veya sentezle hazırlanan, düşük yoğunlukta bile bakterilerin gelişmesini etkileyen ya da onları öldüren maddelerdir (Akkan ve Karaca 2003). Antibiyotiklerin hedef hücreye etkilerine, etki mekanizmalarına, etki gösterdikleri mikroorganizma türüne, etki spektrumuna ve immunmodülatör etkilerine göre sınıflandırılır (Başoğlu 2000).

Antibiyotikler bakteriler üzerinde olan etkilerine göre iki grupta toplanabilirler;

1. Bakterilerin gelişmesini/üremesini yavaşlatan/durduranlar (bakteriyostatikler): Bu ilaçlar bakterilerin gelişmesi ve üremesini yavaşlatır, engellerler. Bu gruba tetrasiklinler, makrolidler, fenikoller, sülfonamidler ve kinolonlar örnek olarak verilebilir.

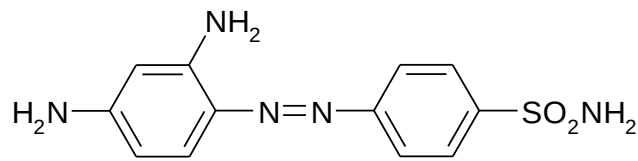
2. Bakterileri öldürenler (bakterisitler): Bu şekilde etkiyen ilaçlar bakterileri doğrudan öldürürler; özellikle perakut ve akut seyirli hastalıkların sağaltımında bu ilaçlar tercih edilir. Bakterileri öldürerek etkiyen ilaçlar, aynı zamanda bakterilerin gelişmesini de önlerler. Bu gruba beta-laktamlar, nitrofuranlar, aminoglikozidler, polimiksinler ve novobiosin örnek olarak verilebilir (Yarsan 2013).

Antibiyotikler ilk olarak 1928 yılında bulunmuştur. Fakat rutin olarak kullanılmaya 1940'lı yıllarda, ikinci dünya savaşı döneminde başlanmış ve insan sağlığının düzeltilmesinde hayati bir öneme sahip olmuştur. Antibiyotikler enfeksiyöz hastalıkların sağaltımında ve gıda değeri olan çiftlik hayvanlarının büyümelerini ve verimlerini teşvik edici olarak geniş çapta kullanılmaktadırlar. Antibiyotikler, diğer veteriner ilaçları ile beraber hastalıkları önlemek ve kontrol altına almak için ilk olarak 1950'lerde yem katkısı olarak kullanılmaya başlanmışlardır. Çevresel değişimlerin, aşılamanın ve diğer yönetim uygulamalarının yol açtığı stres etkilerini ortadan kaldırmak ve büyümeyi arttırmak için hayvanların yemlerine ve içme sularına katılmaktadır (Yibar ve Soyutemiz 2013). β -laktam, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, spektinomisin, linkozamid, sülfonamid, nitrofuran, nitroimidazol, trimethoprim, polimiksin, kinolon ve makrosiklik grubu ilaçlar belirtilen amaçlar için sahada en fazla kullanılan ilaçlardır. Ülkemiz, hayvansal gıda teminini entansif hayvancılıktan sağlamaktadır. Ülkemiz üreticilerinin de yüksek verim elde etmek ve büyütme faktörü olarak

kullandıkları hormon, ilaç ve antibiyotikler için belirlenen yasal zorunluluklara uyup uymadıkları da tam olarak denetlenememektedir. Bu bağlamda, entansif üretim içinde kullanılan teknikler çoğu zaman hayvan haklarını ve sağlığını, dolayısıyla da insan sağlığını ikinci plana atmaktadır (Duru ve Şahin 2004). Dünya antibakteriyel ilaç pazarının 100.000 ile 200.000 ton arasında olduğu tahmin edilmektedir. Son 50 yıl içinde 1 milyon ton antibakteriyel madde biyosfere salınmış ve bunun %50 kadarının veteriner ve tarım kaynaklı olduğu belirlenmiştir (Can ve Çelik 2008). Ülkemizde veteriner ilaçlarının kullanım miktarına ilişkin sağlıklı veriler bulunmamaktadır. Fakat antibiyotik kullanımının son derece yaygın olması, ilaçların bilinçsiz kullanımı, yasal bekleme sürelerine uyulmaması, kontrol mekanizması yetersizliğinden antibiyotik kalıntısı içeren hayvansal ürünler yoluyla birçok tehlike ile karşı karşıya kalınmaktadır (Yarsan 2012). Sülfonamidler veterinerlikte kullanılan antibiyotikler içindeki önemli konumuyla günümüze kadar pek çok araştırmaya konu olmuştur. Teknoloji ve bilimdeki yenilikler doğrultusunda yapılan çalışmamda ilerideki konu başlıklarında sülfonamidlerin kapsamlı anlatımı verilmiştir.

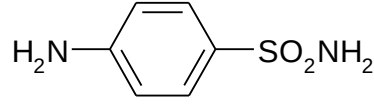
2.1.1.Sülfonamid Grubu Antibiyotikler

1930’larda Alman kimyagerler bakterileri renklendirmek için kullanılan bazı boyaların bakterilerin büyümesini durdurduğunu gözlemlemişlerdir. Gerhard Domagk isimli Alman patolojist *Streptococcus* ile hasta edilmiş farelere, sülfamidokrysoidin (ticari ismi, Prontosil) isimli kırmızı renkli bir azo boya verildiğinde farelerin yaşadığını gözlemlemiştir (Anonim 2004) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Prontosil’in kimyasal yapısı

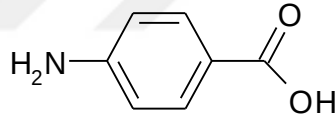
Domagk, kızı septisemi hastalığına yakalandığında boyayı kızına enjekte edecek kadar Prontosil’in antibiyotik özelliğine inanmıştır. Yaygın olarak kullanılan ilk kemoterapötik ajan, ilk oral antibiyotik olan prontosil’in kâşifi Gerhard Domagk 1939 yılında Nobel Tıp Ödülü almıştır (Raju 1999). Prontosilin canlı dışında antibiyotik etkisi yoktur. Daha sonradan prontosil ilaç aktif kısmının sülfanilamid (Şekil 2.2) tarafı olduğu belirlenmiştir. Canlı içinde bu bileşiğin azo bağları kırılarak sülfanilamide dönüşmektedir.



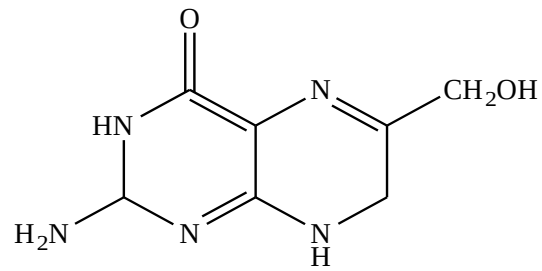
Şekil 2.2 Sulfanilamidin kimyasal yapı

Sulfonamidlerin antibakteriyel özelliğinden dolayı bilim adamlarınca binlerce türevi sentezlenmiştir. Ancak yapılan çalışmalar sonucu sulfonamidlerin bakteriyi öldürmediği, gelişmesini ve çoğalmasını önlediği görülmüştür. Dihidropteroat sentetaz enzimi *p*-aminobenzoik asidi (PABA), dihidropteroik aside dönüştürmekte, bu asitte DNA'nın yapı taşlarından olan timin ve pürin bazlarının sentezi için gerekli olan folik asit sentezinde kullanılmaktadır.

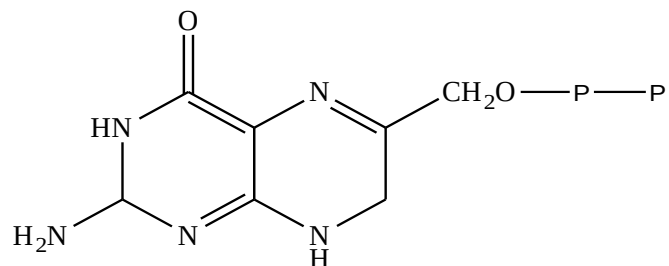
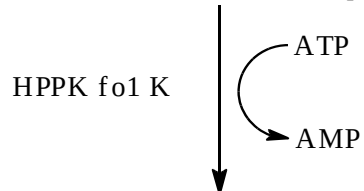
Yapısal ve moleküler boyut olarak olarak *p*-aminobenzoik aside (PABA) (Şekil 2.3) benzemesi nedeniyle sulfanilamid, dihidropteroat sentetaz enzimini inhibe ederek bakterinin çoğalmasını önlemektedir (Baran ve ark 2011). Sulfonamidlerin etki mekanizması Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



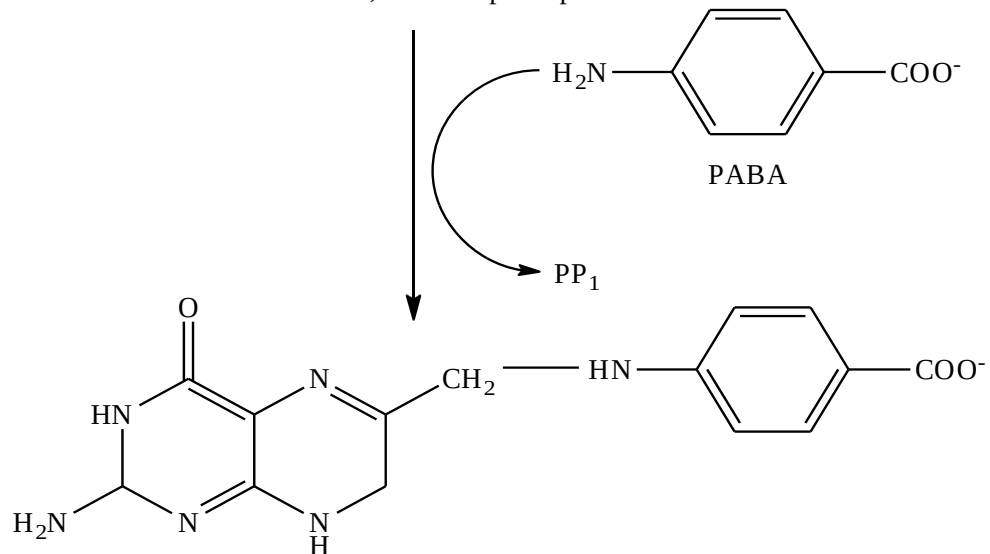
Şekil 2.3 *p*-aminobenzoik asit (PABA)



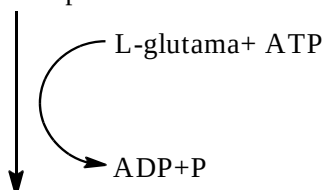
6-hidroksimetil-7,8-dihidropterin

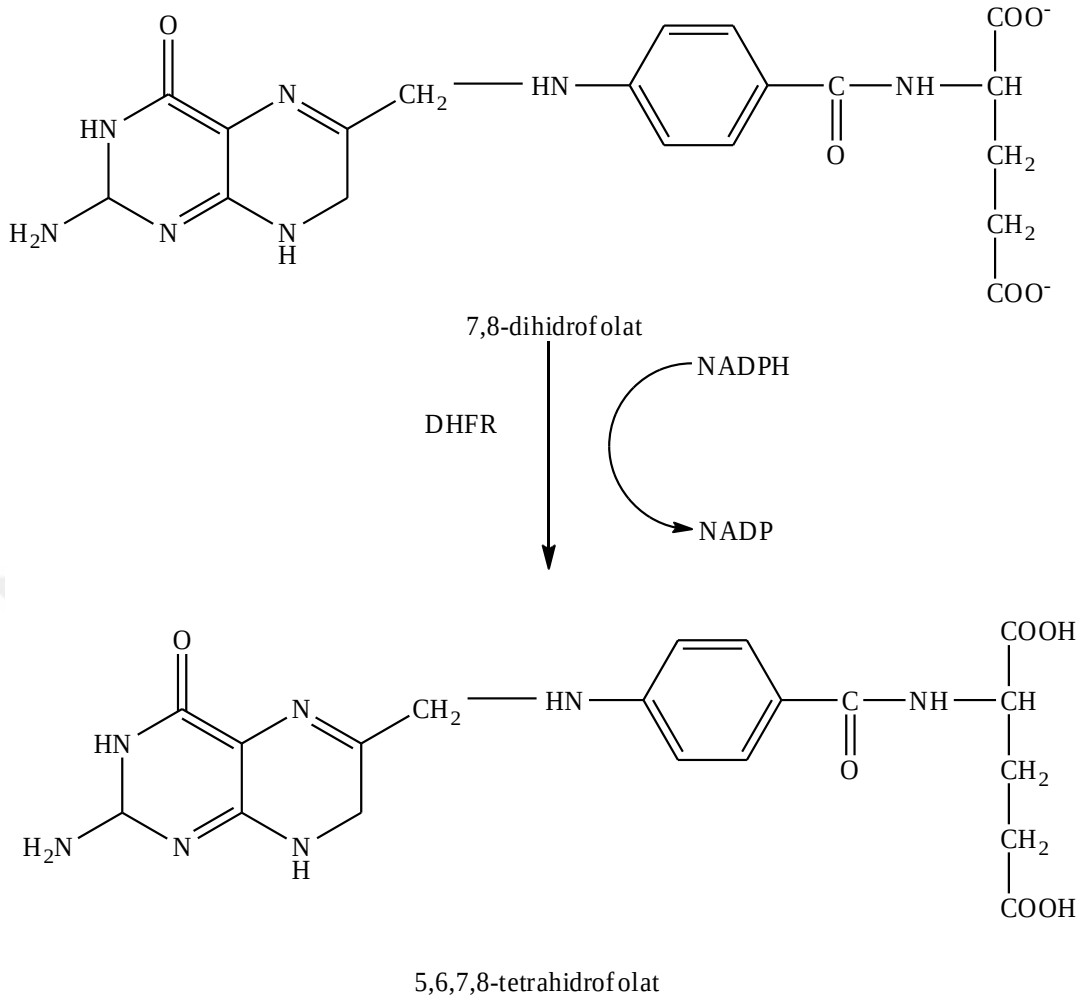


6-hidroksimetil-7,8-dihidropterinpirofosfat



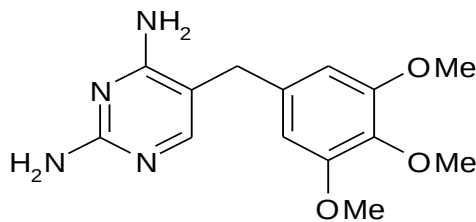
7-hidroksipteroat





Şekil 2.4 Sülfonamidlerin etki mekanizması (Yılmaz 2011)

Bakterilerin direnç geliştirmelerinden dolayı, bazı durumlarda sülfonamidler trimetoprim (Şekil 2.5) ile karıştırılarak daha etkin bir hale getirilir. Günümüzde sülfonamidlerle birlikte trimetoprim kullanımı en çok yaygın kombinasyondur. Diaminoprimidin olan trimetoprim trimetoksibenzil-primidin yapısındadır.



Şekil 2.5 Trimetoprim kimyasal formülü

En aktif sülfonamidler heterosiklik radikaller içerirler. Birçok sülfonamidler, pirimidin, piridazin ve diğer heterosiklikleri temelden oluşur. Sülfonamid bileşiklerinde, amino grubunun para pozisyonu oldukça önemlidir. Para-amino grubunun meta ve orto amino grubuna dönüşmesi, sülfonamid bileşiğinin bakteriostatik etkisini yok etmektedir. Eğer amino grubundaki hidrojen atomu değişik radikallerle yer değiştirirse, sülfonamidler antibiyotik özelliğini yitirmektedir. Aromatik halkaya ilave fonksiyonel gruplar sülfonamidlerin fizyolojik etkisini azaltır veya tamamen kaybettirir (Dmitrienko ve ark. 2014).

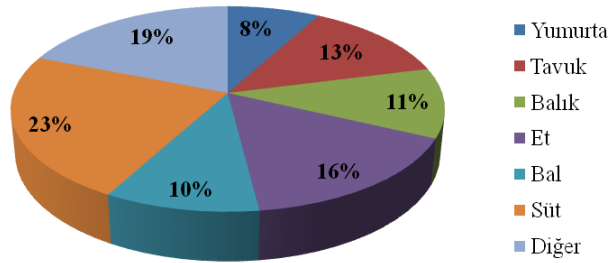
Sülfonamidlerin, insan vücuduna alınması enzim aktivitesini baskılamamanın yanı sıra, bağırsak florasını değiştirir ve patojenlerin bağırsak florasında sürdürülebilir formlarının oluşmasında kimyasal bir seçici gibi rol oynar. Ayrıca sülfametazin gibi bazı sülfonamidlerin kansorejen etkisi de vardır (Garcia-Galân ve ark. 2009). Sülfakuinoksalin gibi sülfonamidler, bağırsakta absorbe olurlar. Plasentayı geçerler. Çok azı serebrospinal sıvıya geçer. Sülfonamidlerin süte geçmesi ise proteinlere bağlanmasına ve pKa değerlerine göre değişkenlik gösterir (Samanidou ve ark. 2008).

Sülfonamidler arasında en çok yaygın kullanımı olan bileşik sülfametazindir. Analiz örneklerinin %50'sinde görülmüştür (Baran ve ark. 2011). Bütün sülfonamidler beyaz veya hafifçe sarı renkte, kokusuz bileşiklerdir. Bazılarının tadı acıdır. Bu bileşiklerin çoğu suda kolayca çözünmez. Sülfonamidlerin asitte veya alkalide çözünürlüğü amfoterik özelliklerine bağlıdır. Bu amfoterik özelliği bazik aromatik amin grubu ($pK_a=2-2,5$) ve değişken hidrojen atomu içeren amid grubunun asidik özelliğine ($pK_a=5-8$) dayanmaktadır. Ancak sülfonamidlerin asidik özellikleri bazik özelliklerinden daha belirgindir (Kammerer 2009).

Ksenobiyotiklerin (örneğin, sülfonamidler ve diğer doğal ve sentetik kimyasallar) ortadan kaldırılması için karaciğer ve diğer dokulardaki enzimler tarafından katalize edilen, biyotransformasyon olarak bilinen bir süreçle suda çözünen kimyasallara dönüştürülmeleri gerekmektedir. Ksenobiyotik enzimleri, biyotransformasyonla sülfonamidlere çeşitli fonksiyonel grupları bağlayarak sülfonamid metabolitlerini oluşturmaktadır. Bu tür biyotransformasyonlar iki gruba ayrılır. Faz I, hidroksi, tiol, amin, karboksil gruplarının bağlandığı reaksiyonları içermektedir. Bu sayede bileşiğin polaritesi artar ve asidik karakteri daha da artar. Hidroksi metabolitler %2,5 ile %39,5 ana bileşiğin aktivitesine sahiptir. Faz II'de ise, konjugasyon reaksiyonları meydana gelir. Bu reaksiyonlar, glukuronidasyon, sülfonasyon (genellikle sülfonlama olarak bilinir), asetilasyon, metilasyon reaksiyonlarını,

aminoasit konjugasyonları (glisin, taurin ve glutamik asit gibi) ve glutatyon konjugasyonlarını (merkaptonik asit sentezi) kapsamaktadır. N4-asetil metabolitlerin antimikrobiyal aktivitesi yoktur. Sülfonamid metabolitleri folik asit sentezinde ana ilaçla yarışır. Fakat bakteri hücrelerine çok az zararlı etkisi vardır. Genel olarak sülfonamid metabolitleri böbreklerden orijinal sülfonamidlere göre daha hızlı uzaklaştırılır. Metabolitlerin oluşumu çok çeşitlidir bu da birçok faktöre bağlıdır (Parkinson ve ark. 2013).

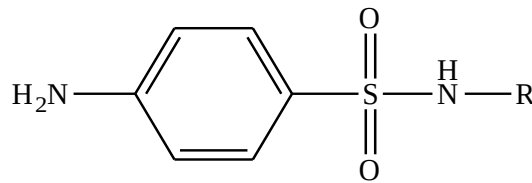
Birçok ülkede sülfonamidler için maksimum kalıntı limiti 100 µg/kg ve sütte 100 µg/L'dir. Ülkemizde Gıda ve Kontrol Daire Başkanlığı Ulusal Kalıntı İzleme Planı (Anonim 2015a)'e göre sütte LC-MS/MS doğrulama metodu teşhis seviyesi her bir sülfonamid için 20 µg/kg, karar limiti toplamda 100 µg/kg'dır. Ette doğrulama metodu teşhis seviyesi sülfatiazol için 40 µg/kg, diğer sülfonamidlerin her biri için 20 µg/kg'dır. Ette sülfonamid grubundaki maddelerin toplam miktarı 100 µg/kg'ı geçemez. Son 5 yıldan uzun süredir tüm dünyada sülfonamid analizleri yapılan gıda gruplarının yüzdesi Şekil 2.6'da gösterilmiştir (Dmitrienko ve ark. 2014). Bu gıda grupları et, süt, balık, yumurta, bal ile bebek gıdalarıdır. Dmitrienko ve ark (2014) çalışmalarına göre sülfonamidlerin gıdalarda bulunma sıklığı %20 civarındadır.



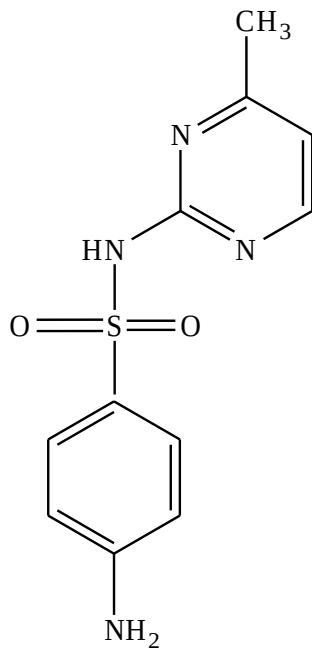
Şekil 2.6 Sülfonamid analizleri yapılan gıda grupları (Dmitrienko ve ark. 2014).

2.1.2. Sülfonamidlerin kimyasal yapıları

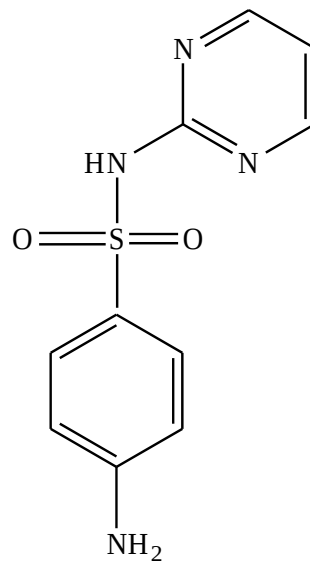
Sülfonamidlerin kimyasal formülü Şekil 2.7'de gösterilmiştir. Bu tez çalışmasının konusu olan 14 adet sülfonamid bileşiklerinin kimyasal yapısı Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



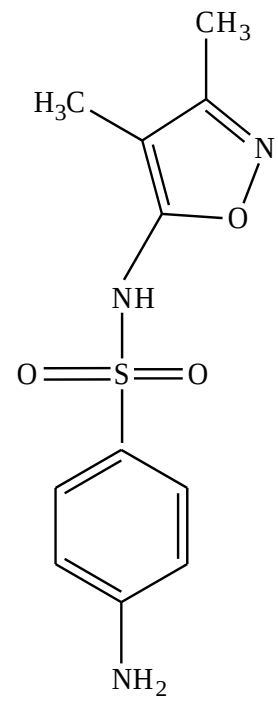
Şekil 2.7 Sülfonamidlerin kimyasal formülü



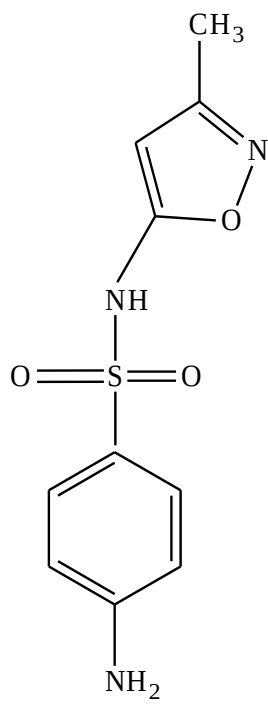
Sülfamerazin



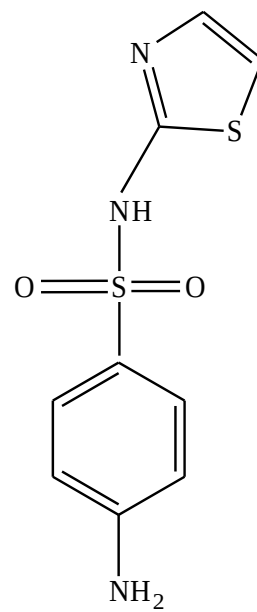
Sülfadiazin



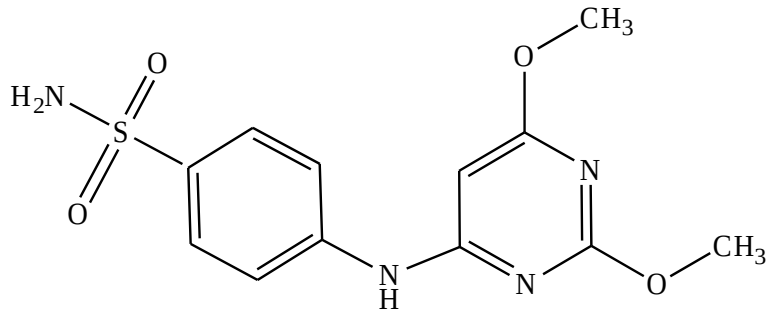
Sülfisoksazol



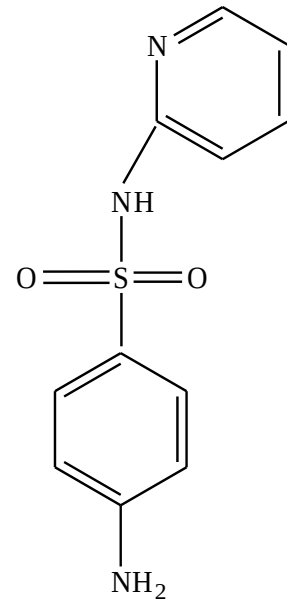
Sülfametoksazol



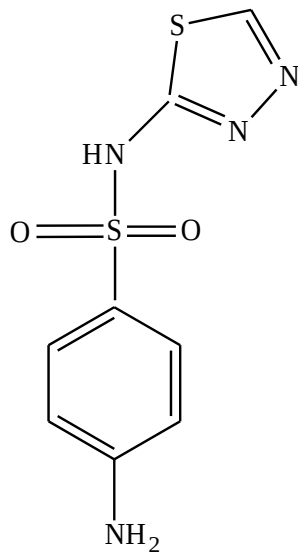
Sülfatiazol



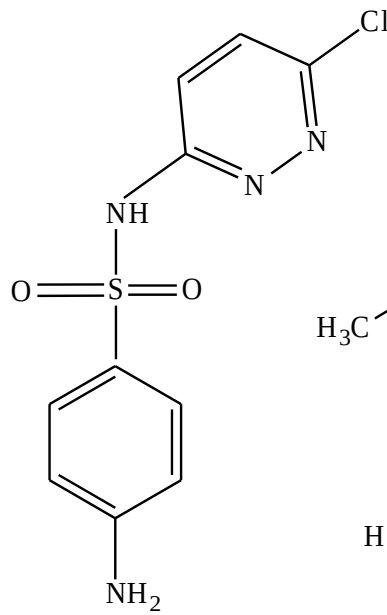
Sülfadimetoksin



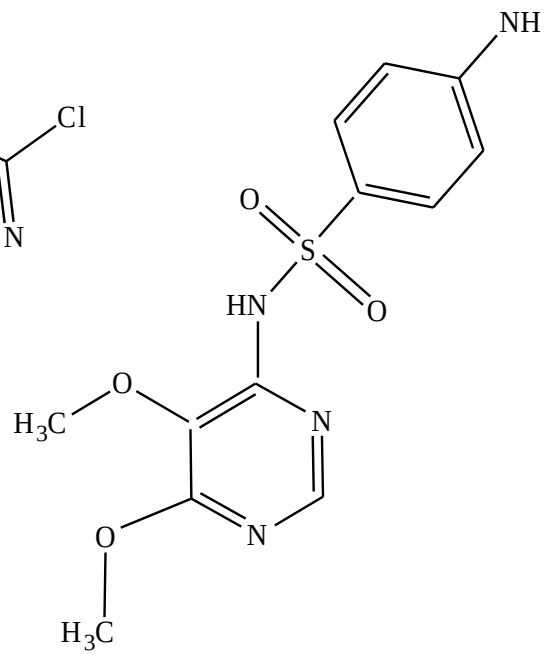
Sülfapridin



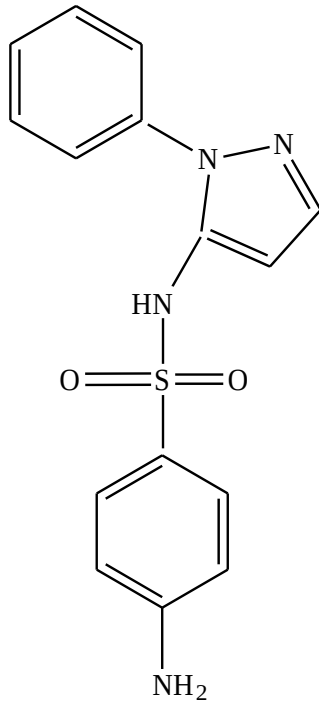
Sülfametizol



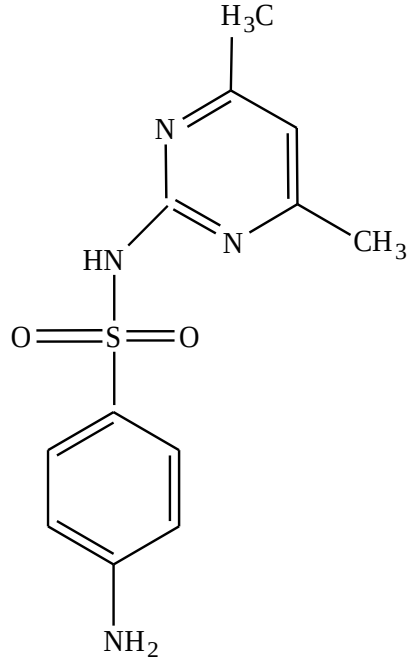
Sülfakloropridazin



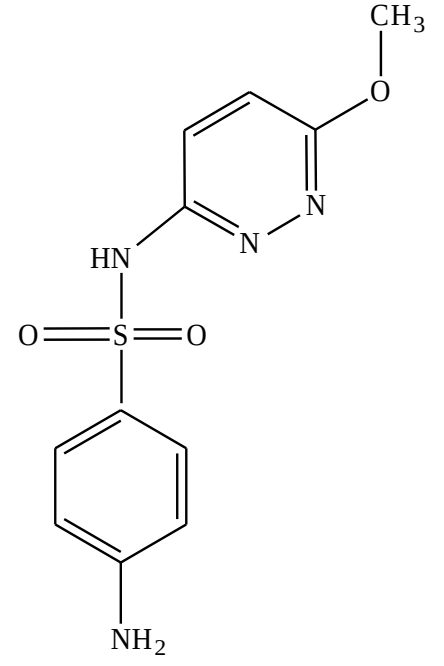
Sülfadoksin



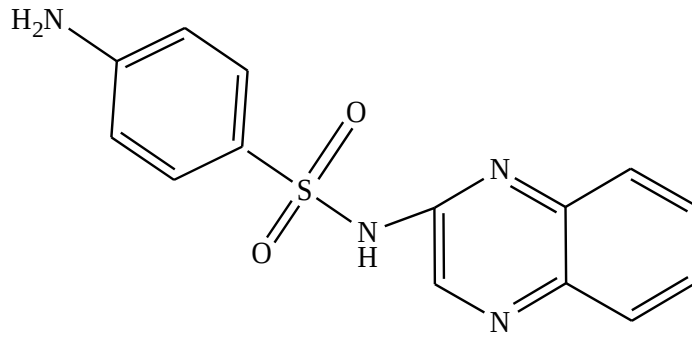
Sülfafenazol



Sülfametazin



Sülfametoksipridazin



Sülfakuinoksalin

Şekil 2.8 14 adet sülfonamid bileşiklerinin kimyasal yapıları (Yılmaz 2011)

2.1.3.Sülfonamidlerin Sınıflandırılması

Sülfonamidler, kimyasal yapılarına, aktivite sürelerine, aktivite spektrumuna ve terapötik uygulamalarına göre sınıflandırılırlar. Genel sınıflandırma terapötik uygulamalarına göre. Aktivite sürelerine göre sülfonamidler üç gruba ayrılır (Akkan 1997).

2.1.3.1.Kısa ve orta etki süreli sülfonamidler

Kısa etkili sülfonamidler hızlı absorbe olurlar ve hızlı dışarı atılırlar. Yarı ömürleri 4-7 saattir. Bunlar sistemik enfeksiyonlarda tercih edilirler. Bu gruptaki en önemli bileşikler sülfasitin, sülfametizol, sülfisoksazol, sülfometazin, sülfasetamit, sülfakloropridazin, sülfapridin, sülfatidol, sülfamerazin, sülfamoksol, sülfaproksilin, sülfapridin, sülfatiazol ve sülfisomidindir. Orta etkili sülfonamidler uzun süreli tedavi gerektiren enfeksiyonlar için kullanılırlar. Bunlar kısa etki süreliyle kıyasla daha yavaş absorblanıp atılırlar. Yarı ömürleri 10-12 saattir. Günde iki defa verilirler. Uzun süreli tedavi gerektiren enfeksiyonlarda özellikle üriner enfeksiyonlarda kullanılırlar. Bu gruptaki önemli bileşikler sülfametoksazol, sülfadiazin ve sülfafenazoldur (Akgün ve ark. 2004).

2.1.3.2.Uzun etkili (depo) sülfonamidler

Uzun etkili sülfonamidler, hızlı absorbe olurlar ve yavaşça dışarı atılırlar. Uzun etkili sülfonamidlere örnek olarak sülfadoksin ve sülfametoksipiridazin verilebilir. Yarı ömürleri 35-40 saattir. Sülfalen ve sülfadoksinin yarı ömürleri sırasıyla 65 ve 179 saattir. Uzun etki süreli sülfonamidler günde bir veya iki kez verilirler (Akgün ve ark. 2004).

2.1.3.3.Absorbe olmayan sülfonamidler

Absorbe olmayan sülfonamidlere örnek olarak fitalilsülfatiazol, süksinilsülfatiazol, sulfaguanidin verilebilir.

2.1.3.4.Özel kullanımlı sülfonamidler

Tıpta özel tedavilerde kullanılan sülfonamidlerdir. Lokal kullanılanlara örnek olarak sülfasetamid; yanıkta gümüş sülfadiazin, marfenil kullanılır. Ülseratif kolitte sülfasalazin, dermatitis herpetiformiste ise sülfapridin kullanılmaktadır (Akkan 1997).

2.2.Gıda Değeri Olan Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımı

Veteriner hekimlikte antibiyotiklerin bilinçli kullanımı son derece önemlidir. Antibiyotik kullanımı hayvan ıslahı, refahı, hijyen, besleme ve aşılama sistemlerinden ayrı olarak düşünülmemelidir (Yarsan 2013). Gıda değeri olan hayvanlarda ana ilaç grupları bakımından toplam tüketimin %77'sini bakteriyel (%33) ve paraziter hastalıklarla mücadelede kullanılan ilaçlar (%28) ile hayvansal verimin arttırılmasını destekleyici ürünler (%16) oluşturmaktadır (Visad 2006).

Gıda değeri olan hayvanlarda en sık kullanılan antibiyotikler; β -laktam (penisilinler ve sefalosporinler), tetrasiklin grubu, kloramfenikol, makrolidler, spektinomisin, linkozamid, sülfonamid, nitrofuran, nitroimidazol, trimethoprim, polimiksin, kinolon ve makrosiklik (Ansamisin, glikopeptidler ve aminoglikozidler) gruplarıdır (Chafer ve ark. 2010).

İlk olarak antibiyotiklerin anabolik etkiye sahip oldukları 1940'lı yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde civciv rasyonlarına belli miktarda katıldığında canlı ağırlık artışında hızlanma sağlanmasıyla gözlemlendiği belirtilmiştir. Büyütme faktörü olarak kullanılan antibiyotik ve benzeri maddelerin etkileri birkaç görüş ile ifade edilmiştir. Bu görüşlere göre;

1. Besinlerin emilimini engelleyen zehirli metabolitlerin üretimini engelleyerek,
2. Gastrointestinal sistemdeki patojen mikroorganizmaların gelişimini önleyerek,
3. Subklinik infeksiyonları azaltarak veya önleyerek etkili oldukları düşünülmektedir.

Antibiyotiklerin aşırı ve uygun olmayan kullanımları ile bu maddelere karşı dirençli bakterilerin gelişmesi sonucu, Avrupa Birliği tarafından antibiyotik kökenli büyütme faktörlerinin kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde kullanılmasının 1998-1999 yıllarında geniş ölçüde yasaklandığı bildirilmiştir. Son yıllarda araştırmacılar, antibiyotiklere alternatif olabilecek doğal ve gelişmeyi hızlandırıcı madde arayışı içine girmişlerdir. Bu amaçla probiyotikler, organik asitler ve enzimlerin alternatif olarak kullanımı güncellik kazanmıştır (Can ve Çelik 2008).

2.3.Gıda Değeri Olan Hayvanlarda Sülfonamidlerin Kullanımı

Sülfonamidler sistemik olarak kullanılan ilk antibiyotiklerdir. Sentetik olarak hazırlanırlar. Sülfonamidler tüm doku, vücut boşlukları, idrar, safra ve süt de dâhil tüm salgılarda etkili yoğunluğa ulaşabilirler. İnsan ya da hayvan plazmalarındaki 50-150 $\mu\text{g/mL}$

yoğunlukları etkili ve güvenli olarak kabul edilir (Kaya 2007). Sülfonamidler, veterinerlikte iki farklı dozda kullanılır (Combs 1997);

- Tedavi edici doz; hastalıklı hayvana yüksek dozda kullanımı gerektirir.
- Tedavi altı doz (hastalık önleyici tedavideki kullanım); sağlıklı hayvana yüksek dozda kullanımı gerektirir. Genellikle sülfonamidler subterapotik (tedavi altı) dozlarda koruyucu olarak kullanılır. Hayvan yemine ve suyuna ilave edilerek kullanılır. Subterapotik uygulama, genellikle hastalıktan korumada, yemin etkinliğini arttırmada ve hayvan ağırlığını arttırmada kullanılır. Çizelge 2.1’de hayvanlarda sülfonamid dozaj örnekleri verilmiş olup, Çizelge 2.2’de ise hayvanlarda sülfonamid kombinasyonlarının dozajları gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Hayvanlarda sülfonamid dozaj örnekleri (Prescott ve ark. 2013)

İlaç	Uygulama yolu	Doz (mg/kg)	Uygulama Aralığı (saat)	Yorum
Kısa etkili Sülfadiazin, sulfametazin, trisulfapyrimidin	IV, PO	50-60	12	Çift ilk doz
Sulfametoksazol	PO	50	12	Çift ilk doz
Orta etkili sulfadimetoksin	PO, IV, IM, SC	27,5	24	Çift ilk doz
Sürekli salınım, sığır	PO	137,5	96	
Sülfadiazin	PO, IV	50	12	Çift ilk doz
Sülfisoksazol	PO	50	8	İdrar yolu enfeksiyonları
Bağırsak aktif fitalilsülfatiazol	PO	100	12	-
Özel kullanımlı salisilazosulfapiridin	PO	25	12	-
Gümüş sülfadiazin	Topikal	-	-	-

IV: damar yoluyla, IM: kasa enjeksiyon, SC: ciltaltı uygulama, PO: ağız yoluyla

Çizelge 2.2 Hayvanlarda sülfonamid kombinasyonlarının dozajları (Prescott ve ark. 2013)

İlaç	Uygulama yolu	Doz (mg/kg)	Uygulama aralığı (saat)	Yorum
Trimetoprim-sülfonamid	PO, IV, IM	15-30	12-24	
Ormetoprim-sulfadimetoksin	PO	27,5	24	Çift ilk doz
Baquiloprim-sulfadimetoksin				
Sığır, domuz	IM	10	24	

IV: damar yoluyla, IM: kasa enjeksiyon, SC: ciltaltı uygulama, PO: ağız yoluyla

Veterinerlikte oldukça fazla sülfonamid preparatı kullanılsa da bunların çoğu sülfametazinin değişik formlarıdır. Oral veya parenteral alındığında etkili plazma

konsantrasyonlarına erişebilirler. Alkaliliklerinden dolayı çoğu parenteral preparat sadece IV (damar yolu) enjeksiyon ile uygulanmalıdır. Sülfometazin tedavisi IV hazırlama dozu 100 mg/kg ile başlamalı ve etkili konsantrasyonlar 12 saatlik aralıklarla 50 mg/kg PO dozudur. Sülfometazinin en az bir süre uzatmalı oral preparatı buzağılarda kullanıma uygundur. Bu preparat koyun ve keçiye de uygulanabilir. Bu tek bir dozun 36-48 saat etkili bir seviyede olması bakım terapisinin uygun şeklidir. Sığır, koyun, keçi klinik uygulamalarında yaygın direnç, bu hayvanlarda sülfonamid kullanımını sınırlar ve bu ajanları trimetoprim ile kombinasyon halinde vermek en iyisidir. Oral olarak uygulanan, uzun etkili, sürekli salımlı dozaj formları, 3-5 gün boyunca etkili plazma konsantrasyonlarına neden olur. Böyle bir preparat, sığır Mannheimia ve Pasteurella'da bildirilen direnç açısından bakıldığında, besleyici kanal pnömonisinin önlenmesi ve tedavisini değerlendiren klinik araştırmalarda etkili olmuştur. Sülfonamidler, sığırlarda interdigital necrobacillosis ve coccidiosis'in tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır. Sülfadimetoksin, Birleşik Devletler'de 20 aydan uzun süren süt ineklerinde kullanılmak üzere onaylanmış tek sülfonamiddir. Süt ineklerinde etiket dışı kullanım yasaktır. Sürekli salımlı oral sülfametazin ve ağızdan verilen pirimetamin (günde bir kez 0,5 mg/kg) koyunlarda Toxoplasma düşük salgınını önlemede tercih edilen ilaçlardandır. Performansı artırmak ve klostridial enterotokemileri önlemek için besleyici lümenlerde chlortetrasiklinlerle sülfonamidler kullanılmıştır (Prescott ve ark. 2013).

Sığırların solunum sistemi hastalıklarının sağaltımında daha çok sülfonamidlerin diaminoprimidin (DAP) türevleri (trimetoprim, ormetoprim ve baquiloprim) ile 5/1 (5 kısım sülfonamid +1 kısım DAP türevi) oranında kombine olarak hazırlanmış preparatları kullanılır. Tek başlarına bakterilerde folik asit sentezini engelleyerek bakteriyostatik etki gösteren bu maddeler, kombinasyon halinde folik asit sentezini iki ayrı noktadan keserek bakterisit etki gösterirler. Kombinasyonların etki spektrumları daha geniş ve direnç gelişimi daha azdır. Ülkemizde sülfonamid-trimetoprim kombinasyonları bulunmaktadır (Yazar 2009). Diaminopiridinler, sulfonamidlerden 20-100 kat daha aktiftir, bu nedenle kombinasyonlar, İnsan serumunda 1:20 oranında bir oran verecek şekilde formüle edilirler. Bu oran, diaminopiridinlerin (lipid-çözünür organik bazlar) dokularda yoğunlaştığı, buna karşılık sülfonamidlerin (zayıf organik asitler) büyük oranda hücre dışı sıvılarda kalmaktadır (Prescott ve ark. 2013). İlaç kombinasyonları buzağılarda salmonellosis, ayrıca ayırt edilmemiş ishal, bakteriyel pnömani, ayakta çürüme ve septisemik kolibasilloz tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır (White 1998). Menenjit için olağan dozda günde 3-4 kez ilaç kombinasyonu uygulanır. Akut mastit tedavisinde kullanıldığında, İM enjeksiyonundan sonra zayıf

biyoyararlanımı ve nispeten zayıf meme penetrasyonu nedeniyle ilacın yüksek dozda IV verilmesi gerekir; Akut mastit için her 12 saatte bir 48-50 mg / kg'lık bir dozaj uygundur. Özellikle steroidal olmayan anti-inflamatuar ilaçlarla kombine edildiğinde, trimetoprim-sülfonamidin koliform mastit tedavisinde faydalı bir etkisi kaydedilmiştir (Shpigel ve ark., 1998). Sığırlarda diğer kullanımlar idrar yolu enfeksiyonları ve karışık aerobe-anaerob enfeksiyonlarının tedavisini içermektedir (Postparturient metritis'de ortaya çıkan gibi). İlaç, ruminantlarda *L. monocytogenes* ensefalitinin tedavisinde potansiyel ancak kanıtlanmamış kullanımı vardır. Keçilerde ve koyunlarda özel bir uygulama, toksoplazma kürtajının önlenmesidir (Prescott 2013).

Hayvanlara uygulanan antibiyotiklerin bir kısmı dokular tarafından tutulmakta, büyük bir kısmı ise süt ve idrar yoluyla dışarı atılmaktadır. Veterinerlik uygulamalarında sülfonamidlerin yüksek veya sürekli dozda kullanımı kalıntılara neden olmaktadır. Danimarka'da kg et başına tüketilen sülfonamid miktarı 4,82 mg domuzda, sığırlarda 17,2 mg, broylerde 0,033 mg ve 58,5 mg balıkta bulunmuştur (Baran ve ark. 2011). Kesimden önce bekletme süresine uyulmaması, hastalık önleyici tedavide kötü muamele sülfonamid kalıntılarına yol açmaktadır. İlaçla ilgili herhangi bir kayıt yoksa kanatlı ve memeliler için kesim öncesi bekletme süresi geçici olarak 28 gün olarak belirlenir (Yarsan 2012). Yumurta ve sütlerin tüketime sunulması için ise 7 gün beklenmelidir (Bilici, 2008).

Genel olarak, antibiyotik uygulanan hayvanların sütleri son uygulamayı takip eden 72-96 saat içinde antibiyotik içerebilmektedir (Acar ve Uygun 2007). Sütte antibiyotik kalıntılarının %90'ı meme içi yolla uygulanması sonrası süütün kullanılmama süresine uyulmamasından kaynaklandığı, bu yolla meydana gelen kalıntıların %60'ının laktasyon dönemi sırasında, %30'unun kuru dönem mastitis tedavileri sonucunda olduğu bildirilmektedir (Taşçı 2016). Antibiyotiklerin süte geçiş ve sütte bulunma süreleri, antibiyotik çeşidi ve bileşimi, uygulanan doz ve uygulama şekli, sağım sayısı, hayvan fizyolojisi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Seğmenoğlu 2014).

2.4.Gıda Değeri Olan Hayvanlarda İlaç Kullanımına ve Bunların Kalıntılarının İzlenmesine Dair Mevzuat

Ulusal Kalıntı İzleme Planı, hayvan türlerine göre belirlenen madde ve ürün grupları ile bu maddelerin kalıntılarının varlığının tespiti için alınacak önlemleri içermektedir. Bu programların uygulamasında Avrupa Birliği mevzuatı (96/23/EC ve 96/22/EC sayılı Konsey Direktifleri ile 98/179/EC sayılı Konsey Kararı) ile uyumlaştırılması tamamlanmış ulusal mevzuatımız dikkate alınmaktadır. Bu kapsamda, ulusal kalıntı kontrolü “Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler İle Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik” (Anonim 2011b) ve bu yönetmeliğe bağlı “2013/09 sayılı Canlı Hayvan ve Hayvansal Ürünlerde Kalıntı İzleme Genelgesi”nde (Anonim 2013b) belirtilen kurallara göre hazırlanan ulusal kalıntı izleme planı çerçevesinde yürütülmektedir. Ulusal Kalıntı Planı (Anonim 2015a)’e göre tayin edilmesi gereken sülfonamidler, matriksi, yasal limitleri Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.3 Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmeliğine göre tayin edilmesi gereken sülfonamidler ve yasal limitleri

Aranacak Madde /Kalıntı	Analiz Edilecek Matriks	İzleme Metodu	Doğrulama Metodu	İzleme Metodu Teşhis Seviyesi [µg/kg]	Doğrulama Metodu Teşhis Seviyesi [µg/kg]	Karar Limiti (Uygun Olmayan Sonuç Kararı Vermek İçin Limit Değer) [µg/kg]
Sulfamezatin	Kas, karaciğer	Charm II	LC-MS-MS	100	20	Sülfonamid grubunda yer alan maddelerin toplamı >100
Sulfametaksazole	Kas, karaciğer	Charm II	LC-MS-MS	100	20	
Sulfatiazol	Kas, karaciğer	Charm II	LC-MS-MS	80	40	
Sulfadiazin	Kas, karaciğer	Charm II	LC-MS-MS	40	20	
Sulfamerazine	Kas, karaciğer	Charm II	LC-MS-MS	40	20	
Sülfadimetoksin	Kas, karaciğer	Charm II	LC-MS-MS	40	20	
Sulfakloropridazin	Kas, karaciğer	Charm II	LC-MS-MS	200	20	
Sülfadiazin	İnek sütü	Charm II	LC-MSMS	50	20	
Sülfamezatin	İnek sütü	Charm II	LC-MSMS	94	20	
Sülfametaksazol	İnek sütü	Charm II	LC-MSMS	30	20	
Sulfamerazin	İnek sütü	Charm II	LC-MSMS	50	20	
Sulfatiazol	İnek sütü	Charm II	LC-MSMS	80	20	
Sülfadimetoksin	İnek sütü	Charm II	LC-MSMS	40	20	

Bu mevzuat, canlı hayvan ve hayvansal ürünlerde kalıntı kontrolünün uygulamasında uyulması gereken şartları belirlemektedir. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın merkez teşkilatlarından biri olan Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü, kalıntı izleme planlarının oluşturulmasından ve uygulamaların üst gözetiminden sorumludur. Ulusal Kalıntı İzleme Planı, kanatlı hayvan etleri ile kırmızı eti, su ürünleri yetiştiricilik ürünlerini, çiğ süt, yumurta ve bal ürünlerini kapsamaktadır. Örnekleme sıklığı, yönetmelikte belirtilen kurallarla uyumlu olması gerekmektedir. Örnekler, çiftliklerden ve/veya birincil ürün tesislerinden canlı hayvanlardan ve/veya hayvansal ürünlerden alınmaktadır. Analizler Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın yetkilendirdiği laboratuvarlar tarafından gerçekleştirilir. Avrupa Birliği'ne uyum çerçevesinde laboratuvarlar tarafından bu kapsamda yapılan analizlerde validasyonlar 17 Ağustos 2002 tarihli 2002/657/EC sayılı AB kararına göre gerçekleştirilmektedir (Anonim 2015a).

17 Aralık 2011 tarihli, 28145 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan "Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik" (Anonim 2011b) gıda güvenilirliğini sağlayarak tüketici sağlığının korunmasını temin etmek için, canlı hayvan ve hayvansal birincil ürünlerde belirli maddeler ve bunların kalıntılarının izlenmesi ile ilgili usul ve esasları düzenlemektir. Canlı hayvanlar, bunların dışkıları ve vücut sıvıları, dokuları, hayvansal ürünler, hayvan yemleri ve içme sularında aşağıda listede yer alan maddeler ve kalıntıların varlığını tespit etmek amacı ile hayvanlar ve hayvansal birincil ürünlerin üretim süreci bu bölümde yer alan hükümlere uygun olarak izlenmektedir. 2011/28145 yönetmeliğine göre, veteriner tıbbi ürünler aşağıdaki gibi iki gruba ayrılmıştır;

GRUP A-Anabolik etkiye sahip maddeler ve kullanımına izin verilmeyen maddeler;

- (1)Stilbenler, stilben türevleri ve bunların tuzları ve esterleri,
- (2)Antitroid ajanları,
- (3)Steroidler,
- (4)Zeranol içeren resorsilik asit laktonları,
- (5)Beta agonistler,
- (6)Hangi seviyede olursa olsun tüketici sağlığını tehlikeye sokan ve gıdalarda hiçbir seviyede bulunmaması gereken farmakolojik aktif maddeleri.

GRUP B-Veteriner ilaçları ⁽¹⁾ ve bulaşanlar;

(1)Sülfonamidler ve kinolonları da içeren antibakteriyal maddeler

(2)Diğer veteriner ilaçları

- a.Antihelmintikler,
- b.Nitroimidazoller de içeren antikoksidiyaller,
- c.Karbamatlılar ve piretroidler,
- d.Sedatifler,
- e.Steroid olmayan antienflamatuvar ilaçlar,
- f.Diğer farmakolojik aktif maddeler.

(3)Diğer maddeler ve çevresel bulaşanlar

- a.PcBleri de içeren organik klorlu bileşikler,
- b.Organik fosforlu bileşikler,
- c.Kimyasal elementler,
- d.Mikotoksinler,
- e.Boyalar,
- f.Diğerleri.

(¹) Veteriner hekimliği alanında kullanılabilen ruhsatsız maddeleri de içeren.

1997 yılında İngiltere'de yayınlanan "Hayvanlar, et ve et ürünleri yönetmeliği"ne göre, herhangi bir veteriner tıbbi ürün uygulanmış hayvanın, yasal arınma süresi dolmadan insan tüketimine sunulmak üzere satılması ve kesim için tedarik edilmesi suç sayılmaktadır. Mevzuat hayvan yetiştiricilerini ve tüm veteriner ilaç tedarikçilerini kapsamaktadır. Bu yönetmelik, Avrupa Birliği mevzuatına uygun olarak sürekli güncellenmiş, en son güncelleme 2015 yılında yapılmıştır (Anonim 2015b).

Yönetmeliğe göre, veteriner tıbbi ürün kullanımı ile ilgili olarak;

- Ruhsatsız ürünlerin satışını, bulundurulmasını ve hayvanlara uygulanmasını yasaklar,
- Ruhsatsız bir ürün uygulanmış hayvanın, tüketim amaçlı olarak bulundurulmasını, kesilmesini ve işlenmesini yasaklar,
- Herhangi bir madde uygulanmış bir hayvanın, yasal arınma süresi dolmadan, tüketim amaçlı kesimini, tedarikini ve satışını yasaklar,

- Ruhsatsız bir madde içeren hayvansal ürünlerin veya yasal arınma süresine uyulmadan kesilen hayvanlardan elde edilen hayvansal ürünlerin tüketim amaçlı satışını yasaklar,
- Resmi numunelerin analizinin sağlanması ve numunelerin alınması için, yetkili memurların güçlendirilmesi,
- Hayvanları muayene etmek ve gözlemek amacıyla yetkilendirilmiş memurların güçlendirilmesi,
- Suçlar, cezalar ve denetimlerin sağlanması,
- Spesifik istisnalar ve savunmalar
- İşletmelerin sorumlulukları,
- Kayıtların tutulması ile ilgili gereksinimlerin belirlenmesi gibi maddeleri kapsamaktadır.

2.5.Gıda Ürünlerinde Sülfonamid Kalıntılarının İnsan Sağlığına Etkileri

Sülfonamid kullananların %5'inde alerjik etki ortaya çıkar. İstenmeyen etkilere, uzun etki eylem süreli sülfonamidler daha fazla neden olurlar (sülfadoksin gibi). Bu etkiler, deri döküntüleri, ışığa duyarlılık, ateş, üritiker, kusma, yemek yeme isteğinde azalma ve idrar yolları sorunlarıdır. Ayrıca stomatit, konjoktivit, artrit, eksofoliyatif dermatit, poliarteritis nodoza, Steven Johnson sendromu ve psikozlar da oldukça sıktır. İdrarda çökmeden kaynaklanan kristalüri, hematüri, tıkanma gibi üriner sistem bozuklukları yapabilirler. Özellikle sülfonamidlerin asetil türevleri asidik ortamda suda az erir ve çökebilirler. İyi eriyenlerde (sulfisoksazol ve trisulfaprimidin gibi) bu etki azdır. Böbrek yetersizliği olanlarda doz ayarı gerektiren ilaçlardır (Sağduyu 1990). Sülfonamidlerin çökme özelliklerini metanamin bileşikler artırır.

Sülfonamidlerin hematopoetik sisteme olumsuz etkisi vardır. Hemolitik aplastik tipte anemi, granülositopeni, trombositopeni ve lökomoid tepkimeler bunlardan bazılarıdır. Eritrositlerinde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz yetmezliğindeki kişilerde hemolitik tepkimeler görülür. Bunlardan başka mental bozukluklar, periferik nörit, hepatit, karaciğer nekrozu, akut sarı karaciğer atrofisi, yüksek dozdan hipoglisemi az olmakla beraber görülebilen istenmeyen etkilerdir (Sağduyu 1990). Toksik epidermal nekroliz sendromu, fotosensivite, hematopoetik bozukluklar, porfiriya, hiperbilirubinemi ve kernikterus başlangıcı, tiroid toksisitesi gibi hastalıkları taşıyan hastalarda, sülfonamidlere maruz kalmaları durumunda hastalıklarının seyrinde olumsuzluklar görülebilmektedir (Wang ve ark 2006).

Sülfametazin veya sülfadimidinin deney farelerinde tümör oluşuma neden olduğu raporlanmıştır. Ayrıca tiroid bezinde toksik etkileri olduğu çeşitli kanıtlar ile sunulmuştur (Samanidou ve ark 2008).

2.6. Sülfonamid Kalıntılarının Tespitinde Kullanılan Metotlar

Kalıntı analizlerinde kullanılan metotlar doğru, pratik, zaman ve fiyat olarak ekonomik olmalı ve kalıntıları (MRL) düzeylerinin altında tespit edebilmelidir. Sülfonamidlerin tespiti kromatografik metotlara ve bakteriyel büyüme inhibasyonuna dayanır. Geçmişten günümüze sülfonamidlerin kalıntı analizleri,

- Enzim ilintili immün test (Elisa) (Franek ve ark. 1999; Shelver ve ark. 2008),
 - Mikrobiyal testler (Weiss ve ark. 2007),
 - Charm II testi (Bogdanov 2003),
 - Kapiler elektroforez (Garcı'a ve ark. 2009),
 - İnce tabaka kromatografisi (TLC) (Thomas ve ark. 1983),
 - Yüksek-performans sıvı kromatografisi (HPLC) (Malintan ve Mohd 2006),
 - Gaz kromatografisi (GC) (Chiavarino ve ark. 1998),
 - Sıvı kromatografi (LC), (Wang ve ark. 2006),
 - Gaz kromatografi/kütle spektrometrisi (GC/MS) (Reeves 1999),
 - Sıvı kromatografi/kütle spektrometrisi (LC/MS) (Fuh ve Chan 2001),
- ve LC/MS/MS (Chai ve ark. 2008; Forti ve Scortichini 2009; Verzeznassi ve Stadler 2002) metotları kullanılarak yapılmaktadır.

2.6.1.Enzim İlintili Immün Test (Elisa)

Eliza yönteminde hedef moleküle özel geliştirilmiş antikorlar kullanılır. Yüksek özgüllüğe sahip olup oldukça hassastır. Güvenilirliği yüksek, pratik bir yöntem olup, kısa zamanda fazla sayıda numune analizi mümkündür. Fakat doğrulama kromatografik olarak sağlanmalıdır (Wang 2006).

2.6.2.Mikrobiyolojik Yöntemler

Mikrobiyolojik yöntemler indikatör olarak sülfonamidlere duyarlı bakterilerin kullanımına dayanır (Dmitrienko ve ark. 2014). Bakterilerin gelişimi baskılandığı zaman sülfonamidlerin varlığından bahsedilir. Bu yöntemde agar-difüzyon metodundan elde edilen

inhibisyon plotları ile kalıntı varlığı saptanır. Test mikroorganizmaları *Streptococcus*, *Micrococcus* ve aerobik spor oluşturan bakterilerdir. Mikrobiyolojik metot süt örneklerinin sülfonamid ve antibiyotik içeriklerinin enzim immünolojik (Blanzick ve ark. 2011) veya HPLC (Chung ve ark. 2009) ile belirlenmesinden önce görüntülemeye kullanılabilir. Charm II bu prensibe dayanan bir analiz yöntemidir.

2.6.3.Biyosensörler

Gıdalarda kalıntı tespitinde elektrokimyasal ve optik biyosensörler kullanılabilir (Huet ve ark 2010). Maliyeti düşük ve basit olmalarından dolayı rutin saha çalışmalarında kullanılabilirler. Fabrikasyon ürünü olup çeşitli baskılama yaklaşımlarıyla üretilen elektrokimyasal sensörler sülfonamidlerin dedeksiyonunda kullanılabilir (Conzuelo ve ark. 2013).

2.6.4.Elektroforetik yöntemler

Elektroforez, birçok uygulamada etkin bir analitik tekniktir. Ancak ilaç analizi gibi bir alanda çok daha geniş bir uygulaması vardır. Gıdalarda sülfonamidlerin belirlenmesinde yakın zamanda birçok metodu uygulanmıştır (Cañas ve ark. 2014). Basitlik, yüksek verimlilik, kısa analiz süresi, küçük numune ve az tampon çözelti hacimleri gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, kapiler elektroforezin kısa optik yolu nedeniyle UV dedektör kullanılırken sınırlı duyarlılığa sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, klasik UV-görünür kıyasla daha iyi bir duyarlılık sağlayan lazer uyarmalı floresans (LIF), elektrokimyasal tespit (ED), kemilüminesans (CL), elektrokemilüminesans (ECL) ve MS tespiti gibi kapiler elektroforezin sülfonamid belirleme için diğer yaygın tespit modları kullanılmaktadır (Perez ve ark 2012).

2.6.5.Kromatografi

Kromatografi, öncelikle bir ayırma tekniği olmasına rağmen çoğunlukla kimyasal analizlerde kullanılmaktadır. Kromatografi muhtemelen en güçlü ve çok yönlü analiz tekniğidir. Tek bir proses basamağında hedef bileşenler bir karışımdan tek tek ayrılabilir ve her birinin miktarı belirlenebilir. Kromatografik olarak analiz edilecek örnekler gaz, sıvı ve katı fazda iki enantiyomerden oldukça farklı kimyasal yapıları içeren çok bileşenli karışımlara geniş bir aralıkta olabilirler. Kromatografiyi etkili bir yöntem olarak 1903 yılında tanımlayan ilk bilim insanı Rus botanikçi Mikhail Tsvett'dir (Ettre ve Sakodynski 1993). Tswett, bir dizi bitki pigmentini ayırmak için sıvı-katı kromatografinin basit bir formunu kullanmıştır. Adsorbent yatağında ürettiği renkli bantlar (bitki pigmentleri), kromatografinin temelini

oluşturmuştur. Yani bir hareketli (mobil) faz ve durağan bir fazı tanımlamıştır. Ancak Tswett tarafından açıklanan bu yöntem 1930'ların sonlarında ve 1940'ların başında göz ardı edilerek bilim ve teknolojiye kullanılmaz. Bu tarihlerde Martin ve Synge, asetil aminoasitleri birbirinden ayırmak için sıvı-sıvı kromatografisini kullanmıştır. Burada, sabit faz olarak silikayı, hareketli faz olarak suyu kullanmıştır. Bu sayede sıvı kromatografisini temeli oluşmuştur. Martin ve Synge bir makalelerinde, hareketli faz olarak gazın kullanımıyla ayırışmanın daha hızlı ve etkin olduğunu açıklamışlardır. Bu gaz kromatografisinin ilk kez bu makalede ifade edilmiştir. Ayrıca Martin ve A.T. James 1941 yılında yayınladıkları bir makalede ise HPLC'yi ilk kez açıklamıştır. Bu açıklamalardan 20 yıl sonra 1960'larda kromatografi etkin bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Scott 2003).

Kromatografi, ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimine ve faz tiplerine göre sınıflandırılır. Ayrılma mekanizmalarına göre sınıflandırılan kromatografi tekniklerine örnek olarak adsorbsiyon, dağılma, iyon değiştirme, moleküler eleme, iyon çifti, afinite kromatografisi verilebilir. Uygulama biçimine göre ise, düzlemsel kromatografi ki bunlar kağıt ve ince tabaka kromatografisi ve kolon kromatografisi yani gaz ve sıvı kromatografisi şeklinde sınıflandırma söz konusudur. Faz tipine göre ise kromatografi, sıvı-sıvı, sıvı-katı, gaz-katı ve gaz-sıvı şeklinde sınıflandırılır (Coşkun 2016).

Ayrılma mekanizmalarına göre kromatografi;

Adsorbsiyon kromatografisinde ayırım, karışımı oluşturan farklı bileşiklerin sabit faz yüzeyinde değişik derecede adsorbe olmaları ilkesine dayanır. Sabit faz katı, hareketli faz sıvı veya gazdır. Silika jel, alümina gibi adsorban maddelerin yüzeyi sabit fazı oluşturur. Hareketli faz, adsorban üzerinde hareket eder.; bileşenler katı yüzeyde farklı derecelerde adsorbe olurlar. Bir maddenin tutunma gücü, molekülündeki fonksiyonel grup türüne ve sayısına bağlı olup, farklı maddeler kolonu farklı zamanlarda (alınma zamanı) terk eder (Trathningg ve ark. 2004).

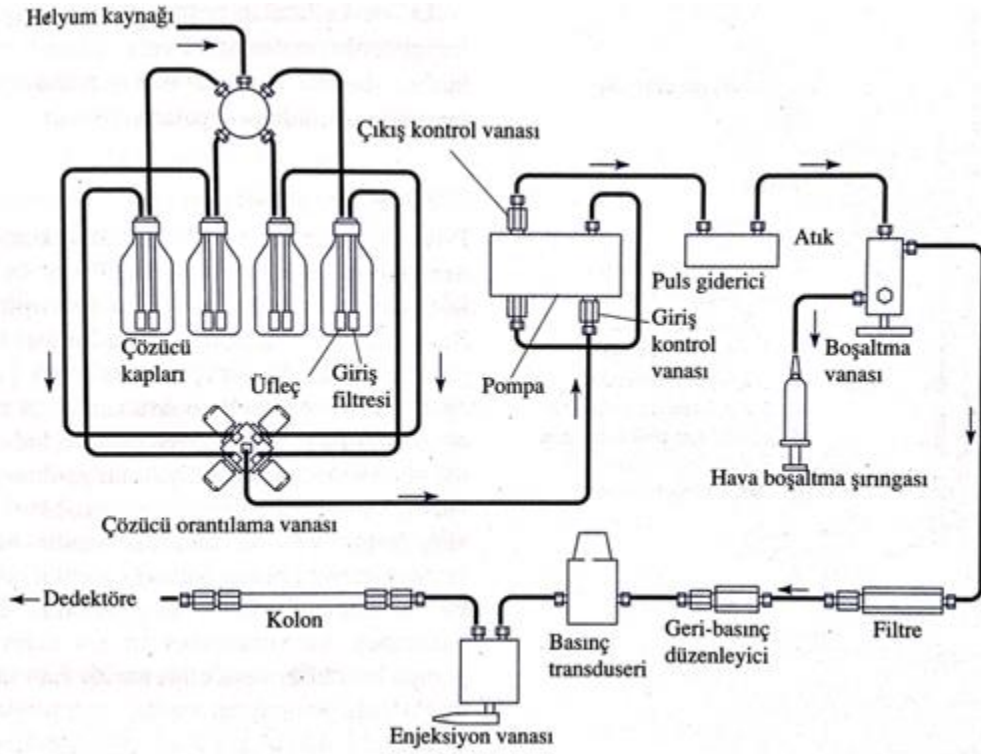
En yaygın kullanılan HPLC tipi dağılma kromatografisi olup burada, durgun faz, hareketli faz ile karışmayan ikinci bir sıvıdır. Geçmişte, bu yöntem orta ölçekte küçük mol kütleli (genellikle < 3000), iyonik olmayan polar bileşiklere uygulanmıştır. Fakat yakın zamanlarda, türevleme ve iyon-çifti oluşturma yöntemleriyle, iyonik bileşikler de dağılma temelinde ayrılabilir (Kılıç ve Yılmaz 2013).

Maddelerin iyonik grupları ile iyon değiştiricideki iyonik grupların eşdeğer miktarlarının karşılıklı yer değiştirmesi esasına dayanan kromatografi iyon değiştirme kromatografidir. İyon değiştirme kromatografisi, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon aktarmasına göre sırasıyla anyon değiştirme kromatografisi veya katyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılır. İyonların (katyon-anyon) yer değiştirmesine dayanan bu kromatografi, inorganik iyonların, proteinlerin, peptidlerin ve aminoasitlerin ayrımı için oldukça uygundur (Anonim 2016).

Jel geçirgenlik veya jel süzme kromatografi adı verilen boyut eleme kromatografi, özellikle yüksek mol kütleli türlere uygulanabilen bir tekniktir. Dolgu maddeleri, kimyasal olarak inert olan, zenen madde ve çözücü moleküllerinin içine difzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer partiküllerden meydana gelmiştir. Ayırma rnek bileşenlerinin molekül büyüklüklerine göre olur. Dolgu maddesinin gözenek büyüklüğü ve örnekte bulunan moleküllerin boyutu alıkonma süresini etkiler (Skoog ve ark. 1998).

2.6.6.Sıvı kromatografi/ktle spektrometrisi (LC/MS)

Sıvı kromatografi bir ayırma tekniğidir. Bütün analitik ayırma yöntemleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının başlıca sebepleri, duyarlılığı, doğru nicel tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, otomasyon kolaylığı uçucu olmayan ve sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi endüstriyi, birçok bilim dalını ve halkı yakından ilgilendiren maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; aminoasitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoitler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli anorganik bileşikler de sayılabilir (Snyder ve Kirkland, 2003). Bir sıvıda çözünmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz (hareketli faz veya mobil faz) olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tesbit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) denir (Jones 2000). şekil 2.9’da tipik bir sıvı kromatografi cihazının önemli bileşenleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.9 Sıvı kromatografi cihazının şematik görüntüsü (Kılıç ve Yılmaz 2013)

Hareketli faz, örnek ve sabit faz arasındaki etkileşimlerin ayarlanabilmesi için farklı şekillerde uygulanabilir;

- İzokratik Uygulama: Bileşenler sabit bileşimli tek bir çözücü ile sürüklenir. Tüm bileşenler kolonda aynı anda, farklı hızlarda göç ederler.
- Gradient Uygulama: Polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniktir. Çözücü bileşimi sürekli veya basamaklı olarak değiştirilir.
- Politiplik Uygulama: Karışık tip kromatografilerde tercih edilir. Çözücü sistemlerinin analiz sırasında değiştirildiği uygulama biçimidir (Seto ve ark. 2002).

2.6.6.1.Pompalama sistemi

Sıvı kromatografik pompaları için gerekli özellikler şunlardır: (1) 400 atm'e kadar basınç üretimi (2) vuruntusuz basınç çıkışı (3) 0,1-10 mL/dk aralığında akış hızları (4) % 0,5 veya daha iyi bir bağıl akış tekrarlanabilirliği (5) çeşitli çözücülere karşı korozyon dayanıklılığıdır (Ardrey 2003).

2.6.6.2.Enjeksiyon sistemleri

Pek çok modern kromatografi cihazında otoenjektörler bulunur. Bu aygıtlar numune kaplarından sıra ile numune alarak LC kolonuna enjekte edebilir. Böyle aygıtlarda da numune alma sarımları ve 1 µL- 1mL aralığında istenen hacimde numunenin enjeksiyonu için uygun bir şırıngalı pompa bulunur. Bunların bazılarında, sabit sıcaklık numune bölmeleri de vardır. Bunların birçoğu programlanarak LC sistemine gözetimsiz olarak otomatik numune girişi de sağlayabilir (Kılıç ve Yılmaz 2013).

2.6.6.3.Kolonlar

Sıvı kromatografi kolonlarının çoğu içinden geçen mobil faza karşı korozyona dayanıklı, krom-nikel-molibden karışımı paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Bu kolonların iç çapları 0,3-5mm; uzunlukları 500mm'den 250m'ye kadar değişmektedir. Kolon uç bağlantıları, girişte kolonun enjektöre bağlanmasında, çıkışta ise dedektöre bağlanmasında kullanılır. Kolonlar küçük, homojen, gözenekli partiküllerle doldurulur. Bu partiküllerin yüzeyleri sabit fazla kaplanmıştır. Bu yapı sayesinde kolonlar madde geçişini zorlaştıracak bir yapı kazanırlar (Burtis ve Ashwood 2005).

Boyutları ve iç dolgusu bakımından farklı çok çeşitli tipte hazır kolonlar vardır;

Analitik Kolonlar: Sıvı kromatografisi kolonlarının çoğunun boyu 5-25 cm, iç çapı 3-5 mm ve kolon dolgu maddesinin büyüklüğü 3-5 µm arasındadır. Normalde kolonlar düzgündür ve gerektiği yerlerde kolonların birbirine eklenmesiyle kolonun boyu artırılabilir.

Son yıllarda daha küçük boyutlarda yüksek hızlı ve yüksek performanslı kolonlar üretilmektedir. Bu kolonların iç çapı 4,6 mm, tanecik büyüklüğü 5 µm ve boyu 10-15 cm arasındadır (Kılıç ve Yılmaz 2013).

Emniyet Kolonları: Analitik kolonun ömrünü artırmak için analitik kolondan önce kısa kolon yerleştirilir. Bu kolonun görevi partikül halindeki maddeleri, çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak, numune içinde bulunan ve dolgun fazda tersinmez olarak bağlanan bileşenleri tutmaktır. Ayrıca hareketli fazı, durgun faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybını en aza indirmektedir (Cengiz 2011).

2.6.6.4.Dedektörler

Sıvı kromatografi dedektörleri sıvı akışlardaki düşük analit derişimlerini ölçmek üzere uyarlanmış geleneksel analitik cihazlardır (Scott 1996). Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. Yığın özelliğı dedektörleri, hareketli fazın kırılma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değıştirilen yığın özelliklerine cevap veren dedektörlerdir. Bunun tersine, analit özelliğı dedektörleri, analitin UV absorbansı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir (Ramni ve ark 2011).

UV-görünür ışın absorpsiyon dedektörleri: Absorbans dedektörlerinin büyük bir kısmı çift-ışın yolludur ve bu ışınlardan birisi elüent hücresinden geçerken, diğeri bir referans demettir. Daha sonra bu iki ışının şiddetinin karşılaştırılması amacıyla, birbiriyle özdeş fotoelektrik dedektörler kullanılır. Tek-ışın demetli cihazlar da vardır. Burada, çözücü sisteminin şiddet ölçümleri, bir bilgisayarın hafızasında tutulur ve sonunda absorbansın hesaplanması için bu değerler tekrar kullanılır (Kılıç ve Yılmaz 2013).

Floresans dedektörler: Bu sistemlerde 45°, 90° ve 135° açılarla yerleştirilmiş uyarıcı ışık kaynağı bulunduran bir fotoelektrik dedektör mevcuttur. Dedektörlerde, uyarıcı ışık kaynağı olarak cıva lambası veya ksenon lambası ve yayılan ışınların belli bir bandını izole etmek için bir veya birkaç filtre kullanılır. Floresans ışımmasını izole etmek için optik ağılı monokromatör kullanılır. Lazer uyarmalı floresans yöntemi de yüksek seçiciliklidir. Floresans dedektörler, floresans özelliğı bulunan numunelerdeki bileşiklerin ayrılması ve tayini için sıvı kromatografide çok kullanılırlar. İlaçlar, doğal ürünler, klinik numuneler ve petrol ürünleri gibi floresans özelliğı olan bileşiklerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır (Scott 1996).

Kırılma indisi dedektörde; çözücü, kolona giderken hücrenin bir yarım bölmesinden geçer; eluat ise, daha sonra diğeri bölmenin içinden geçer. Bu iki bölme, iki çözeltinin kırılma indisi birbirinden farklı ise, gelen ışın, kırılacak şekilde uygun bir açıda yerleştirilmiş bir cam plaka ile ikiye ayrılmıştır. Fotoduyarlı dedektörün yüzeyine gelen ışın demetinin yolundan sapması, çıkış sinyalinin değışmesine sebep olur; bu değışiklik yükseltilerek kaydedediğinde kromatogram elde edilir (Kılıç ve Yılmaz 2013).

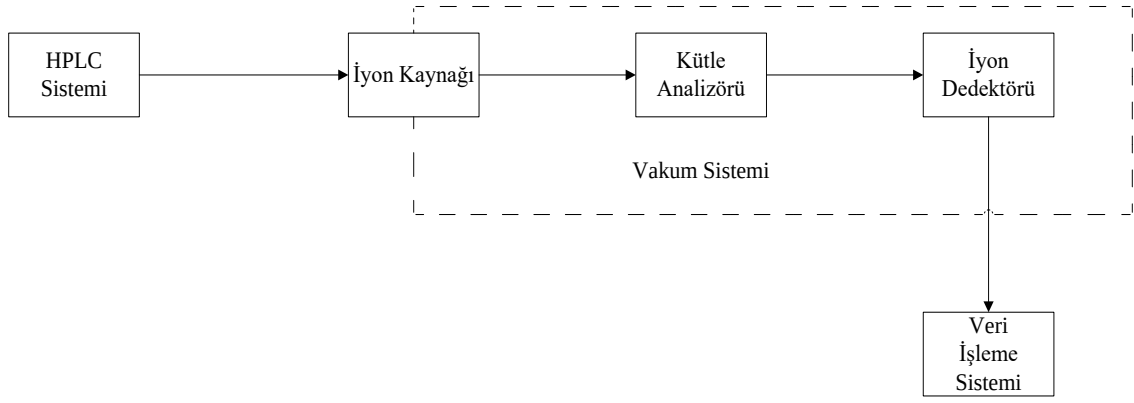
Buharlaştırmalı ışık saçılım dedektörleri: Kolondan çıkan çözelti, bir sisleştirci içinden geçirilmekte ve burada azot veya hava akımı ile çok ince sis haline

dönüştürülmektedir. Küçük damlalar daha sonra, hareketli fazın buharlaştığı ve tayin edilecek maddenin çok küçük taneciklerinin oluştuğu sıcaklık kontrollü sürüklenme borusuna gönderilir. Tayin edilecek maddenin oluşturduğu tanecik bulutu, daha sonra bir lazer ışın demetinin içinden geçirilir. Akış yönüne dik açıda saçılan ışınlar bir silisyum fotodiyot ile ölçülür (Kılıç ve Yılmaz 2013).

Bu tip dedektörün başlıca üstünlüğü, uçucu olmayan bütün analitlere yaklaşık olarak aynı cevabı vermeleridir. Ayrıca kırma indisi dedektöründen çok daha duyarlıdır. Gözlenebilme sınırı 0,2 ng/μL kadardır. Hareketli fazda sadece uçucu maddelerin bulunması şartı bu dedektörün başlıca dezavantajıdır.

Kütle spektrometrik dedektörler: Ayırma ve dedeksiyonda LC ve kütle spektrometrinin birleştirilmesi ideal bir işbirliği sağlanması oldukça güç bir işlemdir. Çünkü kütle spektrometri için gaz halde bir numune gerekirken, LC, tamamıyla sıvı fazlı kromatografik temellere dayanmaktadır. Bu nedenle kütle spektrometresinden önce çözücünün buharlaştırılması gerekmektedir (Ardey 2003).

Çözücüyü uzaklaştırma ve LC kolonuyla MS arayüzünü oluşturma amaçlı çeşitli düzenekler geliştirilmiştir. En yaygın yaklaşım atmosferik basınçta düşük akış hızlı iyonlaştırma sağlayan bir tekniktir (Ho ve ark. 2003). En yaygın iyonlaştırıcılar, elektrosprey iyonlaştırıcılar (ESI) ve atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırıcılarıdır (APCI) (Anonim 2013c). HPLC ile ESI MS geniş kullanım alanı bulan yüksek seçicilik ve hassasiyete sahip cihazdır (Moriwaki 2016). LC/MS sistemlerinde, ayrılan türün, geleneksel HPLC’de olduğu gibi, sadece alıkonma süresini kullanmak yerine, parmak izi kadar güvenilir kütle spektrumunu elde etme üstünlüğü vardır. Bu birleşme sayesinde, ayrıca mol kütlesi, yapısal ayrıntılar ve güvenilir nicel analiz sonucu elde edilebilir. Tipik bir LC/MS sisteminin blok diyagramı Şekil 2.10’da görülmektedir.



Şekil 2.10 LC/MS sisteminin blok diyagramı (Kılıç ve Yılmaz 2013)

2.7.Kütle Spektrometrenin Kullanıldığı İkili Teknikler

Moleküllere çarpan elektronlar sonrasında oluşan iyonlar oldukça fazla ve farklı m/z değerlerine sahiptir. Bu nedenle hassasiyeti düşük bir kütle spektrometrenin kullanımı, bu fazla ve farklı m/z değerlerinin ayrıştırılması ve analiz edilmesi için oldukça sınırlıdır. Bundan dolayı kütle spektrometreler başka ayırma yöntemleriyle (özellikle kromatografik) kombine edilerek daha hassas ve seçici sistemler oluşturulmuştur. Bunlar gaz kromatografi/kütle spektrometre, gaz kromatografi/kütle spektrometre/kütle spektrometre (tandem kütle spektrometre), sıvı kromatografi/kütle spektrometre, sıvı kromatografi/kütle spektrometre/kütle spektrometre (tandem kütle spektrometre) kapiler elektroforez/kütle spektrometre ve kütle spektrometre/kütle spektrometre (tandem kütle spektrometre) şeklindedir (Matz ve ark. 2002).

2.8.Kütle Spektrometre

Gaz fazındaki iyonların, kütle, yük, yapı ve/veya fizikokimyasal özellikleri kullanılarak analitik karakterizasyon tekniğine kütle spektroskopisi, bu tekniği gerçekleştiren cihaza da kütle spektrometre denir (Kermit ve ark. 2013). Bu teknikte moleküller artı ya da eksi yüklü iyon haline getirilerek bu iyonların kütleleri; kütle/yük oranı olarak belirlenir. Bu sayede, kimyasal maddelerin elemental analizleri, organik (basit, makro ve supramoleküller, polimerler vb) ve biyolojik (protein, DNA, RNA, karbonhidrat, yağ, steroid vb.) moleküllerinin dizilimlerinin belirlenmesinde, kimyasal yapısı bilinmeyen maddelerin nitel ve nicel analizlerinde, atom/izotop oranlarının tespitinde mümkün olmaktadır (Gross 2004).

Kütle spektrometrelerde, molekülün kimyasal bağların kırılması pozitif iyonların oluşturulması için 30-100 eV aralığında enerji uygulanır. 30-100 eV aralığında enerji yüklü elektronlar ile analiz edilen moleküller arasındaki çarpışmalar molekülü aktive edecek enerjiyi transfer ederler. Uyarılmış molekülün kararlı temel hale geçmesi için termodinamiksel kararlı faza geçinceye kadar parçalanma şeklinde olur. Haliyle moleküler seviyede kararlı ancak küçük iyon moleküller oluşur buna kısmi denge teorisi denir (The quasi-equilibrium theory, QET) (Lorquet 2000).

Elektron bombardımanı ile oluşan pozitif iyonlar, kütle spektrometrenin slit aralığından geçtikten sonra detektöre düşerler. Kütle/yük oranına (m/z) göre dedektör voltaj değerleri bir ekranda kütle spektrumu olarak görüntülenir. Bu bölgeler, vakum ortamındadır. Kütle spektrometrenin optik yöntemlerin çoğunda bulunmayan niteliklerinde birisi de, dedektöre kadar olan tüm sistemlerin düşük basınç ($1,3E-7 - 1,3E-11$ bar) altında olmasıdır; hassas vakum sistemleri kütle spektrometrelerin en önemli kısmıdır. Her spektrumda en büyük olan pik temel pik olup, en büyük olması nedeniyle %100 olarak kabul edilir. Diğer piklerin yükseklikleri, baz alınan %100'lük pike oranlanarak yüzde cinsinden belirlenir. Bu süreç modern kütle spektrometrelerinde bir otomasyona dökülmüş olup, yazılımla temel pik belirlenmekte ve diğer pikleri bu temel pike göre belirlenmektedir (Chapman 1993).

2.8.1. İyon Kaynakları

Kütle spektroskopisinde analiz edilen moleküller, analiz edilmeden, filtreleme, özgülleştirme ve yüksek hassasiyet gereği önce iyon kaynağında iyonize edilirler (Hoffmann ve Stroobant 2007).

İyonlaşmada en önemli husus iyonizasyon süreci boyunca moleküllere aktarılabilecek enerji ve iyonize olabilen analitin fiziko-kimyasal özellikleridir. Bazı iyonlaştırma teknikleri çok enerjiktir ve geniş parçalanmaya neden olmaktadır. Özellikle gaz kromatografi kütle spektroskopisi tekniğinde olduğu gibi. Elektron iyonizasyonu, kimyasal iyonlaşma ve alan iyonizasyonu sadece gaz fazı iyonlaşması için uygundur ve bu nedenle bunların kullanımı yeterince uçucu ve termal olarak kararlı olan bileşiklerle sınırlıdır (Gross 2004). Diğer teknikler daha az enerjik olup, sadece moleküler yapıların iyonlarını üretir. Bu teknikler, termal olarak kararsız veya yeterli buhar basıncına sahip olmayan bileşikler için uygundur. Sıvı kromatografi kütle spektroskopisi tekniğinde olduğu gibi. Bu iyon kaynakları sıvı faz iyon kaynağı ya da katı hal iyon kaynaklarıdır. Sıvı fazlı iyon kaynaklarında analit çözelti

halindedir. Bu çözelti, nebulizasyon yoluyla iyon kaynağına damlacıklar halinde girerler. İyon kaynağında, atmosfer basıncında iyonlar üretilir. Elektrosprey, atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon ve atmosferik basınçlı fotoiyonizasyon bu iyon kaynaklarındadır (Binici 2014).

Kütle spektrometresinde, uygulanan molekülleri gaz iyonlar şekline dönüştüren iyonizasyon kaynakları şu şekildedir:

Uçucu bileşikler için;

- Elektron Etki İyonizasyon (EI),
- Kimyasal İyonizasyon (CI): Pozitif kimyasal iyonizasyon (PCI) ve negatif kimyasal iyonizasyon (NCI).

Uçucu olmayan bileşikler için;

- Hızlı atom bombardımanı (FAB),
- Atmosferik Basınç İyonizasyon (API),
- Matriks yardımıyla lazerle desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) (Anonim 2017b).

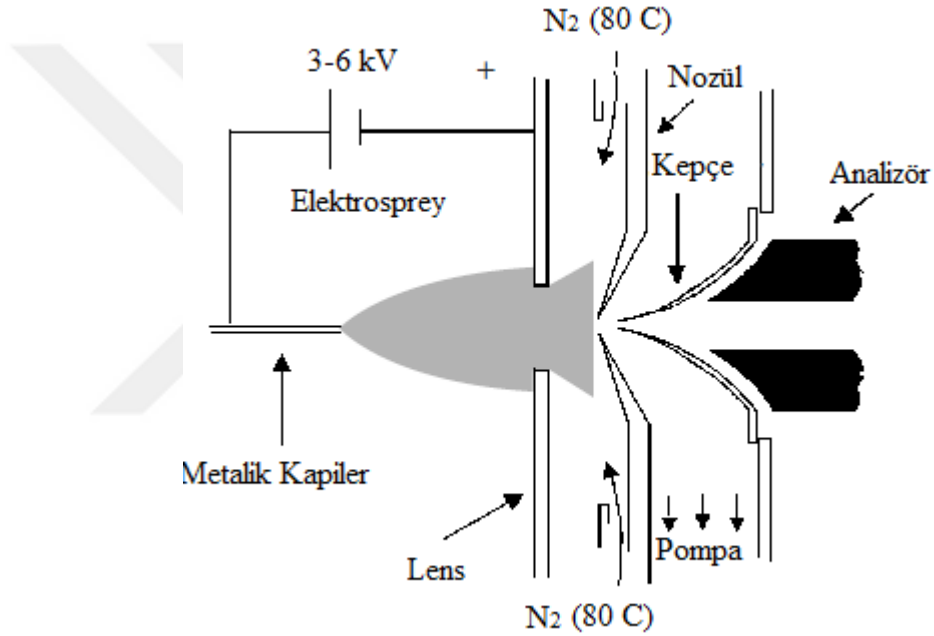
2.8.1.1. Atmosferik Basınç İyonizasyon

Atmosferik Basınç İyonizasyon sıvı kromatografi- kütle spektrometresi için kullanım alanı yaygın olan bir iyonizasyon tekniğidir. İyonizasyon vakum sisteminin dışında meydana gelir. Örneğin çözelti halinde olması gerekir. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (API/APCI) olmak üzere iki tip atmosferik basınç iyonizasyon vardır.

2.8.1.2. Elektrosprey İyonizasyon (ESI)

Literatürde elektrosprey iyonizasyon, ESI veya ES olarak kısaltılır. Ancak genellikle ESI kullanımı tercih edilmektedir. ESI'nin kullanılabilirliğinin başarısı Fenn ve ark. (1989) tarafından molekül ağırlığı 130.000 Da küçük proteinlerin analizinde gösterilmiştir (Fenn ve ark. 1989). Bu iyonizasyon tekniği özellikle protein ve biyopolimerlerde kullanıldığı gibi ayrıca polar küçük moleküllerde de kullanılmaktadır. ESI oldukça yüksek hassasiyete sahip bir iyonizasyon tekniğidir.

ESI, kılcal bir tüpten geçen düşük miktardaki akışa (normal olarak 1-10 $\mu\text{l min}^{-1}$) atmosferik basınç altında güçlü bir elektrik alanı uygulanmasıyla oluşturulur. Elektrik alanı, 3-6 kV'luk bir potansiyel farka sahiptir (Loo ve ark 1989). Oluşan elektrik alanı 10^6 Vm^{-1} 'dir. Şekil 2.11'de elektrosprey iyon kaynağı gösterilmiştir. Kapilerdeki sıvı (çözelti) bu elektrik alana maruz kalarak uyarılır. Bu uyarılma ile sıvı oldukça yüklenmiş damlacık formuna dönüşmektedir. Düşük hızda koaksiyal akan inert gazda oluşan spreyn dağılımının sınırlandırılmasına olanak tanımaktadır. Damlacıklar verilen voltaj ve yüzey gerilimlerine bağlı olarak belirli bir voltaja sahiptir. Örneğin bu su için 4 kV, asetonitril için 2,5 kV, dimetilsülfoksin için 3 kV'tur (Kearle ve Tang 1993).



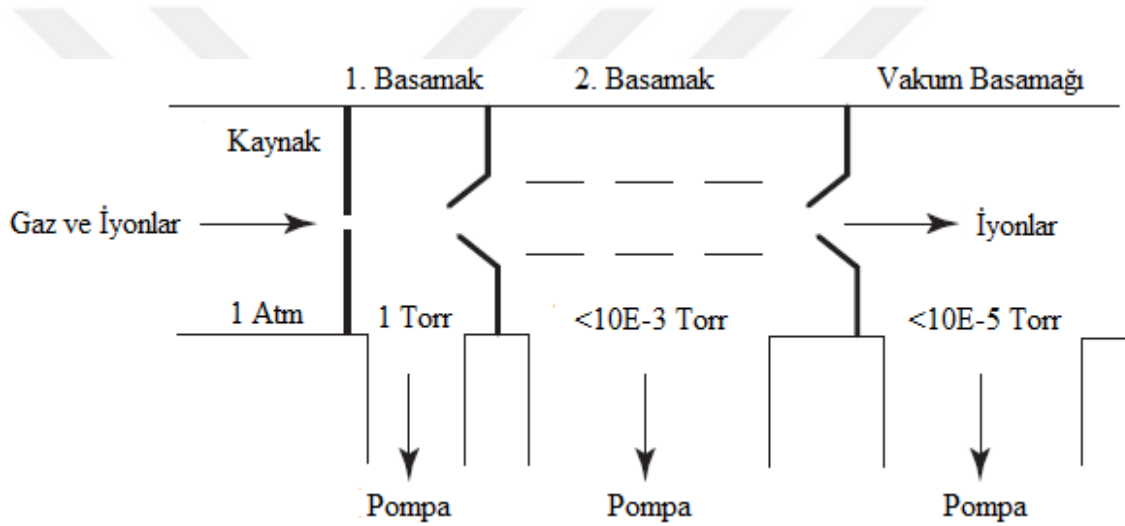
Şekil 2.11 Elektrosprey iyon kaynağı şekli (Hoffmann ve Stroobant 2007)

2.8.1.3. Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon (APCI)

Bu iyon kaynağında numune atmosferik basınçta iyonize (API) olur ve sonrasında iyonize olan numune sonrasında kütle spektrometreye girer. Kütle analizörü ise oldukça yüksek vakum altında çalışmaktadır (10^{-5} torr). Atmosferik bir basınç ortamı olan iyon kaynağı kompartımanı sonrası yüksek vakumlu kütle analizörü kompartımanında yüksek vakum sağlanmak zorundadır. Bu zorunluluk oldukça önemli bir problemdir. Bu problem, diferansiyel pompa sistemi kullanılarak çözülür. İyon kaynağı ve analizör arasında vakum

bölmeleri konulur. Bu bölmeler çok küçük orifisli lenslerle birbirine bağlanır (Bruins 1994) Bu bölmelerde basınç, kademeli olarak vakum pompalarıyla düşürülür (Şekil 2.12).

Atmosfer basıncında çalışan bir iyon kaynağı, uygulamarda pek kullanışlı değildir. Bu nedenle API yerine kontrollü koşullar altında pirolize edilen numunelerin MS analizi, atmosfer basıncında kimyasal iyonizasyon (ACPI) kullanmaktadır. Atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon ile pnömatik nebulizör arabirimini kullanan çevrimiçi LC-MS, çok kararsız olmayan orta derecede kutuplu numuneler için uygundur. Oldukça polar, termal kararlı, iyonik numuneler ve biyopolimerler için son yıllarda, atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon kimya, eczacılık ve biyoteknoloji alanlarındaki problemler için standart bir araca dönüştürülmüştür.



Şekil 2.12 Atmosferik iyon kaynağı (Hoffmann ve Stroobant 2007)

2.8.1.4. Matriks yardımıyla lazerle desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI)

Matriks Yardımlı Desorpsiyon (MALDI) yüksek kütle sayılarına çıkabildiğinden kullanımı oldukça yaygın olan bir iyonizasyon yöntemidir. Örnek, spesifik bir dalga boyundaki kısa pulslu lazerden gelen ışını absorblayan matriks içinde çözülür, iyonlaşır ve kütle analizörlerinde ekstrakt edilir. Zaman-yol bağımlı kütle spektroskopisiyle (TOF, Time of Flight MS) bileştirilerek kullanılır, fakat sıvı kromatografisiyle uygun değildir (Lewis ve ark. 2000).

MALDI iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada analiz edilecek bileşik matris adı verilen küçük organik molekülleri içeren çözücünde çözündürülür. Bu moleküllerin lazer dalga

boyunda kuvvetli bir absorpsiyona sahip olması gerekir. Bu karışım analizden önce kurutulur. Sonuç analit katkılı matris kristallerinin katı eriyiğidir. Analit molekülleri matrisin her tarafına gömülürler, böylece birbirlerinden tamamen izole edilirler. İkinci adım, kütle spektrometresi kaynağının içindeki vakum koşulları altında gerçekleşir. Bu aşamada katı eriyiğin (solid solution) parçaları kısa sürede yoğun lazer ile kaldırılır. Bununla beraber lazerle ışınlama, matris moleküllerinin uyarılması yoluyla yoğunlaşmış fazda büyük miktarda enerjinin birikimi ile kristallerin hızlı bir şekilde ısıtılmasını sağlar. Hızlı ısıtma, matrisin lokalize bir şekilde sublimasyonuna, kristal yüzeyin bir bölümünün ablasyonuna, matrisin gaz fazı içinde genleşmesi, bozulmamış analitin genleşen matris plume içine sürüklenmesine neden olur (Dreisewerd 2003).

MALDI diğer lazer iyonlaştırma tekniklerinden daha duyarlıdır. Aslında matris moleküllerinin sayısı, analitin moleküllerinin sayısını aşar ve böylece analit moleküllerini ayırır ve moleküler iyonların görünümünü engelleyen örnek kümelerinin oluşumunu önler. Matris ayrıca, lazer darbesinin örnek hasarını asgari düzeye çekerek lazerden analite enerji aktarımının etkinliğini artırır. Böylece duyarlılık da artar (Hoffmann ve Stroobant 2007).

MALDI diğer lazer iyonlaştırma tekniklerinden daha evrenseldir. Lazer darbesini adsorbe eden matris olduğundan ötürü analiz edilecek bileşiğin soğurma özelliklerinden ve boyutundan bağımsızdır. MALDI 100000 Da'dan fazla yüksek moleküler kütleli analitlerin desorpsiyon ve iyonizasyonuna izin verir (Spengler ve Cotter 1990).

2.8.1.5. Elektron Etki İyonlaştırma

Kütle analizlerinin ilk örnekleri elektron etki ile ortaya çıkmıştır. Bu teknikte, numune yeterince buharlaşabilecek bir sıcaklığa getirilir ve enerjik elektronlarla bombardıman edilerek iyonlaştırılır. Elektron iyonlaşma tekniğinde elektronlar ısıtılan bir tungsten veya renyum telden yayılır ve yaklaşık 70V'luk bir potansiyel tarafından tel ve anot arasında hızlandırılır. Şekilde görüldüğü gibi elektronların ve moleküllerin yolları diktir ve yollar, kaynağın merkezinde kesişir ve burada çarpışma ve iyonlaşma olur. Eğer molekülün yüksek enerji seviyesinde bulunan elektronlarını, elektrostatik etkiyle koparabilecek bir enerji aktarımı olursa, ilk ürün tek pozitif yüklü iyonlardır (Märk 1986).

2.8.1.6. Kimyasal İyonlaştırma (CI)

Kimyasal iyonlaştırmada numunenin gaz haline gelmiş atomları elektron bombardımanı ile iyonlaştırılmış çok miktarda başka bir reaktif gazın iyonları ile çarpıştırılır. Bu amaçla genelde pozitif iyonlar kullanılmaktadır, fakat zaman zaman, analitlerde elektronegativitesi yüksek atomlar varsa, negatif iyonlarla kimyasal iyonlaştırma da kullanılmaktadır. Kimyasal iyonlaştırma, kütle spektrometrelerinde kullanılan iyonlaştırma yöntemleri arasında ikinci sırayı alır. Kimyasal bir iyonizasyon kaynağında metan gibi bir reaktif gaz, 1 torr kadar basınçta, özel bir elektron demeti kaynağı içine konulur. Aynı kaynak içine, konsantrasyonu reaktifin 10^{-3} – 10^{-4} katı olacak şekilde örnek ilave edilir. Örnek moleküllerinin elektronlar yerine reagent iyonları ile çarpışması sonucunda iyonlaşma meydana gelir. Başlangıçta, elektron demeti reaktif gaz ile etkileşerek CH_5^+ , CH_4^+ , CH_2^+ , H_2^+ , ve C_2H_5^+ gibi çok sayıda iyon oluşturur (Knochenmuss 2002).

- **Proton Transfer İyonizasyonu**

M analit molekülü, iyonizasyon plazmasına girdiğinde (plazma torçu), plazma fazında bulunan reaktif gaz iyonları GH^+ , M moleküllerine proton transfer eder ve protonlanmış iyon MH^+ 'yı oluşturur. Plazma kısmen veya tamamen iyonlaşmış gaz olarak maddenin dördüncü halidir. Maddeye, katı $\rightarrow$ sıvı $\rightarrow$ gaz $\rightarrow$ plazma fazına geçmesi için enerji verilmesi gerekmektedir. İyon kaynağında reaktif gaza bu enerji verilmektedir. Kimyasal iyonlaştırma da en çok kullanılan proses, proton transferidir. Plazma fazındaki GH^+ reaktif iyonunun M analit molekülünü M^+ proton haline getirme eğilimi M'nin proton afinite değeriyle belirlenir (Hoffmann ve Stroobant 2007).

2.8.1.7. Alan İyonlaştırma

Alan iyonizasyonu (FI), gaz fazda moleküllerden iyon üretmek için çok güçlü elektrik alanları kullanan bir yöntemdir. FI uçucu ve termal kararlı molekül yapılarının tanımlanmasında uygundur. Elektron iyonizasyon (EI) veya kimyasal iyonizasyon CI gibi alan iyonlaştırma (FI) da sadece gaz fazı iyonlaşması için uygundur. Bu nedenle numune EI ve CI kaynaklarında yaygın olarak kullanılan tekniklerle örneğin ısıtılabilen doğrudan bir prob veya bir gaz kromatografisindeki süzüntü (eluat) kullanılarak FI kaynağına dâhil edilir. Bu iyonizasyon yönteminde kullanılan yoğun elektrik alanları genellikle emitör adı verilen bir filaman ile birkaç milimetre uzaktaki bir karşı elektrot arasında uygulanan 8-12 kV'luk bir potansiyel farkıyla üretilir. Gaz fazdaki örnek molekülleri yüksek pozitif potansiyelli emitör yüzeyine yaklaşırlar. Yüzeydeki elektrik alanı yeterince yoğun olduğunda yani kuvveti

yaklaşık 10^7 - 10^8 Vcm⁻¹'e ulaşırsa, örnek molekülünden elektronlardan biri kuantum tünellemesi ile vericiye aktarılır ve sonuçta radikal katyon M^{*+} oluşur. Bu iyon emitör tarafından itilir ve negatif karşı elektroda doğru akar. Karşı elektrottaki bir delik, iyonun kütle analizörü bölmesine geçmesine izin verir. FI analite göre M^{*+} ve /veya MH⁺ iyonlarının oluşumunu sağlar. Protonlanmış moleküler türlerin oluşumu, ilk iyon ile emitörün yüzeyine yakın numune molekülleri arasında oluşabilecek iyon-molekül reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır (Hoffmann ve Stroobant 2007).

2.8.1.8.Hızlı Atom Bombardmanı ve Sıvı Sekonder İyon Kütle Spektrometresi

İkincil iyon kütle spektrometresi (SIMS), bir yüzey enerjik birincil iyon demeti ile ışınladığı zaman yayılan ikincil iyonları analiz eder (Vaeck ve ark. 1999). Çok düşük akımlı birincil iyon demetleri bulunan iyon kaynakları yüzey erozyonu üreten dinamik kaynakların aksine numune yüzeyine zarar vermediğinden statik kaynak olarak adlandırılır. Statik SIMS, dinamik SIMS'den ziyade herhangi bir moleküle daha az zarar verir ve plazma desorbsiyonu ile elde edilen spektrumlara benzer spektrumlar verir (Benninghoven ve Sichtermann 1978). Bu teknik çoğunlukla katılarla birlikte kullanılır ve özellikle iletken yüzeyleri incelemek için kullanışlıdır.

2.8.1.9.Plazma Desorbsiyon

Bu iyonlaştırma tekniğinde, küçük alüminize naylon folyo üzerinde biriken numune, birkaç mega elektron voltaj enerjisine sahip 252 Cf'lik fosfor parçalarına maruz bırakılır. Saniyede birkaç bin parçanın bombalanmasından kaynaklanan şok dalgaları, nötr ve iyonların desorbsiyonunu tetikler. Bu teknik 10000 Da'nın üzerinde iyonların gözlemlenmesine izin vermiştir (Mac Neal ve Mac Farlane 1981). Bununla birlikte günümüzde kullanımı sınırlıdır ve esasen matris destekli lazer desorbsiyon iyonizasyonu ile değiştirilmiştir.

2.8.1.10.Lazer Desorbsiyon

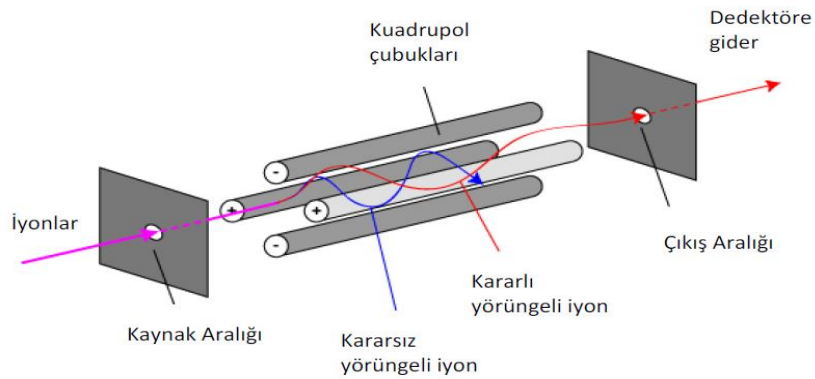
Lazer desorbsiyonu gaz iyonların üretilmesi için etkili bir yöntemdir. Genel olarak, 10^6 - 10^{10} Wcm²'ye kadar olan lazer darbeleri yaklaşık 10^{-3} - 10^{-4} cm²'lik bir numune yüzeyi, çoğunlukla bir katı üzerinde odaklanır. Bu lazer atımları malzemeyi yüzeyden kaldırır ve örnek yüzeyin yakınındaki yoğun buhar fazında aralarında reaksiyon gösterebilen iyon ve nötr moleküllerin bir mikrop plazmasını oluşturur. Lazer darbesi hem buharlaştırmayı hem de numunenin iyonizasyonunu gerçekleştirir (Hillenkamp ve ark 1990).

2.9.Kütle Analizörleri

Elektron bombardımanı ile iyon kaynağında oluşan farklı m/z oranına sahip iyonlar, bu oranların niceliğine göre kütle analizörü tarafından ayrıştırılarak detektöre gönderilirler. Hassasiyeti yüksek kütle analizörleri bu oranların niceliğinin düşük farklılıklarını ayrıştırabilecek niteliktedir. Ayrıca kütle analizörleri, kolayca ölçülebilir iyon akımları elde etmek için yeterli sayıda iyon geçişi sağlayabilmelidir. Ancak hassasiyet ve geçirgenlik birbiriyle zıt iki kavramdır. Diğer bir ifade ile yüksek hassasiyette düşük geçirgenlik meydana gelirken, yüksek geçirgenlikte düşük hassasiyet oluşmaktadır. Bu nedenle kütle spektrometresinde analite özel hassasiyet/geçirgenlik optimizasyonu yapılmaktadır. Manyetik sektör analizörler, kuadrupol analizörler, uçuş zamanlı analizörler, iyon kapanları olmak üzere dört çeşit kütle analizörü vardır (Binici 2014).

2.9.1.Kuadrupol analizörler

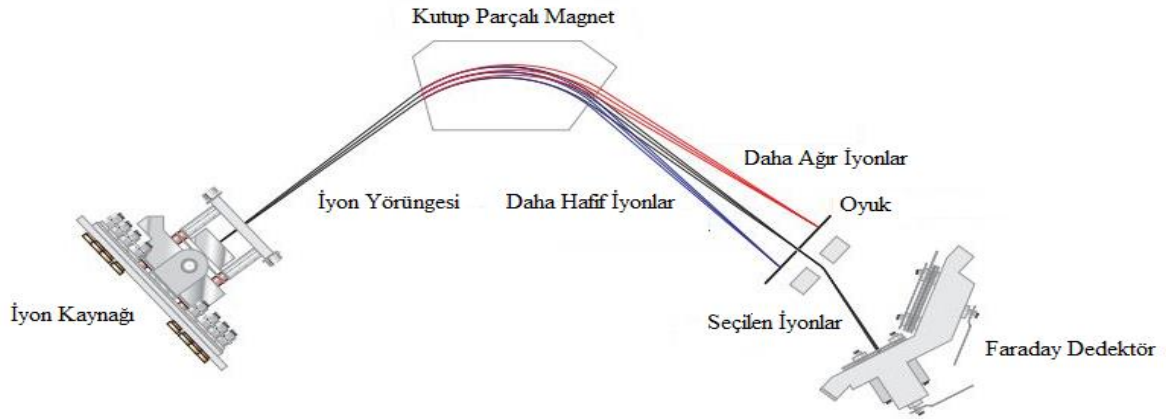
Kuadrupol kütle analizörleri, yalıtkan seramik olup yapıya bağlı dört adet metalik silindirik çubuktan oluşan bir yapıdır. Bu yapıya radyo frekanslı alternatif akım potansiyeli uygulandığında çubuklar arasında elektriksel olarak bir zıt yüklenme ve potansiyel fark oluşmaktadır. Bu kuadrupol çubuklar çiftler olarak zıt yüklenirler (2'si pozitif, 2'si negatif). Bu arada çubuklara uygulanan akım ve alternatif akım potansiyelleri, oranları sabit tutularak aynı anda artırılır. Elektron çarpışması sonucu oluşan yüklü iyonlar, kuadrupol çubuklara çarpar ve nötrale olurlar. Ancak kuadrupol çubuklarına ait potansiyel farkı nedeniyle oluşan özel bir titreşim alanı sayesinde iyonların dedektöre yönlendirilmesini sağlar. Bu sayede, sınırlı miktarda ve değerdeki m/z değeri taşıyan iyonlar dedektöre ulaşır (Rossi ve Sinz 2002). Bir kuadrupol kütle analizörü Şekil 2.13'de gösterilmektedir.



Şekil 2.13 Kuadrupol analizörü (Anonim 2009)

2.9.2. Manyetik Sektör Analizörler

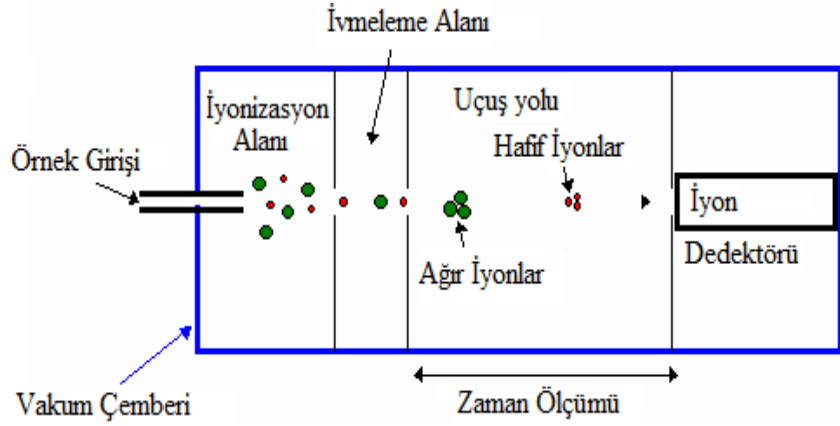
Manyetik sektör analizörlerinde kalıcı mıknatıslar veya elektromıknatıslar kullanılır; bu mıknatıslar iyon kaynağından gelen demete 180, 90 veya 60 derecelik açılarla dairesel hareket yaptırırlar (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 Manyetik sektör analizörü (Anonim 2017a)

2.9.3. Uçuş Zamanlı Kütle Analizörleri

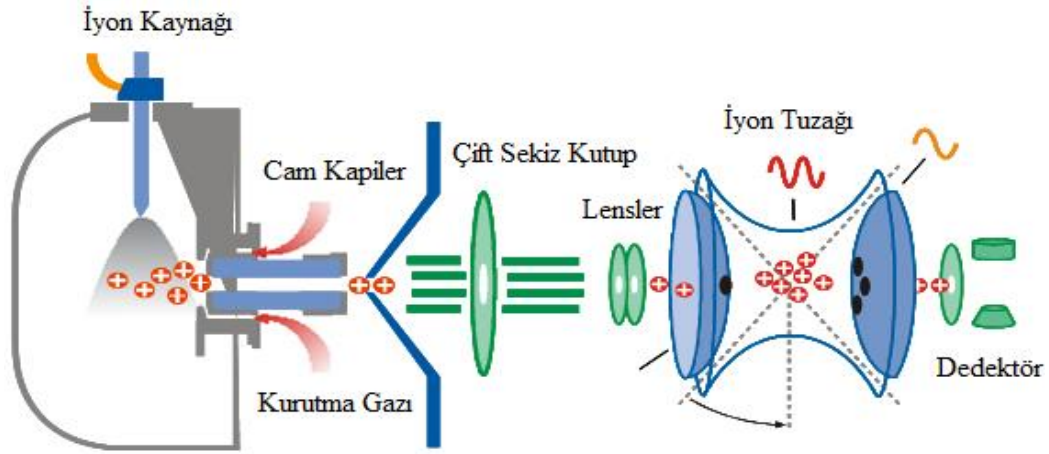
Kısa süreli bir elektron pulsu ile bombardıman yapılarak pozitif iyonlar üretilir. Üretilen iyonlar daha sonra iyonizasyon pulsu ile aynı frekanstaki bir elektrik alanı pulsu ile hızlandırılır. Hızlandırılmış tanecikler, bir metre boyundaki elektrik alanı bulunmayan bir "ayırma tüpü"ne girerler (Şekil 2.15). Tüpe giren tüm taneciklerin kinetik enerjisi aynıdır; böylece her birinin hızı, kütleleri ile ters orantılı olacak şekilde farklı olur. Daha hafif tanecikler kollektöre ağırlardan daha kısa zamanda ulaşırlar. Zaman-yol bağımlı kütle spektrometrelerdeki dedektör bir elektron multiplier (çok kademeli) tüptür; tüpün çıkışı bir katot ışını osilaskopun dikey döndürme levhalarına beslenir, yatay tarama hızlandırma pulsları ile senkronize edilerek kütle spektrumun tamamı osilaskop ekranında görüntülenir (Anonim 2016b).



Şekil 2.15 Ayırma tüpü (Anonim 2016d)

2.9.4.İyon Tuzaklı Analizörler

İyon tuzaklarında gaz anyon veya katyon oluşturulur ve elektrik ve/veya manyetik alanlar içinde uzunca sürelerle hapsedilir. İyon kapanı analizöründe üç elektrot bulunur. Merkez elektrot halka; üst ve taban elektrotlar yarım küre şeklindedir. İyonizasyon ve kütle analizi aynı yerde gerçekleşir. Ayrılan iyonlar bir iyon dedektörüyle ölçülür; kullanımı en yaygın olan dedektör, sürekli dinod tip bir iyon dedektörü olan elektron multipliyerlerdir. (Şekil 2.16)



Şekil 2.16 Elektron multipliyer iyon dedektörü (Anonim 2016c)

2.10.Kütle Spektrometre/Kütle Spektrometre (Tandem Kütle Spektrometre MS-MS)

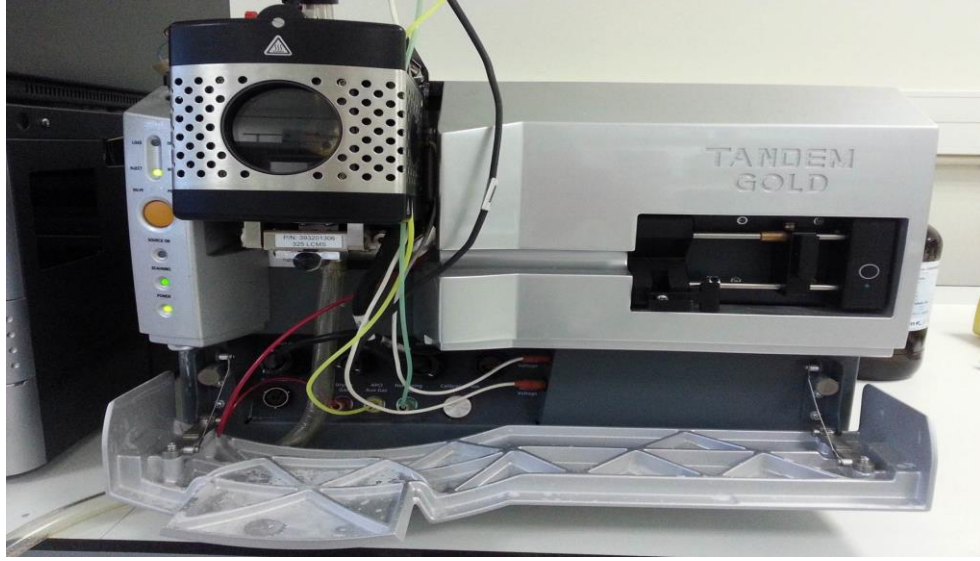
Kütle spektroskopisinde, hassasiyet ve geçirgenlik birbiriyle zıt iki kavram olup, yüksek hassasiyette düşük geçirgenlik, yüksek geçirgenlikte düşük hassasiyet vardır. Kütle spektrometre/kütle spektrometre de optimum hassasiyet/geçirgenlik seviyesi sağlanabilmektedir. Bu kütle spektrometre/ kütle spektrometre tekniğine, tandem kütle

spektrometre veya kısaca MS-MS denir. Bu yöntem kombine iki kütle spektrometreden oluşmaktadır. İlk spektrometre, daha büyük moleküler iyonları oluşturmak için kullanılmaktadır. Buradan eliminasyonu aşan iyonlar, termodinamiksel olarak daha kararlı faza 2. kütle spektrometresinde geçmektedir. 2. kütle analizöründe elenen moleküller hassasiyeti ve geçirgenliği yüksek dedektörde analiz edilmektedir (Hoffmann ve Stroobant 2007).

Tandem kütle spektrometresinde, ilk spektrometrede düşük enerji yüklü bir iyonlaştırma kaynağı (genellikle kimyasal iyonlaştırma) bulunmaktadır. Burada elektron çarpışmasıyla iyonize olan moleküler, ikinci spektrometreye girdikten sonra ikinci bir iyon kaynağından geçerler. Genellikle bu ikinci iyon kaynağı, helyum içermektedir. Burada yüksek kinetik enerjili moleküler iyonlar, kararlı yapıdaki helyum atomlarına çarparak daha küçük iyonlara dönüşürler. Bu iyonlar dedekte edilerek, kromatogramları elde edilmektedir. Tandem kütle spektrometresinde, 1. spektrometre, GC ve HPLC cihazlarında olduğu gibi kromatografik kolonunun eleme görevini yapmaktadır. 2. spektrometre ise elemeyen geçen iyonların saflaştırılmasını sağlamaktadır (Binici 2014).

Tandem kütle spektrometre, GC-MS ve LC/MS avantajlarının yanında hızlı analizle düşük tayin süresi ve optimum hassasiyet/geçirgenlik seviyesi sağlamaktadır. GC-MS ve LC/MS birkaç saate kadar ulaşan tayin süreleri, tandem kütle spektrometre ile birkaç milisaniyeye düşmektedir. Ayrıca, kromatografik tekniklerin ölçüm aralığı, tandem kütle spektrometresine göre çok daha yüksek derişimdedir. Yani tandem kütle spektrometresi ile çok daha düşük analit konsantrasyonu bulunduran örneklerin analizi (1/100-1/1000 derişiminde) yapılabilir. Tandem kütle spektrometre, sinyal/gürültü oranı diğer kromatografik tekniklere oranla daha düşüktür (Covey ve ark. 1986).

Bu doktora tez çalışmasında, Şekil 2.17’de gösterilen sıvı kromatografi kütle spektrometre/kütle spektrometre (tandem kütle spektrometre) kullanılmıştır.



Şekil 2.17 Tandem Gold kütle spektrometre

2.11.Kararlı İzotop Oranı Kütle Spektrometri

Kararlı izotop oranı kütle spektrometresi (IRMS) arkeoloji, tıp, jeoloji, biyoloji, besin orijinalliği ve adli bilimler gibi disiplinlerde giderek daha yaygın kullanılan bir tekniktir. Bir organik maddenin kaynağını belirleme kabiliyeti, malzemeyi oluşturan elementlerin göreceli izotopik bolluğundan kaynaklanmaktadır. Karbon, hidrojen, oksijen, sülfür ve azot gibi elementlerin izotop oranları, çeşitli kinetik ve termodinamik faktörler yoluyla zenginleştirilebilir veya tükenebilir olduğundan, izotop oranlarının ölçümünü, aynı kimyasalı bulunduran numuneler arasında ayırt etmek için kullanılabilir (Muccio ve Jackson 2009). Bu izotoplar; $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ve $^2\text{H}/^1\text{H}$ (veya D/H)'dir (Werner ve Brand 2001). Kararlı izotopların analizi doğal sistemlerdeki izotopların fraksiyonların belirlenmesi ile gerçekleştirilir. İzotop oranlarının hassas bir şekilde belirlenmesi amacıyla kullanılan Kütle Spektrometreleri Magnetik sektördür (Muccio ve Jackson 2009). Manyetik bir sapırma kütle spektrometresinde, iyon kaynağından çıkan iyonlar yüksek bir hıza hızlandırılır. İyonlar daha sonra, manyetik alanın iyon hareket yönüne dikey bir yönde uygulanacağı bir manyetik kesimi geçer. Bu nedenle, manyetik alan bir yay çizer. Yayın yarıçapı ve açısı farklı iyon optik tasarımlarıyla değişir. Yalnızca bir manyetik sektör, iyonları kendi kütle/yük oranlarına göre ayırmaktadır. Bununla birlikte, çözünürlük, iyon kaynağından ayrılan iyonların hepsinin tam olarak aynı enerjiye sahip olmadığı ve dolayısıyla tam olarak aynı hıza sahip olmadığı gerçeği ile sınırlanmaktadır.

IRMS kütle spektrometresi bir takım numune besleme ve hazırlama (NBH) sistemleri ile birlikte akuple edilerek kullanılır (IRMS Inlets). Bu sistemlerin seçimi yapılacak uygulamaya, numune türüne ve istenen hassasiyete göre farklılık göstermektedir. Bu amaçlarla sistem konfigürasyonlarında birleştirici ara yüzler, seyrelticiler ve otomatik numune yükleyicileri kullanılır. Tüm sistem tek ve güçlü bir yazılım ile bilgisayar kontrolü altında olmalıdır (Muccio ve Jackson 2009).

2.12. İzotop Seyreltme Kütle Spektrometri (IDMS)

İzotop Seyreltme Kütle Spektrometrisi metodu (IDMS) tekniği ilk olarak 1950'lerde inorganik madde analizlerinde, sonraki yıllarda ise organik maddelerde kullanılmıştır. Bu tekniğin sınırlayıcılığı, analitin izotoplu bileşikler mevcudiyetidir. Ayrıca bu teknik geniş kullanım alanı olan referans bir tekniktir.

Literatürde kütle spektrometre kullanılarak pek çok nicel analiz yöntemi bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, bir veya birkaç kararlı izotop, iç standart olarak kullanılarak metodu geçerli kılma hesaplamalarının ve belirsizlik bütçesinin oluşturulması için yanıt faktörleri belirlenmektedir. İzotop seyreltme kütle spektrometri (IDMS) tekniği, miktarı bilinen izotop analitin, analitle birlikte bir ölçüm metodundaki tüm aşamalardan geçirilerek, yöntem sürecinde oluşan etki ve kayıpların minimize edilmesi için analiz edilmesi prensibine dayanır. Elde edilmek istenen oran, metot başlangıcı izotop analit miktarının, metot sonrası izotop analit miktarına oranıdır. Bu yanıtların oranı kullanılarak analitin miktarı bulunur. IDMS tekniği, örnek hazırlama ve analiz sürecinde oluşacak her türlü hatayı, kalibrasyon problemlerini ve matriks etkilerini minimize etmektedir (Binici 2014).

IDMS tekniğinin avantajları;

- Geri kazanım problemi, yanıt faktörü ile elimine edilir.
- Örnek hazırlama ve analiz sürecinde oluşacak her türlü hatayı, kalibrasyon problemlerini ve matriks etkilerini minimize ettiği için kesinlik ve doğruluğu yüksek, belirsizliği düşük bir metot sunar.
- Kişisel analiz hatalarını bertaraf eder.

IDMS tekniğinin dezavantajları;

- Söz konusu analit izotopu olduğu için tüm analitlerin izotopu bulunmamaktadır. Ayrıca bulunan izotoplar pahalıdır.
- Operatörün konu hakkında gerekli bilgi ve tecrübeye sahip olması gerekir.
- İzotopun, analitle reaksiyona girmemesi gerekir.
- Analit ile izotoplu bileşiğinin arasındaki kimyasal farklılıklar nedeniyle oluşan iyonlarında farklılaşma olmasıdır (Webb ve Carter 1997).

LC-MS/MS ile kalıntı sülfonamid analizlerinde daha doğru ve kesin sonuçlar için IDMS referans metot olarak kabul edilmektedir. IDMS metodu için analitin izotopça zenginleştirilmiş türevine ihtiyaç duyulmaktadır. Sülfonamidler için yapılmış olan literatür taraması sonucu, yapılan kalıntı analizlerinin birçoğunda Çoklu Reaksiyon Görüntüleme (MRM) metodu kullanılmış ve piyasada mevcut olan izotopça zenginleştirilmiş sülfonamidlerden biri veya birkaçı iç standart olarak kullanılarak analizler yapılmıştır (Chai ve ark. 2008, Forti ve Scortichini 2009, Verzeqnessi ve Stadler 2002). Sülfonamidlerin birçoğu için izotopça zenginleştirilmiş türevi bulunmamakta olup, bunların sentezine ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer taraftan, literatürde, en fazla HPLC metoduyla sülfonamidlerin tayini konusunda çalışmalar mevcuttur (Samanidou 2008).

Tüm literatür verileri değerlendirildiğinde süt ve et ile bunların ürünlerinde çok sınırlı sayıda izotop kullanılarak (genellikle 1-3) izotop seyreltme yöntemi çalışıldığı görülmektedir. Bunlarla birlikte, geniş bir sülfonamid bileşik ailesinin eşlenik izotopları kullanılarak bir araştırma yapılmamıştır.

2.13.Sülfonamidlerin Ekstraksiyon Teknikleri

Sülfonamidlerin hidrofobikliğinin düşük olmasından dolayı herhangi bir hidrofobik çözücü kullanımıyla özütlenmesi oldukça zordur. Sülfonamidlerin doğasını bozmadan matriksten elde edip, ölçüm limitlerinin üstünde analiz edebilmek için konsantrasyonunu arttırmak gerekmektedir. Bunun için sülfonamidler matriksten ekstrakte edilir. Sabit sıcaklık ve basınçta bir maddenin iki fazdaki denge derişimlerinin farklı olmasından yararlanarak yapılan ayırma işlemine ekstraksiyon adı verilir. Fazlardan biri katı biri sıvı olabildiği gibi her ikisi de sıvı olabilir. Buna göre, sırayla katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyonlarından söz edilir.

Sülfonamidlerin ekstraksiyonunda;

- Sıvı-sıvı ekstraksiyon,
- Katı faz ekstraksiyonu,
- Katı faz mikroekstraksiyonu (SPME),
- Moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonu,
- Basınçlı çözgen ekstraksiyonu,
- QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ekstraksiyonu,
- Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon,
- Mikrodalga yardımı ile iyonik sıvı bazlı dağılan sıvı-sıvı mikroekstraksiyon,
- İyonik sıvı bazlı tek damla sıvı faz mikroekstraksiyonu gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Manzanares ve ark. 2014).

2.13.1.Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon

Matriks ve örneğin değişik çözünürlük gösterdiği birbiri içinde çözünmeyen sıvıların veya fazların arasında örneğin dağıtılmasına veya bölünmesi prensibine dayanır. Burada bir faz sıvı (genelde daha yoğun ve ağır faz), diğer faz organik çözücüdür (daha hafif faz). Ekstraksiyon prosesi daha polar hidrofilik bileşiklerin sıvı (polar) faza geçmesi, polar olmayan hidrofobik bileşiklerin organik çözücüye geçmesidir (Dean 2009). Asetonitril, metanol, amonyum-asetonitril ve amonyum metanol solüsyonları ayrıca asetonitril ve metanolun asetik asit solüsyonları eluent olarak kullanılır (Hou ve ark. 2014).

2.13.2.Katı faz ekstraksiyon

Katı faz ekstraksiyon sıvı örneğin katı faz veya sorbent ile teması ve bileşiğin seçici olarak katı faz yüzeyine absorbe olması esasına dayanır (Moors ve ark. 1994). Katı faz sorbenti genellikle küçük tüplerin veya kartuşların içine pakettir. Örnek içeren çözücü basınç veya vakumla sorbentin içinden geçirilir. Ekstrakte olan materyal uygun çözücü ile elute edilir. Genellikle katı faz sorbentleri üç sınıfa ayrılır: normal faz, ters faz, iyon değişimi. En yaygın sorbentler partikül çapı 30 ve 60 µm olan silika partiküllere dayanır. Normal faz sorbentleri modifiye edilmemiş silika, siyano, amino ve diol gibi polar fonksiyonel gruplara sahiptir. Ters faz sorbentleri oktadesil, oktil ve metil gibi polar olmayan fonksiyonel gruplara sahiptir. İyon değişimi sorbentleri katyonik veya anyonik fonksiyonel grupları içerir. Sülfonamidlerin çözücü bazlı ekstraksiyonunda SPE (katı faz ekstraksiyonu) ile kombinlenebilir. Değişik polimerik sorbentlerle dolu olan kartuşlar şunlardır: Oasis MCX

(Cheng ve ark. 2011), Oasis HLB (Deng ve ark. 2011), Nexus Abselul (Zotou ve Vasiliadou 2010), BondElut SCX (Han ve ark. 2013), Cleanert PEP (Farooq ve ark. 2009), Strata SCX (Wang ve ark. 2011), LiChrolut C18 (Kowalski ve ark. 2011), Hysphere C18 HD (Mendoza ve ark. 2012) ve Sep-Pak C18'dir (Jornet ve ark. 2010).

2.13.3.Basınçlı Çözgen Ekstraksiyonu

Basınçlı çözgen ekstraksiyonu, farklı bir tür katı-sıvı ekstraksiyon tekniğidir. Basınçlı çözgen ekstraksiyonu, hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonu, basınçlı akışkan ekstraksiyonu, basınçlı sıcak çözgen ekstraksiyonu, yüksek basınçlı çözgen ekstraksiyonu, yüksek basınç yüksek sıcaklıkta çözgen ekstraksiyonu ve subkritik çözgen ekstraksiyonu olmak üzere farklı isimlerle bilinmektedir (Nakilcioğlu 2014). Bu teknikte çeşitli numunelerden hedef bileşiklerinin hızlı bir şekilde özütlenmesini sağlamak için yüksek sıcaklık ve basınçta sıvı solventleri kullanır (Dunford ve ark. 2010). Yüksek sıcaklık, özütleme oranını artırır; yüksek basınç, çözücünün normal kaynama noktasının üzerindeki sıcaklıklarda kaynamasını engeller. Basıncın, çözücünün sıvı fazda tutulmasından başka ekstraksiyon üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Vandenburg ve ark. 1998). PLE/ASE kullanıldığında, diğer çözücü ekstraksiyon tekniklerine kıyasla zaman ve solvent tüketimi önemli ölçüde azaltılmaktadır. Uygun bir çözücünün seçilmesi, karmaşık bir matristen arzu edilen bileşenlerin alınabilmesi için en önemli adımdır. Solvent-çözünen etkileşimler arasında dağılma ya da London kuvvetleri ve dipolar ve/veya çok kutuplu etkileşimler mevcuttur. Dielektrik sabiti, bir çözücünün polaritesinin bir ölçüsüdür ve çözünen-çözücü etkileşimlerinin belirlenmesinde anahtar bir parametredir. Bir solventin dielektrik sabiti, sıcaklık arttıkça azalır ve dolayısıyla solventin polaritesi düşmektedir (Abboud ve Notario 1999). Tüm bu etkilerin sonucu olarak basınçlı çözgen ekstraksiyonunda klasik ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla daha hızlı ekstrakt eldesi ve daha az miktarda çözgen kullanımı söz konusu olmaktadır.

2.13.4.Moleküler baskılı polimerler (MIPs) tekniği

Sülfonamidlerin seçici izolasyonunda karbon nanomateriyaller ve moleküler baskılı polimerler (MIPs) başarıyla kullanılmıştır. Son yıllarda SPE'de sorbent olarak kullanılırlar. Örneğin karmaşık matrislerden daha seçici ekstraksiyonunu sağlarlar. Hedef molekülü benzer diğer moleküllerden ayıran yapay üretilen çapraz bağlı polimerlerdir. Moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonunda, moleküler baskılamada, hedef molekül, çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır, çapraz bağlanabilen monomerler hedef molekül çevresini sarar ve kalıp benzeri bir tabaka oluşturmak üzere birlikte polimerleşirler. Baskılanacak molekül veya iyon

bir veya daha fazla fonksiyonel monomer ile kovalent, kovalent olmayan etkileşimler ve metal-şelat etkileşimlerine dayanan ön-kompleks oluşturur ve polimerizasyon işlemi sonunda katı polimer içinde veya yüzeyinde sabitleşir. Baskılanmış iyon veya molekülün yapıdan uzaklaştırılması ile bir çözelti içindeki hedef molekül veya iyonun seçici olarak tekrar polimere bağlanmasını sağlayacak şekilde yüksek seçicilikli yuvalar oluşur (Demirli 2014).

Bu teknik yüksek pH, organik çözücü ve sıcaklık koşullarında dayanıklı olduklarından analitik metodlarda esneklik sağlarlar (Boyd ve ark. 2007). Ekstraksiyondaki en yeni yöntemlerden biri de manyetik karıştırıcıdaki örneğe polidimetilsikloheksan ile kaplanmış karıştırıcı çubuğun batırılması ve belirli bir süre karıştırıldıktan sonra çubuğun kurutulması ve bileşiklerin desorbsiyonuyla ekstraksiyon olur. Bu yöntem sütte ve ette sülfonamid analizlerinde kullanılmıştır. Sülfonamidlerin daha iyi ekstraksiyonu için polimetilsikloheksan MIP'ler geliştirilmiştir (Xu ve ark. 2011).

2.13.5.Katı faz mikroekstraksiyon (SPME)

Katı faz mikroekstraksiyon silika kaplı elyafa organik bileşiğin absorbe edilmesi ve ön konsantrasyon yapılması prosesidir. Bu işlemi takiben organik bileşik ayırım ve kantifikasyon için desorbe edilir. En çok kullanılan durgun faz polimetilsikloheksandır. Polar olmayan bu fazdan en fazla polar olmayan bileşikler ekstrakte edilir (Eisert ve Levsen 1996). SPME daha az çözücü kullandığı için sinyalleri iyileştirir. Katı faz mikroekstraksiyon son zamanlarda sülfonamidleri ayırmada kullanılır. Bu metodda kullanılan absorbanlar katı matriksle desteklenirler (Dmitrienko ve ark 2014).

2.13.6.Tek damla mikroekstraksiyon (SDME)

Bu ekstraksiyon tekniğinde sıvı örneğe organik çözücüyü içeren iğne batırılır ve çözücünün iğnenin sonunda tek damla kalacak şekilde çıkışı sağlanır. İğne sıvı örneğe batırılır; manyetik karıştırıcı çubuk ile çöktürme sağlanır. Belirli bir süre sonra (örneğin 30 dk) damla iğneye geri çekilir ve gaz kromatografi enjeksiyona verilir (Dean 2009).

2.13.7.Mikrodalga yardımcı ekstraksiyon

Bu teknikte mikrodalga radyasyonunu absorblayan dielektrik sabiti yüksek olan çözücünün kaynaması, soğutucuya ulaşip yoğunlaşarak cihaza dönmesi ve bunun defalarca tekrarlanmasıyla örnek matrisinden organik içerikler çözücüye geçer. Atmosferik mikrodalga

yardımlı ekstraksiyon sistemi ve basınçlı mikrodalga yardımlı ekstraksiyon sistemi olmak üzere iki çeşittir (Dean 2009).

2.13.8.QUECHERS ekstraksiyonu

Quechers (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam, güvenli ekstraksiyon metodu olup, Steven J. Lehotay ve Michelangelo Anastassiades tarafından geliştirilmiştir. Quechers metodu sayesinde ekstraksiyon ve temizleme işlemi oldukça hızlı ve az çözücü kullanarak gerçekleştirilebilmekte ve oldukça yüksek sayıda örneğin ekstraksiyonu mümkün olmaktadır. Quechers metodu 2003 yılında meyvelerde ve sebzelerde pestisitlerin analiz edilmesi için geliştirilmiştir. Quechers metodu iki aşamayı içerir. Birinci aşama tuzların uzaklaştırılması sulu ve organik fazlar arasındaki dengeyi kapsar. İkinci aşama dağılan SPE'dir. Magnezyum sülfat ile saflaştırma ve değişik sorbentler (C18, primary-secondary amin) ile girişimler uzaklaştırılır. Quechers metoduyla diğer ekstraksiyon metodlarının etkinliğinin karşılaştırıldığı çalışma yapılmıştır. Quechers metodu ile sülfonamidler süt ve yumurtalardan %85'ten fazla ayrılır (Macedo ve ark. 2013).

2.13.9.Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon

Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon tekniğinde, analitin içinde bulunduğu sulu faz içinde karışmayan ancak dispersif olarak dağıtılan çok küçük hacimli organik faza (apolar) apolar yapılı analitler geçer. Bu metottaki amaç kütle transfer yüzeyini dispersiyonla arttırmaktır. Bir müddet sonra dağılan sıvı santrifüj ile toplanır. Elde edilen sıvı doğrudan ya da temizleme basamağından geçirilerek analizöre verilir. Düşük örnek hacmi, düşük maliyet, yüksek geri kazanım ve yüksek zenginleştirme faktörü elde edilmesi dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon tekniğinin avantajlarından (Altun ve ark. 2012).

2.14.Gıda Ürünlerinde Sülfonamid Bileşikleri Kalıntılarına Dair Araştırmalar

Sülfonamidlerin gıdalarda belirlenmesi konusunda pek çok çalışma yapılmış olup aşağıda çeşitli literatür çalışmaları sunulmuştur;

Moretti ve ark. (2016)'nın çalışmasında 10 değişik ilaç grubuna giren sülfonamidlerin de içinde olduğu 62 antibiyotik ette LC-HRMS/MS ile ACN ile ekstraksiyondan sonra analiz edilmiştir. Sığır kasında 3,3 µg/kg'dan 150 µg/kg'a antibiyotiklerin tümüyle valide edilmiştir. Geri kazanımlar % 71- 95 arasındadır.

Kıvrak ve ark. (2016), sülfonamid grubunun içinde bulunduğu ultrasonik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen 23 adet antibiyotik için analiz metodu geliştirmiştir. 0-200 ppb aralığında matriks eşlemeli kalibrasyon eğrisinde her bir antibiyotik için en az r^2 0,99 ile doğrusallık elde edilmiştir. Sülfonamidlerin LOD değerleri 0,15-0,54 ppb aralığında, LOQ değerleri 0,26-0,90 ppb aralığındadır. Sülfonamidlerin geri kazanım değerleri %81,3-86,8 aralığındadır.

Abdallah Hiba ve ark. (2016), Lübnan'daki çiftliklerden 304 et örneği almışlardır. LC-MS ile analiz etmiştir. Sülfonamidler Quechers ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. 46 örnekte sülfonamid kalıntılarına rastlanmıştır. Tavuk örneklerinin 10 tanesinde sulfakuinoksalin 151,4-1196,7 µg/kg görülmüştür. Dana eti örneklerinden birinin 109,8 µg/kg sülfadiazin içerdiği görülmüştür.

Özkan ve ark. (2015), Ardahan ve ilçelerinden toplanan 180 adet bal numunesinin sülfonamid ve streptomisin kalıntısı analizlerini ticari kit kullanarak Elisa yöntemiyle gerçekleştirmiştir. Sülfonamidlerin analiz sonuçlarında numunelerin %52'sinde kalıntı tespit edilmiştir.

Han ve ark. (2015), çiğ sütte yaptıkları çalışmada, içinde sülfonamid grubunun da bulunduğu 38 antibiyotik kalıntısının belirlenmesi için UPLC-MS/MS ile metod geliştirmişlerdir. Ekstraksiyon için asetonitril kullanılmıştır. Sülfonamid bileşiklerinin geri kazanımı %71-106 aralığındadır. LOQ değeri 0,03-10 µgkg⁻¹ aralığındadır. Saha çalışmasında çiğ süttten alınan örneklerde 1,77 µgkg⁻¹ sülfapridin ve 4,2 µgkg⁻¹ sülfametoksazola rastlanmıştır.

Kung ve ark. (2015), balık dokularında eser miktarda bulunabilen 14 adet sülfonamid bileşiğini Quechers ekstraksiyon sonrasında LC-ESI/MS-MS ile belirlemişlerdir. Kalibrasyon eğrisi 10-100 ppb konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Korelasyon katsayısı (r^2 : 0,9950-0,994) ile doğrusallık elde edilmiştir. Sülfonamidlerin geri kazanım değerleri % 80,2-93,5 aralığındadır.

Juan-Borrás ve ark. (2015), bal örneklerinde sülfonamid bileşiklerini LC-MS-MS ile analiz etmişlerdir. Katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Kalibrasyonlar 5-100 ppb aralığında r^2 :0,993-0,999 elde edilmiştir. Geri kazanım değerleri % 89-114 aralığındadır.

Abdallah ve ark. (2014), HPLC-MS-MS ile yenilebilir hayvan etlerinde 20'den fazla sülfonamid kalıntısına bakılmıştır. LOD değerleri 0,5-14,5 µg/kg ve LOQ değerleri ise 1,8-48,4 µg/kg'dır. Lübnanda toplanan et örneklerinde 70,2 µg/kg sulfamethazin; 62,5 µg/kg sulfadimetoksin'e rastlanmıştır.

Abdallah ve ark. (2014), bir çalışmada yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresinde et çeşitlerinde (sığır, koyun, tavuk, domuz) Quechers ekstraksiyon yöntemiyle 22 sülfonamid bileşiğinin ve bunların metabolitlerinin analizini yapmışlardır. Mevcut çalışmada, lineerliğin; $R^2 < 99$, algılama sınırının, LOD; 3-26 µg/kg, tayin sınırının, LOQ; 11-88 µg/kg, doğruluk, geri kazanımın; %88-%112, gün içinde ve günler arası kesinliğin %1-%4 ve %1-%17 olduğu ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçları, maksimum kalıntı limiti (100 µg/kg) civarında olduğu belirtilmiştir.

Dubreil-Chéneau ve ark. (2014) balda katı faz ekstraksiyonu ile ekstrakte edilen 13 sülfonamidin LC-MS/MS ile analiz metodunu geliştirmiş ve valide etmişlerdir. İç standart olarak sulfadimerazin- $^{13}C_6$, sulfadiazin- $^{13}C_6$, sulfatiazol- $^{13}C_6$, sulfadimetoksin- d_6 , sulfadoksind $_3$ kullanılmıştır. Kalibrasyonlar 10-50 ppb konsantrasyon aralığında r^2 : 0,97 üzerinde doğrusallık göstermiştir. Geri kazanımlar %85,8-110,2 aralığındadır. Bağlı standart sapma değerleri %2,6-19,8 aralığındadır.

Tölgyesi ve ark. (2013), ulusal kalıntı planında 400 adet bal örneğinde sülfonamidleri incelemişlerdir. Örneklerde sulfadimetoksin, sülfakloropiridazin ve trimetoprim kalıntıları 0,03µg/kg'dan 686 µg/kg'a değişmektedir.

Parab ve Amritkar (2012), sütte 10 adet sülfonamid bileşiğinin belirlenmesi için Quechers metodunu kullanarak LC metodu geliştirmiştir. Sülfonamidler, asetonitril fazından LC-MS/MS elektrosprey iyonizasyon ile analiz edilmiştir. Örnek olarak düşük ve yüksek yağlı pastörize süt ve süt tozu çalışmada kullanılmıştır. Yüksek yağlı sütte, 10 adet sülfonamid bileşiği için LOQ değerleri 5,3-11,2 µg/L'dir. 10 adet sülfonamid bileşiğinin birleştirilmiş LOQ değeri 83,15 µg/L olup, Avrupa birliğinin belirlediği maksimum kalıntı miktarının altında sonuç elde edilmiştir.

Mehtabududdin ve ark. (2012), çalışmalarında, domuz etinde ve yumurtada sülfonamidlerin analizini asetonitril ve n-hexan ile sıvı-sıvı ekstraksiyon ve domuz eti

örneklerinde C18 kolon ile saflaştırma sonrasında HPLC-UV’de 265 nm dalga boyunda incelemiştir. LOD değeri domuz etinde 0,02 µg/g; yumurtada ise 0,025 µg/mL bulunmuştur. Et ve yumurta örneklerinde 0,02-0,8 µg/g sülfonamid kalıntısına rastlamışlardır.

Sezer (2011), süt ve balda HPLC-DAD ile sülfadiazin (SDA) ve sülfametoksazol (SMZ) tayini gerçekleştirmiştir. Sülfonamidlerin ekstraksiyonu yüzey aktif madde kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, metanol: su (22:78, v/v) izokratik solüsyonudur. LOD değeri SDA ve SMZ için sırasıyla 5,68-20,09 ppb, LOQ değeri 6,06-21,86 ppb arasındadır. 0,025-2,000 ppm konsantrasyon aralığında geri kazanım yüzdesi SDA için % 65, 2, SMZ için %99,4’tür.

Elizabeta ve ark. (2011), 2008-2011 yılları arasındaki çalışmanın bir kısmında Makedonya’da 8 farklı bölgede ham sütlerde Elisa kitleri ile 13,5-147,9 µg/kg sülfonamid konsantrasyonlarına ulaşmışlardır.

Ho Kim ve ark. (2011) çalışmalarında, sütte sülfonamidler, moleküler baskılı polimerik katı faz ekstraksiyonu ile ön işleme tabi tutulmuş ve LC-APCI/MS metoduyla analiz edilmiştir. İzotop olarak ¹³C₆ SMZ kullanılmıştır.

Güneş ve ark. (2009), Güney Marmara Bölgesinden temin ettikleri farklı türlerden 50 çeşit bal örneğinde sülfonamid bileşiklerini (sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfadimetoksin) kalıntılarını LC-ESI-MS ile araştırmış olup, incelenen örneklerde herhangi bir kalıntı görmemişlerdir.

Forti ve Scortichini (2009), yumurtada sıvı kromatografi tandem spektrometre ile 10 adet sülfonamid bileşiğinin tayinini çalışmışlar ve ¹³C₆ –sülfametazin izotopunu iç standart olarak kullanmışlardır.

Uludağ (2008), Ege bölgesinde tüketime sunulan 103 bal örneğinde sülfonamid kalıntılarını sıvı-sıvı ekstraksiyon ardından florasan dedektör kolon sonrası türevlendirme metodu ile HPLC’de araştırmıştır. Sülfanilamid, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametoksazol, sülfadimetoksin için 10, 15, 20 ng/g karışık standart yüklü bal örneklerinin geri kazanım ortalamaları %53,99-67,11 arasında bulunmuştur. Kesinlikleri % 1,10-6,86 arasında değişmiştir. Günlük tekrarlanabilirlik %0,48-6,03 arasındadır. Günlerarası

tekrarlanabilirlik %4,8-10 aralığındadır. LOD değeri 1,51-1,61 ng/g aralığındadır. Değerlendirme limiti (LOQ) 5,51-7,34 ng/g arasındadır. Çalışmada 103 bal örneğinin %23'ünde sülfonamid kalıntısı tespit edilmiştir. Pozitif örneklerin %68'inin sülfametazin, %12'sinin sülfamerazin, %20'sinin sülfametoksazol kalıntılarından oluştuğu belirlenmiştir.

Cai ve ark. (2008), Ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) tandem kütle spektrometresi (elektrospray iyonizasyon metodu) ile ette 24 adet sülfonamid bileşiğini araştırmışlardır. Ön işlem olarak sıvı ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. Et örnekleri önce homojenize edilmiş, ardından asetonitril ile proteinler çöktürülmüş, n-hekzan ile yağı uzaklaştırılmış, daha sonra etil asetat ile sıvı-sıvı ekstrakte edilmiştir. Kütle spektrometre de 3'lü kuadrapol kütle analizörü kullanılmıştır. Kalibrasyonlar örnek matrisle, izotop seyreltme metoduyla gerçekleştirilmiş ve iyonizasyon üzerine örnek matrisinin etkisi incelenmiştir. İzotop seyreltme metodunda, 3 adet sülfonamid izotop bileşiği iç standart olarak kullanılmıştır. Bu izotoplar, sülfadiazin-d₄ (SD-d₄), sülfamethazin-d₄ (SMZ-d₄) ve sülfadimetoksin-d₄'dür. 0,2-50 µg/kg aralığında R²: 0,991-0,999 olarak görülmüştür. Geri kazanımlar %67,8-113,9'dır. Bu çalışmada, SPE metoduna göre sıvı-sıvı ekstraksiyon metodunun ön işlem süresini ve maliyetini düşürdüğü ifade edilmiştir.

Aguilera ve ark. (2008), çalışmalarında sütte antibiyotik analizinde ön işlem olarak Quechers metodunu kullanmışlardır. Fakat sadece sulfadimidin ve sulfaquinoksolini belirlemişlerdir. Sulfadimidin için geri kazanım % 91-%104 aralığında iken; sulfaquinoksalin için geri kazanımın % 73-% 96 aralığında olduğunu belirlemişlerdir.

Mohamed ve ark. (2007), balda sıvı kromatografi kütle spektrometri IDMS yöntemiyle sülfonamidlerin kantitatif tayinini gerçekleştirmişlerdir. IDMS metodunda, d₄-sülfatiazol (d₄-STZ, saflığı > %99); d₄-sülfadimetoksin (d₄-SDT, saflığı > %98), d₄- sülfametazin (d₄-SMZ, saflığı > %98), d₄-sülfamerazin (d₄- SMR, saflığı > %98), d₄-sülfadiazin (d₄-SDZ, saflığı > %98), and d₄-sülfametoksazol (d₄-SMX, saflığı > %98) izotop olarak kullanılmışlardır.

Koesukwiwat ve ark. (2007)'nın çalışmasında, sütte 6 adet sülfonamid katı faz ekstraksiyonu kullanılarak izole edilmiştir. Sıvı kromatografi-elektrosprey kütle spektrometrisi ile analiz edilmiştir. LOD 0,48'den 2,68'e, LOQ ise 0,61'den 8,64 ng/mL 'ye değişir. Geri kazanımlar % 72,01'den % 97,39'a değişir. Gün içi ve günler arası kesinlik RSD > % 11,08'dir.

Huang ve ark. (2007) çalışmalarında, inek sütünde SNM, SDZ, SMZ ve SMZ bileşikleri, etanol-asetik asit (97:3) ile proteinler uzaklaştırıldıktan sonra HPLC ile belirlenmiştir. Ether Type C₈ (partikül boyutu 5 µm) kolon ve asetonitril su karışımı mobil faz ile kullanılmıştır. Geri kazanım % 80,1-87,6'dır. 270 nm'de SNM için 30 ng/mL ve SDZ, SMZ, SMZ için 60 ng/mL LOD değerleri elde edilmiştir.

Lu ve ark. (2007) çalışmalarında, SDZ, STZ, SMZ, SMZ, SMMX, SMX, SQX ve SDMX tavuk dokusunda SPME ile tutuklanmış ve analizler LC-MS ile gerçekleştirilmiştir. Supelco LC-DB 18 (5 mm) analitik kolon, mobil faz olarak A'da su ve B'de (%80 asetonitril suda) (70:30) seçilmiştir. LOD değeri ette 0,6- 7,5 ve 16- 39 g/kg'dır. Marketten alınan örneklerde 52 µg/kg'dan 157 µg/kg'a kadar sülfonamidler görülmüştür.

Wu ve ark. (2007) çalışmasında, SDZ, STZ, SMZ, SMP, SMMX, SMX, SDMX ve SQX sığır sütünde filtrasyon ve etil asetat ile ekstraksiyonla belirlenmiştir. Saflaştırma katı faz ekstraksiyonu ile yapılmıştır. Kolon olarak ODS-3 C18 (5 mm) ve mobil faz olarak % 0,1 asetik asit solüsyonu ve 1:1 metanol ve asetonitril karışımı kullanılmıştır. Geri kazanım %70,5-%89 arasındadır. 270 nm'de LOD değeri 0,8-1,5 µg/L elde edilmiştir.

Jessome ve Volmer (2006), matriks etkilerinin, endojen içerikler, eksojen maddeler, örneğin kendisinden kaynaklanmayan örnek hazırlamadaki kontaminasyonlar, örnekteki uçucu olmayan içerikler, örnek hazırlama teknikleri ve analizde çeşitli operasyon koşulları olduğunu ve bunların düşük doğruluk ve hassaslığa sebebiyet verdiğini ifade etmiştir.

Fang ve ark. (2006) çalışmasında, SDZ, SMZ, SDD, STZ, SMX, SMT, SMP, SCP ve SIX yumurtalarda demir III potasyum siyanid, zinc ve asetonitril ile ekstraksiyondan sonra saflaştırma SPE ile yapılmıştır. HPLC kolon RP olup, mobil faz olarak metanol ve su (22:78) seçilmiştir. Yumurtalarda geri kazanım %70,38-81,47'dir. 270 nm'de LOD olarak SDZ için 5,9 ng/L, STZ için 9,3 ng/L, SMZ için 4,6 ng/L, SMX için 5,1 ng/L, SMT için 7,6 ng/L, SDD için 4,9 ng/L, SMP için 7,1 ng/L, SCP için 4,1 ng/L, SDZ için 4,5 ng/L ve SIX için 10 ng/L'dir. Bu yöntemde karbon nanotüpler SPE'de dolgu maddesi olarak kullanılmıştır. Bu metodun geri kazanımı, bağıl standart sapması ve LOD değerleri oldukça iyidir.

Yi ve ark. (2006) çalışmasında, yumurtalarda SDZ ve SMZ, HPLC ile belirlenmiştir. Geri kazanım SDZ için % 67,3 ve SMZ için % 65,5'tir. 269 nm'de LOD değeri SDZ için 11,2 ng/g, SMZ için 8,8 ng/g olarak elde edilmiştir.

Grataco's-Cubarsi ve ark. (2006) çalışmasında, SDZ, SMZ ve SMZ dana dokusunda asetonitril ile ekstraksiyonla belirlenmiştir. Synergy MAX-RP (4 mm partikül) kolon ve mobil faz olarak amonyum asetat ve asetonitril kullanılmıştır. Geri kazanım %77,8-%104 aralığındadır. 270 nm'de LOD değerleri SDZ için 3 ppb, SMZ için 5ppb ve SMZ için 6 ppb olarak elde edilmiştir.

Shao ve ark. (2005) çalışmalarında, 17 adet sülfonamid kalıntısını domuz etinde, karaciğerinde ve böbreğinde belirlemek için LC-MS-MS ile metot oluşturmuştur. Mobil faz metanol ve %0,1 formik asit içeren su kullanılmıştır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon ve Sep-Pak silika temizleme prosedürü örnek hazırlamada kullanılmıştır. Metot valide edilmiştir. Geri kazanımların %52-%120 aralığında olduğunu, LOD değerlerinin 0,01-1,0 ng/g aralığında olduğunu tespit etmişlerdir.

Wen ve ark. (2005), sütte SDZ, STZ, SMX, SAM-Na ve SMMX-Na bileşiklerini etanol ile deproteinizasyondan sonra belirlemiştir. Hypersil ODS column (5 mm) metanol 0.02 mol/L, mobil faz olarak Na₂HPO₄ (3:7 v/v, pH 3) kullanılmıştır. Geri kazanım %14,7'den %95,7'ye değişmektedir. 269 nm'de UV dedeksiyonda, 1,7-2,8 ng/mL LOD değerleri elde edilmiştir. SPME-HPLC sülfonamidlerin analizinde kullanılmıştır.

Yang ve ark. (2005)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, SDZ, SMZ, SM, SMMX, SDM ve SMX sütte mikrodializ yöntemini kullanarak HPLC ile belirlenmiştir. Eclipse XDS-C8 analitik kolon (5 µm) ve 25:75 asetonitril ve fosfat tamponu mobil faz olarak kullanılmıştır. Geri kazanım %97,8'den %100,4'e değişmektedir. 260 nm'de LOD 0,08 µg/L'den 0,86 µg/L aralığında elde edilmiştir.

Bir çalışmada (Kishida ve Furusawa 2005), SMM, SDM ve onların N₄ hidroksi-asetil metabolitleri tavuk plazmasında, kasta, karaciğerde, yumurtalarda etanol ile ekstraksiyondan sonra belirlenmiştir. Analizler Mightysil RP-4 GP kolonda mobil faz olarak etanol %1 asetik asitli suda kullanılmıştır.

Li ve ark. (2005)'nin çalışmasında tavuk etinde, 10 adet sülfonamid asetonitril ve kloroform (10:1) ile ekstrakte edilmiştir. Hypersil BDS C-18 kolon ile asetonitril ve 30 mmol/L NaH₂PO₄ (pH 5) lineer akışla kullanılmıştır. Geri kazanım > %50 görülmüştür. LOD değeri 20-40 µg/kg elde edilmiştir.

Wu ve ark. (2005) çalışmasında, SDZ, STZ, SMP, SMX, SDM ve SQX, tavuk karaciğerinde etil asetat ile SPE ile ekstraksiyonundan sonra belirlenmiştir. NH₂ kolonla saflaştırılmıştır. Analizler Inertsil ODS-3 C18 kolonda gerçekleşmiştir. Mobil faz olarak metanol/asetonitril (1:1) ve su/asetik asit (90/2) seçilmiştir. Geri kazanımlar %69,6'dan büyüktür. Fotodiod ışın LOD değeri 8-12 µg/kg'dır.

Clark ve ark. (2005), süt ve yumuşak peynir çeşitlerinde sulfamerazin, sülfatiazol ve sulfadimetoksinin LC-MS/MS ile kalitatif belirleme metodunu geliştirmişlerdir. Örnekleri sülfonamidlerin ekstraksiyonu için fosfat tamponuyla seyreltmışlerdir. Daha sonra ön işlem olarak SPE metodunu uygulamışlardır. SPE kartuşuna absorbe olan sülfonamidler metanol ile desorbe edilmiştir. Metot kalitatif olmasına rağmen geri kazanım değerleri %69-%132 aralığında elde edilmiştir.

Soto-Chinchilla ve ark. (2005), SP, SDZ, SMZ, SCP, SDZ, SMX ve SDM bileşiklerini sütte AOAC'nin yöntemine göre kloroform ve aseton ile ekstraksiyondan sonra belirlemiştir. Analizler C18, 5µm kolonda yapılmıştır. Mobil faz ACN:THF (65:22:13) izokratik olarak dağıtılmıştır. Geri kazanım % 41,47-67,09'dur. LOD değerleri SP için 6,2 µg/L, SDZ 6,9 µg/L, SMZ 7,1 µg/L, SCP 13,2 µg/L, SDZ 13,6 µg/L, SMX 10,4 µg/L ve SDMX 9,5 µg/L'tir.

Gentili ve ark. (2004), çiğ ette ve bebek mamalarında 13 adet sülfonamid bileşiğini hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) ile ekstrakte etmiş ve analizlerini LC-MS-MS cihazı ile yapmıştır. Çiğ ette ve bebek mamasındaki geri kazanımlar %70-%101 aralığındadır. Gün içi kesinliğin <%8,5 olduğu, algılama limitinin <2,6 ppb olduğu görülmüştür.

Pecorelli ve ark. (2004) çalışmasında, SDZ, STZ, SP, SMZ, SMZ, SMMX, SCP, SMX, SQX ve SDM kasta etil asetat ve n-hekzan ile ekstraksiyondan sonra belirlenmiştir. C8, 5µm analitik kolon ve mobil faz kullanılmıştır. Geri kazanım oranları %72-%86 elde edilmiştir. 270 nm'de fotodiod ışın dedektörü, 0,03-0,07 µg/mL LOD değerleri elde edilmiştir.

Msagati ve Nindi (2004), SGN, SAM, SMX, SMZ, SMT, SSZ, 5-SMZ, SMZ, SMP, SMMX, SDMX, SP, SBA, STZ, SDZ ve SQX bileşiklerini süt, sığır ve böbrek dokularında ekstraksiyondan sonra LC-MS-MS ile belirlemiştir. Ekstraksiyon 0,1 M asetik asit suda ve etil asetat ile yapılmıştır. Saflaştırma ve zenginleştirme SLM ile gerçekleştirilmiştir. C18 Clipous Higgins, 5 mm kolon kullanılmıştır. Geri kazanım sütte % 34-77, karaciğerde % 42-88, böbrekte % 44-90'dır. Elektrosprey iyon yakalama kütle spektrometresi ile LOD değerleri 1,8'den 24.3 ppb'ye elde edilmiştir.

Hela ve ark. (2003), çalışmasında sığır, domuz ve tavuk kaslarında SDZ, STZ, SP, SMZ, SMT, SDD, SIX, SMX, STR, SCZ, SNZ ve DDS bulunmuştur. Asetonitril ve n-hekzan ile ekstraksiyondan sonra temizleme, SPE ile gerçekleşmiştir. Phenomenex Luna C18 (5 mm) yükselen akışla kullanılmıştır. Sülfonamidler, amonyak solüsyonu / asetonitril (1:19 v/v) ile süzölmüştür. Geri kazanım oranları % 13,6-%60,9 aralığında elde edilmiştir. 260 nm'de fotodiod ışın dedeksiyonu (dapsone için 294 nm) tüm analitler için 1 ppb LOD değeri elde edilmiştir.

Furusawa (2003) çalışmasında, yumurtalarda, SMX, SDMX ve SQX bileşikleri, 0,4 mL %10 suda perklorik asit çözeltisi ile homojenizasyondan sonra belirlenmiştir. Analizler Mightysil RP-4 GP (5µm) kolonda 0,18 mol/L sitrik asit mobil fazıyla gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım % 80,9'dan % 87,6 'ya değişir. 267 nm'de fotodiod ışın dedektörü 0,02 ve 0,04 µg/g LOD değerleri elde edilmiştir. RSD değerleri % 3,4- % 5,8'dir.

Kishida ve Furusawa (2003) çalışmalarında, tavuk, sığır ve domuz dokularında SDZ, SDD, SMM, SMX, SDM ve SQX 2 g Alümina N-S ile MSPD ile karıştırıldıktan sonra belirlenmiştir. Süzme işlemi % 70 sulu etanol ile olmuştur. Ayırma Mightysil RP-4 GP kolon, mobil faz asetik asit solüsyonu (pH 2,7 suda), etanol (75:25 v/v) kullanılmıştır. % 92,5'dan % 98,9'a değişen geri kazanım değerleri elde edilmiştir. 267 nm'de 0,006'dan 0,032 ppm'ye LOQ değerleri elde edilmiştir.

Rhijn ve ark. (2002), sütte 5 adet sülfonamid grubunu LC-MS/MS ile belirleyerek metodun geçerli kılınmasını gerçekleştirmişlerdir. Örnek hazırlama basamağı olarak ultrafiltrasyon kullanılmıştır. Veteriner kullanım için birçok sülfonamid tanımlanmasına rağmen en önemlileri sulfadiazin, sulfadimidin, sulfamethoksazol, sulfadoksin ve sulfadimethoksin olduğu belirtilmiştir. İzotop seyreltme metodu olarak sadece d₇-sulfadimidin

izotop olarak kullanılmıştır. Geliştirilen metot sterilize, pastörize, UHT sütlerle uygulanmıştır. Precision (kesinlik) değerleri RSD'ler %1'den %8'e değişmiştir. Gün içi tekrar üretilebilirlik 2,7'den %12'ye kabul edilebilir sınırlar içindedir. Valide ettikleri metodun geri kazanım aralığının % 69-% 87 olduğu ifade edilmiştir.

Verzegnassi ve Stadler (2002), balda LC-ESI-MS/MS ile 10 adet sülfonamid bileşiğinin tayinini çalışmışlardır. İzotop olarak $^{13}\text{C}_6$ -sülfabrometazin bileşiğini kullanmışlardır.

Ho Kim ve ark. (2002)'nin çalışmasında LC-APCI-MS ette 5 tane sülfonamid belirlenmesi için kullanılmıştır. İç standart olarak sulfapiridin ve izotop sulfametazin ($^{13}\text{C}_6$ SMZ) kullanılmıştır. 75 ng/g eklenen sulfametazin için % 1,8 RSD kesinlik görülmüştür.

Perez ve ark. (2002), sütte 6 adet sülfonamid bileşiğini HPLC-UV cihazı ile analiz etmişlerdir. Ön işlem olarak sıvı- sıvı ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Geri kazanımlar değerleri %65-%95 aralığındadır.

Roudaut ve Garnier (2002) çalışmasında, yumurtalarda, SDD ve SDM bileşikleri, 1M hidroklorik asit ve tetrahidrofuran ile deproteinizasyondan sonra belirlenmiştir. Yumurta beyazından ekstraksiyon etil asetat ile gerçekleşmiştir. Yumurta örnekleri metanol ve izooktan ile sıvı-sıvı ekstraksiyonla iki kere saflaştırılmıştır. HPLC analizleri 4 μm Nova-Pak C18 kolon ile asetonitril ve 0.01 M amonyum asetat pH 6, SDD için 12:88 v/v, SDM için 14:86 v/v mobil faz kullanılmıştır. Yumurta beyazından geri kazanım SDD % 87, SDMX % 77,4 ve yumurta sarısı için SDD % 64,6 ve SDMX % 67,4'tür.

Fuh ve ark. (2001)'nin çalışmasında, ette 9 adet sülfonamid (sülfadiazin, sülfapridin, sülfamerazin, sülfametazin, sülfamonometoksin, sülfisoksazol, sülfadimetoksin, sülfakuinoksalin ve sülfafenazol) bileşiği sıvı ekstraksiyonuyla izole edilmiş, LC-ES-MS ile seçici iyon modunda belirlenmiştir. Fenil $^{13}\text{C}_6$ sülfametazin iç standart olarak kullanılmıştır. 0,1-10 $\mu\text{g/mL}$ aralığında her bir bileşik için lineerlik görülmüştür. LOD değeri 10 $\mu\text{g/kg}$ 'in altındadır.

Furusawa (2001), yaptığı çalışmada, SMZ, sığır, tavuk ve kuzunun yenilebilir dokularında belirlenmiştir. Dokular % 30 etanol suda ile homojenize edildikten sonra

Ultrafree (R)-MC/PL santrifüjlü ultrafiltrasyon ünitesiyle filtre edilmiştir. Ters faz C4 kolon %15 etanol suda ile kullanılmıştır. Ortalama geri kazanım değeri % 80 elde edilmiştir. Fotodiod ışın dedektörü 0,057-0,060 mg/kg LOQ değerleri elde edilmiştir.

Kishida ve Furusawa (2001a) çalışmasında, tavuk dokusunda SDZ, SDD, SMMX, SMX, SDM ve SQX MSPD Alumina N-S ile belirlenmiştir. Sülfonamidler, 10 mL %70 su-etanol çözeltisi ile süzölmüştür. LiChrospher 100 RP-8, 5 mm, analitik kolon, mobil faz olarak % 1 asetik asit solüsyonu (pH 3 suda)-asetonitril-DMF (78:22:5) oranında kullanılmıştır. Geri kazanım değeri %93-%101,6 arasında bulunmuştur. Fotodiod ışın dedektörü 267 nm’de 0,003’den 0,016 ppm’e değişen LOD değerleri elde edilmiştir.

Kishida ve Furusawa (2001b) çalışmasında, süt örneklerinde SDZ, SMZ, SDD, SMMX, SMX, SDM ve SQX bileşikleri mikrosantrifüjle belirlenmiştir. Mightysil RP-4 GP (5 µm) analitik kolon ve % 25 sulu etanol çözeltisi mobil faz olarak kullanılmıştır. Geri kazanım değerleri, %85,3-%92,2 aralığındadır. 269 nm’de 0,005’den 0,02’ye µg/mL yakalama limitleri elde edilmiştir.

Furusawa (2000) çalışmasında, sütte, sülfametazin ve sülfadimetoksin %50 etanol solüsyonuyla deproteinizasyona uğratılmış ve ultrasonik ve ultrasantrifüjden sonra süpernatant HPLC’ye enjekte edilmiştir. Mightysil RP-18 GP Aqua kolon, mobil faz %25 etanol çözeltisi kullanılmıştır. Geri kazanım değeri %83’ten büyük bulunmuştur. Fotodiod ışın dedektörü 266 nm’de SMZ için LOD değeri 3 ng/mL, SDM için LOD değeri 5 ng/mL elde edilmiştir.

Stoev ve Michailova (2000)’nın yaptıkları çalışmada, ette, karışık ette ve böbrekte, SNM, SDZ, SMZ, SDD, SMP, SCP, SDZ, SMX, SDM ve SQX aseton ve metilen klorid ile sıvı-sıvı ekstraksiyonla belirlenmiştir. Geri kazanımlar % 60-72 arasında olmuştur. 405 nm’de floresans dedektörle 0,05 mg/kg LOD değeri elde edilmiştir.

Furusawa (2000), SDM ve OH-SDM (hidroksi metabolitler) bileşikleri, tavuk karaciğer ve kas dokusunda incelemiştir. Tavuk dokuları % 90 asetonitril solüsyonu ve hekzan ile muamele ettirilmiştir. Analizler MightysilH RP-4 GP (5 µm) kolon ve izokratik mobil faz olarak % 4 asetik asit solüsyonu-asetonitril- N,N dimetilformamid (83:12:5)

kullanılmıştır. Geri kazanım % 81,3-%88 arasında elde edilmiştir. 273 nm’de 0,05 ppm LOD elde edilmiştir.

Ito ve ark. (2000), hayvan karaciğeri ve böbreğinden, sülfametoksazol, sülfadiazin, sülfamerazin, sülfisoksazol, sülfadimidin, sülfadimetoksin, sülfametoksipridazin, sülfisoksazol, sulfamonometoksin ve sülfakuinoksalini etil asetat ile ekstraksiyondan sonra elde ettiği ekstraktları, daha sonra SPE Bond Elut PAS anyon kartuş ile saflaştırmıştır. Analitlerin elüsyonu, % 20 asetonitril 0.05 M amonyum format ile olmuştur. Eluatların analizi için LC-kolon ODS (5µm), metanol-asetonitril-0.05 M formik asit (10:15:75) mobil fazı kullanılmıştır. Geri kazanım % 81’den % 98,2’ye değişmektedir. Bu metot ile bağıl standart sapma değeri (< 7%) ve dedeksiyon limiti ise 0,03 mg/g’dır.

Combs ve ark. (1999)’nın çalışmasında, sülfadiazin, sülfakloropiridazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfapyridine, sülfametazin, sülfakuinoksalin ve sülfadimetoksin tavuk karaciğer örneklerinde süperkritik sıvı ekstraksiyonu ile 50:50 su metanol ile ekstraksiyon kabında toplanmıştır. Özüt, HPLC APCI-MS ile incelenmiştir. 8 adet sülfonamid tam tarama ve seçici iyon modunda çok düşük LOQ değerleri vermiştir. 8 sülfonamidden 3’ü için seçici iyon modu 50 pg LOQ değeri vermiştir. Metot tam tarama ve tek iyon modunda iyi lineerlik ve tekrar edilebilirlik göstermiştir.

Kostadinovic ve ark. (1999)’nın çalışmasında, sülfakloropiridazin tavuk etinde ve karaciğerinde belirlenmiştir. Ekstraksiyon 60 mL diklorometan/metanol/asetik asit karışımıyla gerçekleştirilmiş, ekstraktlar C-8 HL 5 mm kolonda % 60 asetonitril suda pH’ı 9,5’a amonyak NH₃ ile ayarlanmış mobil faz ile analiz edilmiştir. UV dedeksiyonu 254 nm’de olmuştur. Dedeksiyon limiti, 0,02 µg/g olup, geri kazanım tavuk etinde % 79,2±0,6’dan % 86,7±0,2’ye değişmektedir. Geri kazanım tavuk karaciğerinde ise %81,7±0,8’den % 87,3±0,7’ye değişmektedir.

Shaikh ve ark. (1999)’nın çalışmasında, yumurta albumini ve yumurta sarısında sülfametazin ve onun metabolitleri N₄-asetil-SMZ, desamino-SMZ, glukozil-SMZ ve glukuronil-SMZ’yi belirlemek için aşamalı HPLC metodu geliştirilmiştir. Albumin, HPLC tarafından direkt olarak okutulmuştur. Yumurta sarısı ise hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraktların analizi için LiChrosorb RP 5 mm kolon ve 0,01 M fosfat tamponu ve asetonitril gradient mobil faz kullanılmıştır. Yumurta albümininde geri kazanım %101, yumurta sarısında %79 ve yumurta albümininde N₄-asetil-SMZ için %88, yumurta sarısında % 91;

desamino-SMZ için gerikazanım yumurta albümininde % 84 ve yumurta sarısında % 63'tür. UV dedeksiyonu, 268 nm'de olmuştur. Kısa analiz zamanı, yüksek kesinlik (geri kazanım testinde RSD < % 3,7), çevreye zararsız (az çözücü kullanılması nedeniyle) bir prosedür yapılmıştır. Bu prosedür, SMZ ve SDM'nin sütte rutin belirlenmesinde uygundur.

Vin ve ark. (1996), sütte, alabalık dokusunda ve yumurtada sülfadiazin, sülfapridin, sülfadoksin, sülfaguanidin ve sülfanilamidi belirlemiştir. 3 g süt örneği 0,5 mL %30 TCA ile özütlenmiştir. Alabalık dokusu ve yumurta örneklerinin 3 g'ı 4 mL %3'lük trikloroasetik asit (TCA) ile özütlenmiştir. Ekstraksiyondan sonra örneklerin analizi Spherisorb ODS-2 (5 µm) analitik kolonda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak asetonitril-su (3:97) karışımı kullanılmıştır. Ortalama geri kazanımın %95 olduğu belirlenmiştir. 302 ve 412 nm uyarma ve emisyon dalga boylarında floresans dedektör, 0,011-0,019 mg/mL LOD değerini vermiştir.

Laloux ve ark. (1996)'nın çalışmasında, yağsız sütte sülfadiazin, sülfamerazin, sülfametazin, sülfameter, sülfametoksazol ve sülfadimetoksin 2N HCl asit ile muamele edilip, proteinlerin denatürasyonu sonrası belirlenmiştir. Ortama, fluorescamine ve sodyum asetat türevlendirme için eklenmiştir. C₁₈ kolon %2'lik asetonitril/asetik asit (40:60) mobil fazı ile kullanılmıştır. Geri kazanımın %90'dan fazla olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, spektrofotometre dedektör 405 nm uyarma ve 495 nm emisyon dalga boyunda kullanılmıştır.

Barbieri ve ark. (1995), 15 sülfonamid grubunu et ve et ürünlerinde asetonitril/metilenklorid ile sıvı-sıvı ekstraksiyonundan sonra belirlemiştir. Analitlerin LOD değerleri fluorimetrik dedektörde 0,002 ile 0,010 mg/kg olarak bulunmuştur.

Furusawa ve Mukai (1994) çalışmalarında, biftekte, tavukta, domuzda ve yumurtalarda sülfamonometoksin, sülfadimetoksin ve N₄-asetil metabolitlerini belirlemiştir. 5 g örnekler 25 mL, %90 v/v asetonitril ve 20 mL n-hekzan çözeltisi ile analitler ekstrakte edilmiştir. LiChrosorb RP-18 (7 mm) kolon, asetonitril fosfat tamponu kullanılmıştır. Geri kazanımlar %85,7-%95,8 arasında olup, LOD değeri. 270 nm'de UV dedeksiyonu 0,001 ppm olarak bulunmuştur.

Parks ve Maxwell (1994), tavuk dokusunda sülfametazin, sülfadimetoksin ve sülfakuinoksalin bileşiklerini katı faz ekstraksiyonu ön işlemine tabi tutmuş ve geri kazanımı %77-95 aralığında, LOD değerini 100 ppb'den büyük olarak bulmuştur.

Tamura ve ark. (1994), tavuk ve yumurta, sülfametoksidiazini, sülfadimidini, sülfamonometoksini, sülfadimetoksini ve sülfakuinoksalini tayin için katı faz ekstraksiyonu metodunu kullanmıştır. Bunun için 0,5 g örnek, 0,7 g silika ve 1,5 mL asetonitril ile karıştırılmıştır. Karışım kurutulmuş ve hekzan ile yıkanmış, metanol veya THF ile süzölmüş, süzöntü HPLC'de analiz edilmiştir. Geri kazanımların tavukta; %78,1-%93,1, yumurtada; %74,6-%86,2 olduğu görölmüştür. LOD değerleri ise 0,01-0,04 ppm aralığında çıkmıştır.

Agarwal (1993) yaptığı bir çalışmada, kreması alınmış sütte sülfadiazin, sülfatiazol, sülfapiridin, sülfamerazin, sülfametizol, sülfametazin, sülfakloropridazin, sülfadimetoksin ve sülfakuinoksalin varlığını ve miktarını araştırmıştır. Süt örneği, potasyum sorbat tampon (pH 4,4) ile seyreltilip, katı faz ekstraksiyonu uygulanmıştır. Analitler, LC-18-DB analitik kolonda metanol ve amonyum asetat mobil fazlarıyla ayrılmıştır. Geri kazanım %50'den büyük olup, LOD değeri 10 ppb olarak bulunmuştur.

Hoffmeister ve ark. (1991), sütte sülfadimidini katı faz ekstraksiyonuyla belirlemiştir. Geri kazanım % 74-130 arasındadır. Analiz HPLC, 270 nm'de UV ile yapılmıştır.

Ueno ve ark. (1991)'nın yaptığı çalışmada, balık dokusunda sülfamonometoksin ve sülfadimetoksin analizini gerçekleştirmiştir. Katı faz ekstraksiyonu olarak Sep-pak Alumina kartuşla ön işlem yapılmıştır. Çalışmada, % 80 üzerinde geri kazanım değeri ve 0,1 ppm LOD değeri elde edilmiştir. Analiz, UV 265 nm' de gerçekleştirilmiştir.

Diserens ve ark. (1991)'nin çalışmasında, 11 adet sülfonamid sütte, ette ve yumurtalarda belirlenmiştir. Diklorometan ile ekstraksiyondan sonra yağ silika kartuştan uzaklaştırılmıştır. Sülfonamidler, tampon çözelti ile süzölüp, süzöntü etilasetat ile ekstrakte edilmiştir. C18 kolon diod ışınıyla veya 266 nm UV dedektör ile LOD değeri 2 µg/kg bulunmuştur.

Agarwal (1990), sütte sülfametazin belirleme çalışmasında, süte 50 mL kloroform eklendikten sonra SPE metodu uygulamıştır. Desopsiyon, %50'lik sulu metanol çözeltisi ile

yapılmıştır. Toplam süzöntü HPLC'ye enjekte edilmiştir. A Supelco LC-M-DB, 5µm, analitik kolon, %70 amonyum asetat solüsyonu (pH 4,7) mobil faz kullanılmıştır. Analiz sonrası geri kazanım %86'dır. Bu metod sütte SMZ kalıntılarının UV 265 nm 'de analizinde 5 ppb seviyesine kadar uygulanabilmektedir.

2.15.Kimyasal Analizlerde Kalite Kontrol

Dünya genelinde binlerce laboratuvarda milyonlarca deneyler, ölçümler ve incelemeler yapılmaktadır. Bunun altında yatan sayılamayacak kadar çok sebep vardır. Örneğin, ticari amaç için ürünlerin değerlendirilmesi, sağlığın korunmasına destek sağlanması, içme suyunun, gıdanın ve yemin kalitesinin kontrolü, alaşımların elemental bileşimlerinin hava araçlarının imalatında kullanmaya uygun olup olmadığının teyidine yönelik analizlerin yapılması, cezai soruşturmalardaki vücut sıvısının adli analizleri örnek olarak verilebilir. Toplumun her kesimi genel anlamda, analitik çalışmalarla bir şekilde desteklenmektedir.

Bu ölçümlerin hizmet maliyetleri yüksektir ve sonuçlara dayanarak verilen kararlardan ek maliyetler de ortaya çıkabilir. Örneğin, gıdanın tüketime uygun olmadığını ortaya koyan testler tazminat taleplerine neden olabilir; yasak olan ilaçların kullanıldığını teyit eden testler para cezası, hapis cezası ve hatta bazı ülkelerde idam cezası doğurabilir. Açıkçası, ölçümün doğru yapılması ve sonucun doğru olduğunun ortaya koyulması çok önemlidir.

Bu tez çalışmasında metottan elde edilen sonuçların kalitesini ifade edecek, gerçeklik, kesinlik ve belirsizlik olarak üç adet birbiri ile ilgili performans özellikleri kullanılmıştır.

Birçok düzenlemeler, kimyasal ölçümlerin kalitesini ve kabul edilebilirliği sağlamak için yapılmaktadır. Bu nedenle, en hassas standartları elinde bulunduran ulusal metroloji enstitüleri, birkaç yıllık aralıklarla uluslararası karşılaştırmaya giderler. Gerçekleştirilen karşılaştırmaların başarılı sonuçları Karşılıklı Tanınma Anlaşmaları için teknik dayanak oluşturmaktadır. Ulusal Metroloji Enstitüleri arasında Karşılıklı Tanınma Anlaşması 14 Ekim 1999 tarihinde imzalanmıştır. Ülkemizin TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü, Karşılıklı Tanınma Anlaşması'na başlangıç tarihinden itibaren taraf olan enstitüler arasında yer almaktadır. İmzalanan Karşılıklı Tanınma Anlaşması (Mutual Recognition Agreement, MRA) gereğince, bir ölçüm sonucunun bir kez ölçüldüğünde her yerde geçerli olması gerekliliği üzerinde fikir birliğine varılmıştır. Bu fikir birliği ciddi bir yükümlülük getirmiştir. Bu ölçüm sonucunun kalitesinin sağlanmasıdır. Ölçüm sonuçlarının kalitesinin sağlanması için

yapılması kesinlikle gerekli üç işlem vardır. Bunlar metodu geçerli kılma, ölçüm belirsizliği hesabı ve izlenebilirliğidir (Anonim 2012a).

Bununla birlikte bilim adamları sıklıkla hata çeşitleri (rastgele, sistematik ve ağır hata), doğruluk (gerçeklik ve kesinlik) ve belirsizlik gibi başka kavramları da kullanmaktadırlar. Bu kavramların bir kısmı kalitatif bir kısmı da kantitatif anlama sahiptir. Yıllar içerisinde terimler ve tarifler değişikliğe uğramıştır ve yeni terimler oluşmuştur. Ayrıca, değişik sektörler değişik terimleri kullanmayı benimseyebilmekte ve bütün bunlar büyük bir karışıklık yaratmaktadır (Anonim 2011).

2.16. Metot Geçerli Kılma (Validasyon)

Beş farklı uluslararası dokümandan alınan geçerli kılma tanımları (Anonim 2014) aşağıda sunulmuştur;

- Özel amaçlı bir kullanım veya uygulama için şartların sağlandığının açık kanıtlar elde ederek teyit edilmesi (ISO 9000) (ISO 9000:2005, Quality management systems–fundamentals and vocabulary, ISO Geneva.),
- Özel amaçlı bir kullanım için gerekli şartların yerine getirildiğinin inceleme sonucunda teyit edilmesi ve objektif bir delilin elde edilmesi (ISO/IEC 17025) (ISO/IEC 17025:2005, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva.),
- Doğrulama, belirlenmiş şartların amacına uygun bir kullanım için yeterli olmasıdır (VIM) (International vocabulary of metrology–basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, www.bipm.org. A previous version is published as ISO/IEC Guide 99:2007, ISO Geneva.),
- Bir sistem veya yöntemin beklendiği şekilde çalıştığını kanıtlama eylemi veya sürecidir (Clinically and Laboratory Standards Institute)
- Bir metodun, sürecin, cihazın veya sistemin beklendiği gibi çalıştığını ve istenen sonuçları verdiğini kanıtlama işidir (WHO-BS/95.1793).

Validasyon bir metodun performansını belirlemek için yapılan test ve ölçme işlemidir. Yapılan test ve ölçme işlemlerinin yazılı kayıtlarla kanıtlanmasıdır. Cihaz, metod, sistem performansının belirlenen koşullara uygun olduğunu göstermektedir.

Kimyasal analizlerde analiz metodunun uygulama performansı değişik faktörlere bağlıdır. Laboratuvar koşulları, cihaz, kullanılan kimyasallar, standartlar, operatör, matriks etkisi bu faktörler arasındadır. Metodu geçerli kılmadan amaç; metodun performansının belirlenen analiz ihtiyacına uygun olduğunu belirlemek ve göstermek içindir.

Bir laboratuvarın kalite yönetim sistemi standartı olan ISO 9001'in şartlarına uygunluğu, laboratuvarın teknik olarak geçerli veriler ve sonuçlar sunma konusundaki yeterliliğini göstermemektedir. Deney ve kalibrasyon sonuçlarının ülkeler arasında kabul edilmesi, ancak laboratuvarların ISO 17025 standartına uygunluğu ve bu standardı kullanarak başka ülkelerdeki eşdeğer kuruluşlarla karşılıklı tanıma sözleşmeleri yapan akreditasyon kuruluşları tarafından akredite edilmesiyle mümkün olmaktadır.

ISO 17025 standartı, numune alma dâhil, deney ve/veya kalibrasyon hizmeti veren bir laboratuvarın yeterliliğinin tanınması için sağlaması gereken genel şartları belirtir. Standart, standart dışı ve laboratuvar tarafından geliştirilen metotlarla yapılan deney ve kalibrasyon hizmetlerini kapsamaktadır.

Bu laboratuvarlar; standard olmayan metotları, laboratuvarda tasarlanmış/geliştirilmiş metotları, amaçlanan kapsamı dışında kullanılan standard metotları ve ilâvelerle takviye edilmiş veya değiştirilmiş standard metotları, amaçlanan kullanıma uygun olduklarını teyit etmek için geçerli kılmalıdır. Ayrıca geçerli kılma iki ayrı metotun kullanımıyla elde edilen sonuçların yakınlığının ortaya konulması için de gereklidir, örneğin yeni geliştirilmiş bir metot ile var olan standart/yasal metot. (Anonim 2005b).

Geçerli kılma, yapılacak uygulama veya uygulama alanının ihtiyaçlarını da karşılayacak kapsamda olmalıdır. Laboratuvar, elde edilen sonuçları ve geçerli kılma için kullanılan prosedürü ve metodun amaçlanan kullanıma uygun olup olmadığını belirten bir ifadeyi kaydetmelidir (Anonim 2014).

2.17. Metot Geçerli Kılma Araçları

2.17.1. Körler

Değişik körler kullanılarak ölçülen sinyalin ne kadarının başka nedenlerden ne kadarının analitten geldiği anlaşılır. Farklı çeşitte körler mevcuttur (Anonim 2014).

2.17.1.1. Reaktif körü

Analitik işlem sırasında kullanılan çözücüler (ekstraksiyon ve çözünme için kullanılan çözücüler dahil) ölçülen sinyale katkısının olup olmadığının değerlendirilmesi için analiz edilirler (Anonim 2014).

2.17.1.2. Numune körü

İçinde analiti içermeyen numunelerdir. Örneğin antibiyotik kalıntısı içermeyen et numuneleri. Numune körü bulmak zordur fakat analiz sırasında ortaya çıkabilecek girişimlere gerçekçi bir yaklaşım için gereklidir (Anonim 2014).

2.17.2. Rutin test numuneleri

Test malzemelerinin analit miktarları bilinirse ölçüm sapmasını değerlendirmek için kullanılabilirler. Analitin miktarının doğru bir şekilde değerlendirilmesi referans metot kullanılarak yapılabilir, ancak böyle metotlar her zaman mevcut değildir (Anonim 2014).

2.17.3. Kirletilmiş malzemeler/çözeltiler

Hedef analitlerin kasıtlı olarak eklendiği malzemeler veya çözeltilerdir (Anonim 2014).

2.17.4. İçinde doğal olarak analit bulunan numuneler

Hedef analit bu tarz malzemelerin doğasında yabancı bir madde gibi bulunabilir, ancak bu maddeler numune alma işleminden önceki herhangi bir noktada yığın halindeki numuneye eklenmektedirler. Böylece, analit matrikse kirletme yoluyla eklenmesinden daha sıkı şekilde bağlanmış olur. Örnek olarak allerjenlerin tespiti sırasında pişirilmeden önce bisküvi hamuruna eklenen yumurta beyazı tozu (bilinen protein içeriği) verilebilir (Anonim 2014).

2.18. Ölçüm Standartları

Ölçüm standartları geleneksel olarak tek maddelerin çözeltileri olarak düşünülmektedir. Fakat pratikte metrolojik referans olarak hizmet edebilecek kapsamda

karakterize edilen bir parametreyi veya özelliği içeren herhangi bir şey olabilirler (Anonim 2012b).

2.18.1.Sertifikalı referans malzeme

Referans malzeme (RM), nominal özelliklerin incelenmesinde veya bir ölçüm sürecinde istenilen, kullanıma uygun olduğu tespit edilmiş, belirli özelliklerle yeterince homojenlik ve kararlılık sağlayan bir malzeme şeklinde tanımlanmaktadır. Sertifikalı referans malzeme (CRM) ise yetkili merci tarafından belgelendirilmiş referans malzemedir. Bu belgedeki malzemenin değeri geçerli kılınmış bir metotla belirlenerek belirsizlik değeri ve izlenebilirliğiyle birlikte verilmektedir (Sanchez ve ark. 2013). RM referans olarak kullanılacak herhangi bir madde olabilir ve bilinen saflıktaki laboratuvar reaktiflerini, endüstriyel kimyasalları veya diğer maddeleri içerebilir. Hedef analitin özelliği kararlı ve homojen olmak zorundadır ancak yüksek derecede tanımlanmasına, metrolojik izlenebilirliğine, CRMs ile ilgili belirsizlik ve dokümantasyonuna gerek yoktur.

2.18.2.Doğrusallık ve çalışma aralığı

Ölçüm aralığı metodun uygulama aralığının belirlenmesi için yapılır. Doğrusal aralık kalibrasyon grafiğinin doğrusal olduğu derişim aralığı veya kalibrasyon eğrisinde ölçülen analitin miktarı ve dedektör yanıtının doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır. Metot geçerli kılma çalışmalarında analitin konsantrasyonları bu aralık dikkate alınarak planlanır. Standart eğri, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örnek ve kör örnek içine eklenmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile yapılır. Her bir ölçüm noktasında (en az 5 nokta), en az üç ölçüm yapılır. Elde edilen yanıtla çizilen eğride üst ve alt sınırlar belirlenmelidir. Kalibrasyon eğrisinin en alt noktası uygulanan analiz metodunun tayin limitinin üstünde bir değerde olmalıdır. Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve “linear regresyon formülü” ile “korelasyon katsayısı” belirtilir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı $>0,99$ olmalıdır (Anonim 2016).

Çalışma aralığı kabul edilebilir belirsizlik değeriyle metodun sonuçlar sağladığı aralıktır. Çalışma aralığının en düşük noktası LOQ ile sınırlandırılmıştır. Çalışma aralığının en yüksek noktası analitik hassasiyette önemli anormalliklerin gözlemlendiği konsantrasyondur (Anonim 2014). Metodun çalışma aralığı metodun kapsamında verilen her bir matriks için elde edilir. Bunun nedeni ise girişim yapan maddelerin linear olmayan

cevabın verilmesine neden olabilmesi ve metodun analiti ekstrakte edebilme/geri alma kapasitesinin numune matriksine göre değişebilmesidir (Anonim 2014).

2.18.3.Doğruluk

Doğruluk elde edilen değer ile gerçek değer uyum derecesidir. Doğruluk parametresi gerçeklik ve kesinlik olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Gerçeklik, ölçülen değerlerin ortalamasının gerçek değere yakınlığını gösterir. Ölçüm gerçekliği bir büyüklük değildir ve bu nedenle sayısal olarak ifade edilemez. Kesinlik, ölçülen büyüklük için alınan bağımsız ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Nicel bir değerdir ve sayısal olarak ifade edilir. Kesinlik doğruluğun gerçeklik dışındaki diğer bir bileşeni olup rastgele hataların dağılımını gösterir. Standart sapma (s) veya bağıl standart sapma (%RSD) ile ifade edilir (Binici, 2014). Kesinlik ölçümünü 4 faktör etkilemektedir. Bunlar zaman, kalibrasyon, operatör ve ekipman ölçümlerde olup bunların değişkenliğine göre kesinlik de değişmektedir. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik olarak iki genel kesinlik ölçümü bulunmaktadır.

Doğruluğu belirlemek için kullanılan stratejiler (Araujo 2009) şu şekildedir;

- Referans materyalde analit ölçülür ve sonuç sertifikalı değer ile karşılaştırılır.
- Kör matriks örneklerine bilinen konsantrasyonlarda analit ilave edilerek ölçüm yapılır ve geri kazanım belirlenir.
- Validasyonu yapılan metot sonuçları referans metot ile karşılaştırılır.
- Örnekteki analit konsantrasyonu standart ekleme tekniği ile belirlenir.

Raporlanan diğer bir strateji validasyonu yapılan belirli bir metodun yeterlilik testlerinde üzerinde fikir birliğine varılan değer ile sonucun karşılaştırılmasıdır (Boque 2002).

2.18.4.Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik bazen “çalışmalar arası”, “gruplar arası”, “deneyler arası” olarak ifade edilmektedir. Eurochem / CITAC (Anonim 2012b) göre tekrarlanabilirlik, tek bir analist tarafından aynı cihazla ve kısa zaman aralığında gerçekleştirilen ölçüm sonuçlarının varyasyonunun ölçümü ve sonuçlara ait en düşük varyasyonun elde edilmesidir. ISO 5725-1’e göre tekrarlanabilirlik, aynı metot ile eşdeğer örneklerde aynı laboratuvarında, aynı ekipman ve aynı analist tarafından kısa zaman aralığında elde edilen bağımsız test sonuçları elde edilmesi olarak tanımlanmıştır. Koşulların yakınlığı nedeniyle beklenen kesinlik de küçük olmaktadır.

Tekrar üretilebilirlik koşulları standartta aynı metot ile eşdeğer örneklerde farklı laboratuvarlarda, farklı ekipman ve farklı analist tarafından uzun zaman aralığında elde edilen bağımsız test sonuçlarının elde edilmesi olarak tanımlanmıştır (Anonim 2016).

Tekrar gerçekleştirilebilirlik, laboratuvarlar arası sonuçların varyasyonunun ölçümü ve sonuçlara ait en yüksek varyasyonun elde edilmesidir. Geçerli kılmda tekrar gerçekleştirilebilirlik aynı metot kullanılarak laboratuvarlar arasındaki varyasyonu ifade etmektedir. Tekrar gerçekleştirilebilirlik ayrıca, laboratuvarlar arasında aynı niceliğin ölçümü amacıyla kullanılan değişik metotların gözlenen varyasyonunu da ifade etmektedir (Anonim 2012). “Ölçüm tekrarlanabilirliği” ve “ölçüm tekrar gerçekleştirilebilirliği” kesinliğin elde edilebileceği iki uç ölçümü temsil eder. Standardize edilmiş metotların dokümantasyonu (ör; ISO’dan) uygun olduğunda tekrarlanabilirlik ve tekrar gerçekleştirilebilirlik verilerinin her ikisini de içerecektir.

2.18.5.Algılama sınırı (LOD)

Bir ölçüm metodu ile güvenli bir şekilde algılanabilen en düşük analit derişimidir. Analitin varlığının belirlenebildiği ancak hesaplamaların yapılamadığı miktardır. İfade etmek için bazen LOD kısaltması kullanılır (Binici, 2014). LOD hesaplanırken amaç, genellikle numunede bulunan analitin verilen ölçüm prosedürü ile belirlenen güven aralığındaki en düşük konsantrasyonunun ölçülebildiğinin kanıtlanmasıdır. Algılama sınırının değişik hesaplama yöntemleri vardır;

- Kör örnek ($n \geq 20$) okumalarının standart sapmasının 3 ile çarpılması ile bulunur.
- 3:1’lik sinyal/gürültü oranına tekabül eden konsantrasyondur.

Algılama sınırında analit içeren örnekler kullanarak kalibrasyon eğrisi çizdirilir. Bu eğrinin y eksenini kestiği nokta algılama sınırındadır (Anonim 2012).

2.18.6.Tayin sınırı (LOQ)

Tayin sınırı ise kalibrasyon grafiğinin güvenilir olarak elde edilen en küçük konsantrasyon değeridir ve metottan metoda bileşenden bileşene değişmekle birlikte gözlenebilme sınırından 5-10 katı kadar yüksek olabilir. LOQ kısaltması ile ifade edilir. LOQ, analitin kabul edilebilir metot performansı ile tanımlanabildiği en düşük seviyedir (Anonim 2012b). Algılama sınırının değişik hesaplama yöntemleri (Anonim 2012a) vardır;

- K r  rnek ($n \geq 20$) okumalarının standart sapmasının 10 ile çarpılması ile bulunur.
- 3:1'lik sinyal/gürültü oranına tekabül eden konsantrasyonunun 3 katıdır.

2.18.7.Seçicilik

Metodun bir karışım veya bir matrisin içindeki belirli miktardaki analitin herhangi bir madde ile girişim olmadan algılama ve tayin kabiliyetidir (Anonim 2001).

2.18.8.Sağlamlık

Sağlamlık metodun analiz parametrelerinden kaynaklanan bazı küçük sapmaların ve bunların analiz sonuçları üzerine etkisini inceler. Sağlamlık çalışmasında,  n-araştırma çalışmaları, analiz  naşaması, temizleme ve analiz faktörlerini seçmek gerekmektedir. Bu faktörler; örnek içeriği, kimyasal madde miktarları, proses süresi, sıcaklık, akış hızı gibidir. Metot parametrelerinde rutin işlem sırasında ufak değişikliklerin analiz sonucuna etkisi ne kadar az ise metot o kadar sağlamdır. Sağlamlık, mükemmel uygulama koşullarından uzaklaşıldığı zaman metodun performansının ne kadar etkilendiğinin  l t d r (Anonim 2005a).

2.18.9.Geri kazanım

Kimyasal  l  mde gerçek değerin ölçülmesi uygulanan metoda bağımlı olarak değişim gösterir. Deneysel işlemler esnasında çeşitli nedenlerle analit derişiminde kayıp oluşur. Bu kayıp miktarının oranını ve belirsizliğini hesaplamak gerekir. Kayıp miktarının gerçek miktardan farkı metodun geri kazanımı olarak ifade edilir (Ellison ve ark. 2003).

2.18.10. l  m belirsizliği

Belirsizlik  l  m sonuçları ile ilgili aralıktır ve ölçülen miktar ile alakalı makul olarak kabul edilebilir değerlerin dağılımını ifade eder. Belirsizlik tahmini yapılırken sonuçlar üzerine etkisi olduğu bilinen tüm etkenler, göz önünde bulundurulmalıdır. Her bir etki ile ilgili belirsizlik, çok iyi oluşturulmuş bir prosedüre uyumlu olarak birleştirilmelidir (Anonim 2010). 1970 yılına kadar ölçüm sonuçları hata ile ifade edilmekteydi ancak 1970 yılından itibaren ölçüm belirsizliği ifadesi kullanılmaya başlanıldı (Binici, 2014).

2.19. l  m belirsizlik bütçesinin oluşturulması

Uluslararası Metroloji Sözlüğüne (Anonim 2012a) göre, ölçüm belirsizliği bütçesi, ölçüm modelini, kabulleri ve ölçüm belirsizliğini, uygulanan olasılık yoğunluk

fonksiyonlarının, serbestlik derecesini, ölçüm belirsizliğinin değerlendirilmesini ve kapsama faktörünü ölçüm modeli, alt değişkenlerini kapsamaktadır. Ölçüm belirsizliği bütçesi hesaplanırken aşağıdaki adımlar uygulanmalıdır (Anonim 2012b);

- Ölçüm yapma ve sonuçların belirlenmesi;
Giriş miktarları (örneğin, ölçülen miktarlar, sabitler, kalibrasyon standart değerleri vb.) ile ölçümler arasındaki ilişkiyi içeren bir ifade yazılır,
- Belirsizlik bileşenlerinin belirlenmesi ve hesaplanması;
Bu, 1. Aşamada belirtilen ilişki parametrelerindeki belirsizliğe katkıda bulunan kaynakları içermekle birlikte, diğer kaynakları da içerebilir ve kimyasal varsayımlardan ileri gelen kaynakları içermelidir.
- Bileşik ve genişletilmiş ölçüm belirsizliğinin hesaplanması;
Belirlenen belirsizlik potansiyelinin her biriyle ilişkili belirsizlik bileşeninin boyutunu tahmin edilmesi gereklidir. Doğrulama çalışmaları, QC verileri vb. verileri kullanarak bir takım ayrı kaynaklarla ilgili belirsizlikleri tahmin etmek veya belirlemek genellikle mümkündür. Bu tür verilerin kullanılması, belirsizliği değerlendirmek için gereken çabayı önemli ölçüde azaltır ve gerçek deneysel verileri kullandığı için belirsizliğin belirlenmesinde güvenilir tahminlerine yol açar.
- Ölçülen büyüklüğün genişletilmiş ölçüm belirsizliği ile birlikte raporlanması;
3. adımda elde edilen bilgiler, bireysel kaynaklarla ya da çeşitli kaynaklardan elde edilen kombine etkilerle ilişkili olsun, toplam belirsizliğe verilen miktarda katkılardan oluşacaktır. Katkılar standart sapma olarak ifade edilmeli ve kombine bir standart belirsizlik kazandırmak için uygun kurallara göre birleştirilmelidir. Genişletilmiş bir belirsizlik sağlamak için uygun kapsama faktörü uygulanmalıdır.

Belirsizlik değerinin hesaplamasında iki yaklaşım kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar; metodun geçerli kılınması verilerinin kullanıldığı yukarıdan aşağıya (top down) yaklaşım ve ölçüm modelinin kullanıldığı aşağıdan yukarıya (bottom up) yaklaşımdır (Anonim 2012b).

Aşağıdan yukarıya yaklaşımında ise, metot ile ilgili tüm detaylar sıralanır ve ölçüm modeli oluşturulur ve ölçüm içindeki parametrelerin ilişkisi cebirsel olarak ifade edilir. Her bir parametreden kaynaklanan standart ölçüm belirsizlikleri hesaplanır ve formülasyonla bir araya getirilerek bileşik ölçüm belirsizliği elde edilir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımda, metodu geçerli kılma parametreleri belirlenir ve her bir parametreden kaynaklanan standart ölçüm belirsizlikleri hesaplanır ve formülasyonla bir araya getirilerek bileşik ölçüm belirsizliği elde edilir. Her iki yaklaşımda da bulunan bileşik standart ölçüm belirsizliği değeri bulunan değer kapsam faktörü ile çarpılarak genişletilmiş ölçüm belirsizliği elde edilir. Raporlamada genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri kullanılır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımın avantajları (Anonim 2013a);

- Kullanım kolaydır.
- Belirsizlik hesaplamalarında derin bir bilgi gerektirmez.
- Bütün parametrik faktörleri kapsar.
- Gerçekçi belirsizlik değeri elde edilir.

Metot geliştirme aşamasında yardımcı olmaması ise dezavantajıdır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımın avantajları;

- Metot geliştirme aşamasında yardımcı olur.
- Belirsizlik bütçesine etki eden parametreleri kolayca gösterir.

Dezavantajları (Anonim 2013a);

- Kullanımı tecrübe gerektirir.
- Ölçüleni tanımlama zorluğu yaşatır.
- Ölçüm modelini yazma zorluğu vardır.
- Çoğu zaman matris etkisinden dolayı mevcut olan faktörlerin analizde yapmış olduğu girişiminden bileşenlerden kaynaklanan girişimlerden dolayı belirsizlik bütçesini belirlemek zordur.
- Örneğin homojenliğinden kaynaklanan parametreler belirsizlik bütçesinde yer alamaz.

Yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yaklaşımında A tipi ve B tipi olmak üzere iki çeşit hesaplama yöntemi mevcuttur. A tipi ölçüm belirsizliği hesabında, ölçüm sonucu, ölçüm büyüklüğünün gerçek değeri ve bu iki değerden elde edilen standart sapma üzerinden ölçüm belirsizliğinin hesaplanmasına dayanır. B tipi ölçüm belirsizliği hesabında, A tipi ölçüm belirsizliği hesabı dışında kalan yöntemler ile ölçüm belirsizliği bileşenlerinin hesaplanması olarak tanımlanır. Başka bir deyişle, A tipi hesaplama yöntemi, elde edilen ölçüm sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi iken B tipi hesaplama yöntemi, ölçüm belirsizliğini etkileyebilecek diğer kaynakların belirsizlik değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesidir. B tipi hesaplama yöntemindeki veriler, daha önceden gerçekleştirilen ölçümlerden elde edilen veriler, daha önce gerçekleştirilen metot geçerli kılma çalışmaları sonuçları, ilgili malzemeler ve kullanılan cihazlar konusundaki deneyim ve önceden edinilmiş bilgiler, üretici firmanın kalibrasyon sonuçları (tartımda kullanılan terazinin, hacim ölçümünde kullanılan hacim kaplarının sertifikalarındaki belirsizlik değerleri gibi), sertifikalı referans malzemelerin sertifikalarda bulunan belirsizlik değerleri ve el kitaplarından alınan referans verilere ilişkin belirsizlik değerleridir. İstatistiksel değerlendirmelerde farklı dağılım kabulleri olmakla birlikte kimyasal ölçümlerde genellikle A tipi hesaplama yönteminde normal dağılım (Gauss dağılımı), B tipi hesaplama yönteminde normal, dikdörtgen ve üçgen dağılım kabulleri yapılmaktadır. Üçgen dağılımı, bir büyüklüğün değişim gösterebilecek aralık ve değerlerin merkezde bulunma olasılığının daha yüksek olduğu bilindiği takdirde kullanılır. Şüphe duyulan durumlarda ise dikdörtgen dağılım kabulü yapılmaktadır (Binici 2014).

2.20.Belirsizlik Kaynakları

Yukarıdan aşağıya yaklaşımında, genel olarak belirsizlik kaynakları örnekleme, ön işlemler, metot biası, koşullardaki değişim ve örnek matrisindeki değişim şeklindedir. Bu kaynaklar tekrarlanabilirlik, ara tekrarlanabilirlik, geri kazanım, doğrusal aralık ve gerçeklik gibi detaylandırılabilir. Bu kaynakların ölçüm prosedürüne ve metot validasyonundaki parametrelere bağlı olarak birkaçı veya hepsi olabilmektedir (Anonim 2010).

Belirsizlik kaynakları (Anonim 2012b) aşağıda sıralanmıştır;

- Örnekleme: Kurum içi veya saha örnekleminin belirtilen prosedürün bir bölümünü oluşturduğu durumlarda, farklı numuneler arasındaki rastgele değişimler ve örnekleme

prosedüründeki önyargı olasılığı, nihai sonuca etki eden belirsizlik bileşenlerini oluşturur.

- Depolama şartları: Numuneler analizden önce herhangi bir süre için saklandığı durumlarda, depolama koşulları sonuçları etkileyebilir. Depolama süresi ve depolama esnasındaki koşullar bu nedenle belirsizlik kaynakları olarak düşünülmelidir.
- Cihazın etkisi: Cihazla yapılan kalibrasyon, ortam sıcaklığına bağlı cihazın ölçüm belirsizlikleri gibi örnekler verilebilir.
- Reaktif saflığı: Bir hacimsel solüsyonun konsantrasyonu, ana materyal analiz edilse bile tam olarak bilinmemektedir. Çünkü analiz prosedürüne ilişkin bazı belirsizlikler mevcuttur. Örneğin, birçok organik boyar madde % 100 saf değildir ve izomerler ve inorganik tuzlar içerebilir. Bu tür maddelerin saflığı genellikle üreticiler tarafından belirtilen seviyenin altında olmamasından ötürü belirtilir. Saflık derecesi ile ilgili herhangi bir varsayım belirsizlik unsuru ortaya çıkaracaktır.
- Ölçüm şartları: Örneğin, hacimsel cam malzemeler (büret, balojoje gibi), kalibre edildiği sıcaklıktan farklı bir ortam sıcaklığında kullanılabilir. Brüt sıcaklık etkileri düzeltilmelidir. Ancak sıvı ve cam sıcaklığındaki belirsizlikler dikkate alınmalıdır. Benzer şekilde, nem, malzemelerin nemdeki olası değişikliklere karşı hassas olduğu durumlarda önemli olabilir.
- Örneğin etkileri: Bir analitin karmaşık bir matriksten geri kazanılması veya bir enstrüman ölçümü, matriksin kompozisyonundan etkilenebilir. Analit spesifikasyonu bu etkiyi daha da artırabilir. Bir numunenin / analitin kararlılığı, değişen termal rejim veya fotolitik etki nedeniyle analiz sırasında değişebilir.
Analitin numuneden geri kazanılması, eklenerek geri kazanımından farklı olabilir ve değerlendirilmesi gereken bir belirsizlik ortaya çıkar.
- Yazılımsal etkiler: Kalibrasyon modelinin seçimi, örn. üstel bir tepkide lineer kalibrasyonu kullanılması, daha düşük uyum ve daha yüksek belirsizliğe yol açar.
- Operatör etkisi: Yöntemi farklı algılama veya anlama ihtimali. Ölçülen değeri düşük ya da yüksek okuma ihtimali.
- Rastgele etkiler: Rassal etkiler tüm belirlemelerdeki belirsizliğe katkıda bulunur. Bu giriş tabii ki listeye eklenmelidir (Anonim 2012b).

2.21.Metrolojik izlenebilirlik

Analitin, ölçüm sürecinin bir veya daha fazla aşamasında belirtilen bir referans (ulusal veya uluslararası standart) ile karşılaştırılmasıdır. İzlenebilirlik, ulusal ve uluslararası standartlarla yapılmalıdır (Anonim 2011a).

Farklı laboratuarlardan veya aynı laboratuardan farklı zamanlarda elde edilen sonuçlarını karşılaştırmak metodun izlenebilirliği açısından önemlidir. Bu, tüm laboratuvarların aynı ölçüm ölçeğini veya aynı 'referans noktalarını' kullanmasını sağlayarak başarılır. Çoğu durumda, bu durum, birincil ulusal veya uluslararası standartlara, bir başka deyişle Uluslararası Sistem (SI) ölçüm birimlerine (uzun vadeli tutarlılık için) yol açan bir kalibrasyon zinciri kurarak başarılır. Bilinen bir referans değere götüren kıyaslamalı kesintisiz bir metod zinciri, farklı operatörlerin aynı ölçüm birimlerini kullanmasını sağlayan ortak bir referans noktası "izlenebilirlik"i sağlar. Rutin ölçümlerde bir ölçüm sonucunu elde etmek veya kontrol etmek için kullanılan tüm ilgili ara ölçümler için izlenebilirlik sağlanarak bir laboratuvar (veya zaman) ile diğer laboratuvar arasındaki ölçümlerin tutarlılığı büyük ölçüde sağlanabilir. İzlenebilirlik bu nedenle tüm ölçüm alanlarında önemli bir kavramdır (Anonim 2012b). Eurachem/CITAC (Anonim 2012b) göre “Kimyasal Ölçümlerde İzlenebilirliği” belirlemek için;

- Ölçülenin, ölçüm kapsamının ve istenilen belirsizliğin tanımlanması,
- Uygun hesaplama ve ölçüm şartlarını içeren metodun belirlenmesi,
- Metod validasyonu yaparak sonucu etkileyen bütün parametreleri ve ölçüm şartlarının belirlenmesi,
- Her etkili parametrenin bağıl öneminin tanımlanması,
- Uygun referans standartların seçilmesi ve kullanılması gibi belirsizliği belirleme faaliyetleri yapılmalıdır (Anonim 2012b).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

Geliştirilen metot işlemsel olarak örnek hazırlama ve kromatografik analiz aşamalarından oluşmaktadır. Analizler LC/MS-MS cihazıyla yapıldı. Örnek hazırlama aşamasında ise sütte sıvı-sıvı, ette katı-sıvı özütleme yöntemi kullanıldı. Ölçüm sonuçlarının nicel değerlendirilmesinde birincil standart metot olan izotop seyreltme kütle spektrometre (IDMS) tekniği kullanıldı.

3.1.1.Kimyasallar

Sülfatiazol, sülfapiridin, sülfametazin, sülfamerazin, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfametoksazol, sulfadoksin, sülfisoksazol, sulfafenazol, sülfakuinoksalin, sülfakloropridazin, sülfametizol, sülfamethoksipridazin ve bu maddelerin izotoplu bileşikleri olan sulfamethoksipridazin-d₃, sülfametizol-(fenil ¹³C₆), sulfadoksin-d₃, sülfakuinoksalin-(fenil ¹³C₆), sülfafenazol-¹³C₆, sülfapridin-(fenil ¹³C₆), sülfadimetoksin-(fenil-¹³C₆) Sigma Aldrich'ten (Darmstadt, Almanya) temin edildi.

İzotoplardan sülfatiazol-d₄, sülfametazin-d₄, sülfamerazin-d₄, sülfadiazin-d₄, sülfametoksazol-d₄, sülfisoksazol-d₄, sülfakloropridazin-d₄ TÜBİTAK UME Organik Kimya Laboratuvarında sentezlendi.

Metanol, etilasetat, asetonitril ve hekzan Merck (Darmstadt, Almanya)'dan temin edildi.

3.1.2. Kullanılan teknik cihazlar

0,2 µm filtre Whatman SPE kartuşu olarak Agilent SampliQ SCX (3 mL/60 mg p/n 5982-3236, 30 µm ortalama partikül çapı) kullanılmıştır. Terazisi Metler Toledo XP205 marka/model olup, hassasiyeti 0,01 mg'dır.

Ette ve sütte sülfonamidlerin belirlenmesi çalışmasındaki, ön deneme, kalibrasyon, ölçüm belirsizliği, metot oluşturma ve metodun geçerli kılınması işlemlerinde, TÜBİTAK UME Organik Kimya Laboratuvarındaki cihaz ve ekipmanlar kullanıldı. Bu cihazlar basınçlı çözücü ekstraksiyon cihazı (PSE) (Marka: Applied Separations Model: 10601, Seri No: 04211507), santrifüj cihazı (Marka: Sigma Model 3-18K, Seri No: 135092), manuel katı faz

ekstraktörüdür (SPE Manifold: Thermo Hypersep Glass Block Vacuum Manifold). Analizler Zivak Technologies Tandem Gold LC-MS/MS (Seri No: ZV1MS1010W016) cihazında gerçekleştirildi.

İstatistiksel hesaplamalar (ANOVA ve Regresyon analizleri) ise Microsoft Office 2010 Excel kullanılarak hesaplandı.

3.1.3. Standart çözeltiler

Sülfatiazol, sülfapridin, sülfametazin, sülfamerazin, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfametoksazol, sülfadoksin, sülfisoksazol, sülfafenazol, sülfakuinoksalin, sülfakloropridazin, sülfametizol, sülfametokspiridazin ve bu maddelerin izotopluları sülfametokspiridazin-d₃, sülfametizol-(fenil ¹³C₆), sülfadoksin-d₃, sülfakuinoksalin-(fenil ¹³C₆), sülfafenazol-¹³C₆, sülfapridin-(fenil ¹³C₆), sülfadimetoksin-(fenil-¹³C₆), sülfatiazol-d₄, sülfametazin-d₄, sülfamerazin-d₄, sülfadiazin-d₄, sülfametoksazol-d₄, sülfisoksazol-d₄, sülfakloropridazin-d₄'ün ana stokları 1000 ppm ve 10 ppm olarak hazırlandı. Hazırlanan stoklar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Sütte sülfatiazol, sülfapridin, sülfametazin, sülfamerazin, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfametoksazol, sülfadoksin, sülfisoksazol, sülfafenazol, sülfakuinoksalin, sülfakloropridazin, sülfametizol, sülfametokspiridazin için LC-MS/MS tayin metodu geliştirmek için ana stok ve ara stok çözeltileri hazırlandı. Aynı ana ve ara stok çözeltilerdeki sülfamerazin, sülfadiazin, sülfisoksazol, sülfametoksazol, sülfatiazol, sülfapridin, sülfametizol, sülfadoksin, sülfakloropridazin, sülfametazin, sülfakuinoksalin, sülfametokspiridazin ise et numunelerinde LC-MS/MS tayin metodu geliştirmek için kullanıldı.

- **Ana Stok Standart Çözeltilerinin (Stok 1) Hazırlanması (1000 µg/mL)**
Doğal sülfonamid bileşikleri ayrı ayrı herbiri 30 mg tartıldı. Üzerine 30 mL MeOH (23,73 g) eklendi. Sadece sülfakuinoksalin metanoldeki çözünürlük probleminden dolayı asetonda eklendi.
- **Ara Stok Standart Çözeltilerin (Stok 2) Hazırlanması (10 µg/mL)**
150 µL stok 1'den alınıp, üzerine 14,85 mL MeOH eklenerek ana stoktan ara stok çözeltiler hazırlandı.

3.1.4.Süt numuneleri

Laboratuvarında, metot geçerli kılma ve belirsizlik oluşturma çalışmalarında, ülkemizin tanınmış markalarından birinin ürünü olan tam yağlı uzun ömürlü süt (UHT-ultra high temperature) kullanıldı. Söz konusu sütün etiket bilgisine göre 100 mL'sindeki besin değeri, enerji: 60,5 kcal, protein: 3 g, yağ: 3,3 g, karbonhidrat: 4,7 g, kalsiyum: 120 mg'dır.

Bu tez çalışmasında süt için geliştirilen metot, ticari örneklerle uygulanmıştır. Uygulama yapılan ürünler İstanbul ve Gebze/Kocaeli'nde marketlerde satılan UHT (ultra high temperature) süt, pastörize süt ve sokak sütü örnekleridir. Sokak sütleri, İstanbul'da farklı ilçelerden temin edilmiştir. Bu örneklerden 6'şar adet temin edilmiştir. Bu örneklerin kodları UHT sütler için UHT 1, UHT 2, UHT 3, UHT 4, UHT 5, UHT 6, pastörize sütler için P 1, P 2, P 3, P 4, P 5 ve P 6, sokak sütleri için S 1, S 2, S 3, S 4, S 5 ve S 6 olarak belirlenmiştir. Süt örneklerinin laboratuvara ulaştırılmasında soğuk zincir korunmuştur.

3.1.5.Et numuneleri

Et numuneleri, İstanbul ve Kocaeli'nde çeşitli marketlerde satılan dana kuşbaşıdan çekilen kıyma etleridir. Soğuk zincir korunarak laboratuvara ulaştırılmıştır ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.Süt ve Et Numunelerinde LC-MS/MS Analiz Şartları

Sülfonamid bileşiklerinin süt ve et numunelerindeki analizleri, pozitif iyon modundaki ESI-MS/MS ve çoklu reaksiyon görüntüleme (MRM) yöntemiyle yapıldı.

Süt ve et numunelerindeki sülfonamid bileşiklerinin LC-MS/MS cihazında ilk aşamada tanıtılma çalışmasında, Phenomenex 50 m x 2 mm x 4 µm HPLC kolonu kullanıldı.

Bu aşamada akış programında mobil faz oranları; mobil faz A (% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren H₂O), mobil faz B (% 95 AcCN, %5 H₂O, % 0,1 formik asit); 50:50 olarak belirlendi. Tanıtılma çalışmalarında, analiz süresi 2,5 dakikadır. Sülfonamid bileşiklerinin LC-MS/MS cihazında tanımlandığı HPLC kolonu ise Synergi 4u Max RR 80A 250 m x 3mm x 4 µm'dir. Mobil faz belirlenirken Lopes ve ark. (2013)'nın yapmış olduğu çalışmadaki mobil faz içerikleri ve karışım oranları kullanıldı.

- **Mobil Faz A'nın hazırlanması**

25 mL asetonitril, son hacim 500 mL olana kadar ultra saf su ile seyreltildi. Üzerine 500 µL formik asit eklendi. Ardından, Mobil Faz A, ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilerek hazırlandı.

- **Mobil Faz B'nin hazırlanması**

475 mL asetonitril, 25 mL ultra saf su ile seyreltildi. Üzerine 500 µL formik asit eklendi. Sonrasında, Mobil Faz B, ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilerek hazırlandı.

3.2.1.Kromatografik koşullar

Süt ve et numunelerinde aynı kromatografik şartlar kullanılmıştır. Bunlar;

- Akış hızı: 400 µL/dk
- Enjeksiyon miktarı: 10µL
- Analiz süresi: 30 dk
- SIM genişliği: 0,800 amu, iyon kaynağı: vESI
- MS Model: 325(LC)
- Enjeksiyon sıcaklığı: 25°C
- MS bağlantı sıcaklığı: 25°C
- İyon kaynağı sıcaklığı: 55°C
- Kurutma gazı sıcaklığı: 350°C
- Kolon ısısı: 25°C
- Mobil fazlar koşulları ve programı

Yapılan bir dizi çalışma neticesinde ette ve sütte sülfonamid bileşiklerinin tayin edildiği LC-MS/MS metodundaki mobil fazlara;

- Mobil Faz A; % 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren H₂O,
- Mobil Faz B ise % 95 AcCN, %5 H₂O, % 0,1 formik asit, şeklinde karar verilmiştir (Lopes ve ark. 2013).

Sülfonamidlerin ve izotoplarının Tandem Gold LC-MS/MS cihazına tanımlanan mobil fazlarının akış programı Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Metodun geliştirilmesi ve metodun geçerli kılma süreci, kör et ve süt numunelerine ekleme yöntemiyle gerçekleştirildi. Ardından geçerli kılınan metot, sadece süt örneklerinde olmak üzere UHT, pastörize ve sokak sütlerine uygulandı.

Çizelge 3.1 Sülfonamidlerin ve izotoplarının Tandem Gold LC-MS/MS cihazına tanımlandığı akış programı

Süre (dk)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)	Akış (µl/dk)
0:00	95	5	400
0:30	95	5	400
6:00	85	15	400
12:00	65	35	400
16:00	65	35	400
18:00	45	55	400
21:00	45	55	400
22:00	95	5	400
30:00	95	5	400

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.Metotlar ve Metotlardan Elde Edilen Bulgular

4.1.1.LC-IDMS Metodu

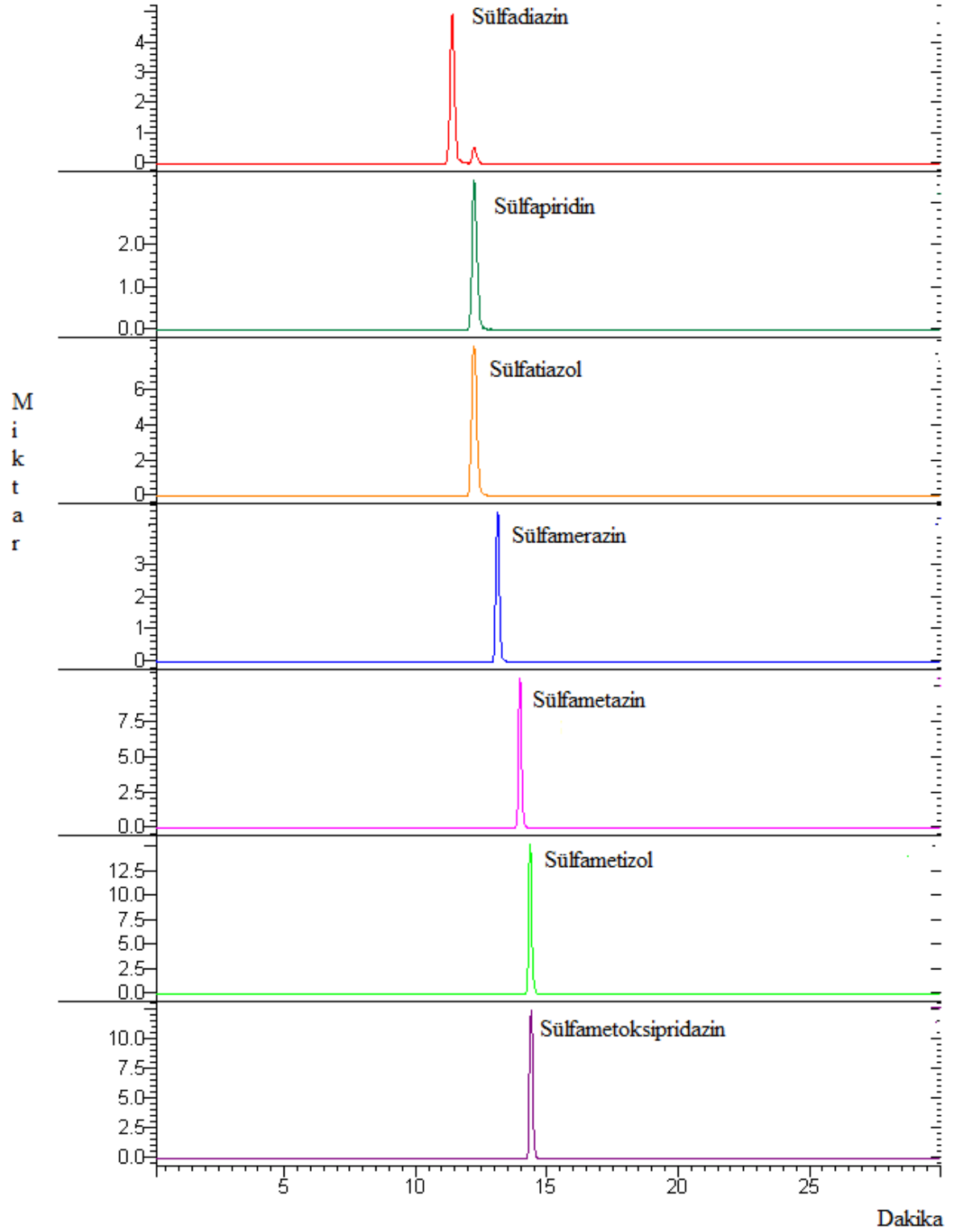
LC-IDMS metodunda, her analitin yakalanma zamanı görece karakteristiktir. Metot oluşturmaya başlamadan önce ana iyon ve yakalanma zamanı belirlenmelidir. Bunun için kapiler voltajının, çarpışma enerjisinin ve mobil fazın (basınç, akış ve karışım miktarının) optimize edilmesi gerekir.

Öncelikle 0,6 ppm sülfonamid karışımı hazırlandı. Cihaza 15 µL verilerek sülfonamidlerin ayrılmasına, yakalanma zamanlarına bakıldı. Bu işlemler uygun mobil fazın, mobil fazın akış tablosunun ayarlanması, enjeksiyon hacminin belirlenmesi içindir. m/z: 250 sulfapridin ana iyonu ile m/z: 251 sulfadiazin ana iyonu ayrımı kromatografik olarak sağlandı. 500 ppb'lik izotop ve doğal sülfonamid bileşiklerinin çözeltisi hazırlandı. Bu karışım cihazda analiz edildi. Ancak sulfatiazol ile sulfapridin-C₆, sulfametoksipridazin-d₃ ile sulfakloropridazin ana iyon piklerinin çakıştığı görüldü. Bu problemin aşılması için farklı ara iyonlar belirlendi. Ayrıca sulfadoksin-d₃ ile sulfafenazol ana iyonlarının da çakıştığı görüldü. Bu sorun kromatografik olarak ayırımın sağlanmasıyla çözüldü. Bu işlem Çizelge 4.1.'de özetlendi.

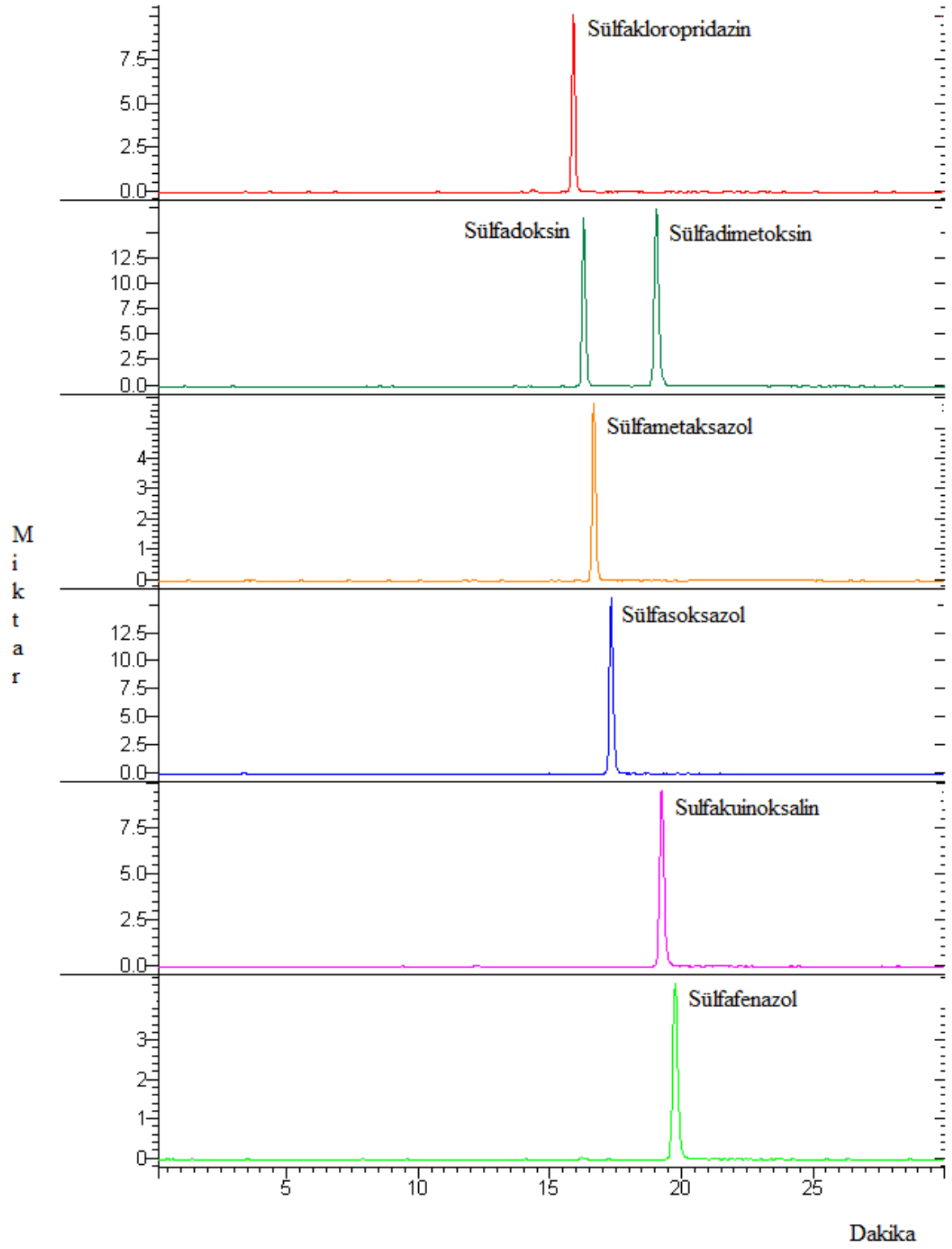
Çizelge 4.1 Sülfonamid iyonlarının MS-MS parametrelerinin belirlenmesi

Sülfonamidler	Ana İyon (m/z)	Kantitatif	Kapiler (eV)	Çarpışma Enerjisi (eV)	Yakalanma Zamanı (dk)
Sülfamerazin	265	156	80	20	13,172
Sülfadiazin	251	156	80	15	11,349
Sülfisoksazol	268	156	80	10	17,335
Sülfametoksazol	254	156	80	18	16,681
Sülfatiazol	256	155,9	80	14	12,127
Sülfadimetoksin	311	156	100	20	19,048
Sülfapridin	250	156	100	20	12,895
Sülfametizol	271	156	100	12	14,401
Sülfadoksin	311	156	100	18	16,305
Sülfakloropridazin	284,9	156	100	14	15,909
Sülfafenazol	315	160	60	20	19,745
Sülfametazin	279	186	110	20	14,014
Sülfakuinoksalin	301	156	100	15	19,246
Sülfametoksipridazin	281	155,9	100	17	14,434
Sülfafenazol ¹³ C ₆	321	158	60	22	19,746
Sülfakuinoksalin ¹³ C ₆	307	161,9	100	15	19,243
Sülfapridin ¹³ C ₆	256	113,9	100	16	12,135
Sülfametizol ¹³ C ₆	276,9	161,9	100	12	14,398
Sülfadimetoksin ¹³ C ₆	317	155,9	100	20	19,055
Sulfadoxin d3	314	155,9	100	16	16,241
Sulfamethoxypridazin d3	284	128,9	100	16	14,391
Sülfadiazin d4	255	160	80	15	11,262
Sülfatiazol d4	260	160	80	14	12,039
Sülfametoksazol d4	258	160	80	16	16,630
Sülfamerazin d4	269	160	80	18	13,091
Sülfametazin d4	283	186	110	18	13,953
Sülfisoksazol d4	272	160	80	13	17,279
Sulfachoropyridazine d4	289	160	100	14	15,863

Sütte ve ette belirlenen metotla Şekil 4.1’de görüldüğü gibi kromatogramda sülfonamid bileşiklerine ait piklerin tam olarak ayrılması sağlanabildi.



Şekil 4.1 Sütte ve ette sülfonamid bileşiklerine ait tekil kromatogram görüntüsü



Şekil 4.1'in devamı

4.1.1.1.Kalibrasyon Grafiklerinin Oluşturulması

Kalibrasyonlar için ön denemeler yapıldı.

- Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hazırlanan 2015 Ulusal Kalıntı İzleme Planında (Anonim 2015a) et ve süt ürünlerindeki sülfonamid varlığı belli derişimlerle sınırlandırılmıştır. Bu sınır değeri, tekil sülfonamid bileşığı için 20 ng/g, toplamda ise 100 ng/g'dır. Bu nedenle sülfonamid bileşiklerinin kalibrasyon seviyeleri olarak 10 ng/g, 15 ng/g, 20 ng/g, 30 ng/g, 40 ng/g, 50 ng/g belirlenmiştir. Kalibrasyonun alt sınırının 10 ng/g olarak belirlenmesi ise LOQ değeri için ≤ 10 ng/g olması nedeniyledir.
- Bu seviyelerde hem matriks eşleşmeli hem de çözücüde birçok kalibrasyon denemesi yapıldı.

Süt için kalibrasyon seviyeleri aşağıda sunulmuştur;

K₁: 10 ng/g, K₂:15 ng/g, K₃:20 ng/g, K₄: 30 ng/g, K₅:40 ng/g, K₆: 50 ng/g

Örnek 1. K₁'in hazırlanması;

10 ng/g (süt içerisinde) seviyesinde son hacimdeki konsantrasyon için

10 ng/g x 5 g (süt) = 50 ng sülfonamid içermektedir.

10 mL AcCN, etilasetat karışımından, 6 mL alındığı için 50 ng. 6 mL/ 10 mL= 30 ng sülfonamid içermektedir.

30 ng/~1,5 g (son hacim)= 20 ng/g

Buna göre K₂, K₃, K₄, K₅ ve K₆ kalibrasyonları da aynı yöntemle hesaplanmıştır.

Et için kalibrasyon seviyeleri aşağıda sunulmuştur;

K₁: 10 ng/g, K₂:15 ng/g, K₃:20 ng/g, K₄: 30 ng/g, K₅: 40 ng/g, K₆: 50 ng/g

Örnek 1. K₁'in hazırlanması;

10 ng/g (et içerisinde) seviyesinde son hacimdeki konsantrasyon için

10 ng/g x 5 g (et)= 50 ng sülfonamid içerir.

10 mL AcCN'den, 6 mL alındığı için 50 ng. 6 mL/ 10 mL= 30 ng sülfonamid içerir.

30 ng/~1,5 g (son hacim)= 20 ng/g

Buna göre K₂, K₃, K₄, K₅ ve K₆ kalibrasyonları da aynı yöntemle hesaplanmıştır.

4.1.1.2.Matriks etkisi

Matriks etkisi analitle birlikte mevcut olan başka moleküller, LC-MS/MS cihazında elektrosprey arayüzeyinin verimini değiştirdiğinde meydana gelir. Analitik kimyada IUPAC, matriks etkisini, ölçülen analitten başka mevcut olan örnek içeriğinin birleştirilmiş etkisi olarak tanımlar. Eğer bu etkiyi özgün bir içerik yapıyorsa buna girişim denir (Gosetti ve ark. 2010). Matriks etkisinin tam olarak mekanizması bilinmemektedir. Matriks etkisi sadece bir nedene bağlı değildir. Çeşitli koşulların sinerjik etkisine dayanır. Bunlar analitin kimyasal özellikleri, matriks içerikleri, temizleme prosedürü, kromatografik koşullar (durgun ve mobil fazlar ve mobil faza eklenenleri), kütle spektrometrenin çeşidi ve özellikleri gibi birçok etken vardır. İyon baskılaması ayrıca değişik iyonizasyon tekniklerine, iyonizasyon modlarına (PI, NI gibi) ve farklı kaynak dizaynı ekipmana bağlıdır.

Matriks etkisi, yakalama kabiliyetini, seçiciliği, tekrarlanabilirliği, doğruluğu, yanıtın lineerliğini (sinyalin veya konsantrasyonun) ve raporlama limiti gibi metot performans parametrelerini etkiler (Fabio ve ark. 2010). İyon baskılaması sadece kendi başına doğruluğu % 26 civarında azaltır (Hewavitharana 2011). Matriks eşleme, analizin sonucunu etkileyen matriks etkisini baskılamak için kullanılır. FDA matriks etkilerinin HPLC-MS metotları için araştırılmasının gerekliliğini belirtmiştir (Taylor 2005).

Matriks etkisiyle oluşan iyon baskılamasını/artmasını önlemek için kütle spektrometre koşullarında modifikasyonlar uygulanması, ön işlem ve ekstraksiyon koşullarının geliştirilmesi, kromatografik koşulların modifikasyonu, optimum kalibrasyon stratejisinin seçilmesi gibi uygulamalar geliştirilebilir. Burada matriks etkisini düzeltmenin en ideal yolu IDMS'tir. Çünkü analit ve izotopun iyon baskılama ve arttırmada yanıtları farklı olmasına rağmen, yanıtların oranı bundan etkilenmez. Bu nedenle kalibrasyonlar mobil fazda, suda hazırlanan ile matrikste

hazırlanan aynı sonucu verecektir. Bu çalışmada matriks etkisini bertaraf etmek için IDMS tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte analit ve onun izotoplu ikiz gibi davranır. Böylelikle metodun analit üzerinde yarattığı her türlü etki izotoplu bileşik üzerinde de kendini gösterecektir. Oluşan etki çift taraflı kontrol edilerek bertaraf edilebilir.

4.1.2.Sütte 14 adet sülfonamid bileşiklerinin tayinine yönelik metodun kalibrasyon eğrileri

Kalibrasyon grafiklerinde X ekseninde; doğal sülfonamid bileşiği konsantrasyonu/izotop sülfonamid bileşiği konsantrasyonu, Y ekseninde ise, doğal sülfonamid bileşiği alanı/izotop sülfonamid bileşiği alanı bulunmaktadır.

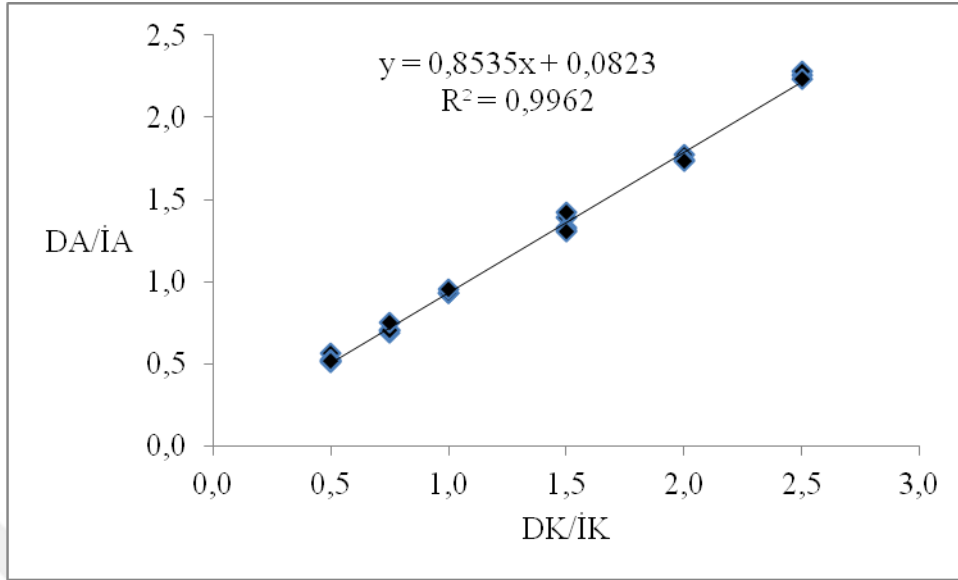
Sülfamerazinin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.2’de ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Doğal sülfamerazin konsantrasyonu/izotop sülfamerazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfamerazin alanı/izotop sülfamerazin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,6
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
15	0,8	0,7
15	0,8	0,7
15	0,8	0,7
15	0,8	0,8
20	1,0	0,9
20	1,0	0,9
20	1,0	1,0
30	1,5	1,4
30	1,5	1,3
30	1,5	1,3
30	1,5	1,4
30	1,5	1,3
40	2,0	1,8
40	2,0	1,7
40	2,0	1,7
50	2,5	2,3
50	2,5	2,3
50	2,5	2,2

DK: Doğal konsantrasyonu, İK: İzotop konsantrasyonu

DA: Doğal alanı, İA: İzotop alanı



Şekil 4.2 Sülfamerazin için kalibrasyon eğrisi

Sülfamerazin için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 0,8535$$

$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0823$$

$$R^2 = 0,9962$$

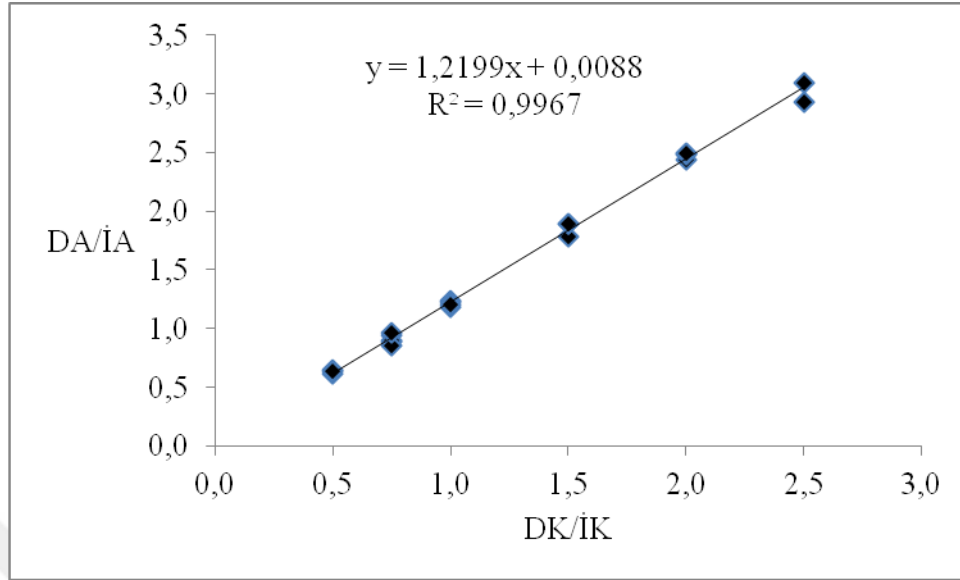
Sülfadiazin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.3'te ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Doğal sülfadiazin konsantrasyonu/izotop sülfadiazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfadiazin alanı/izotop sülfadiazin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,6
10	0,5	0,7
10	0,5	0,6
15	0,8	0,9
15	0,8	0,9
15	0,8	0,9
15	0,8	0,9
15	0,8	1,0
20	1,0	1,2
20	1,0	1,2
20	1,0	1,2
20	1,0	1,2
30	1,5	1,8
30	1,5	1,9
30	1,5	1,9
40	2,0	2,5
40	2,0	2,4
40	2,0	2,5
40	2,0	2,5
50	2,5	2,9
50	2,5	3,1

DK: Doğal konsantrasyonu, İK: İzotop konsantrasyonu

DA: Doğal alanı, İA: İzotop alanı



Şekil 4.3 Sülfadiazin için kalibrasyon eğrisi

Sülfadiazin için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 1,2199$$

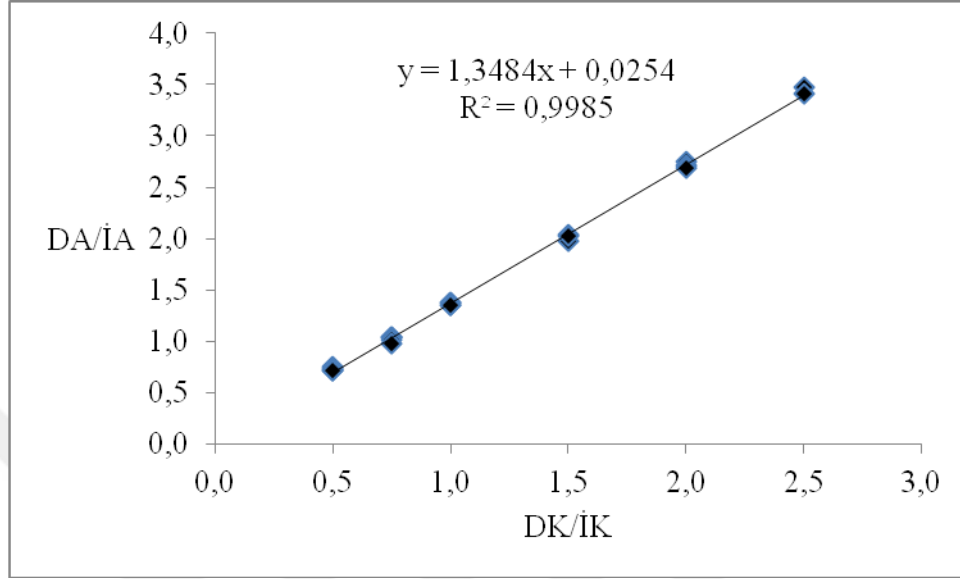
$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0088$$

$$R^2 = 0,997$$

Sülfisoksazol kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.4'te ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Doğal sülfisoksazol konsantrasyonu/izotop sülfisoksazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfisoksazol alanı/izotop sülfisoksazol alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,7
10	0,5	0,8
10	0,5	0,7
10	0,5	0,7
10	0,5	0,7
15	0,8	1,0
15	0,8	1,0
15	0,8	1,0
15	0,8	1,0
15	0,8	1,0
20	1,0	1,4
20	1,0	1,4
20	1,0	1,4
20	1,0	1,4
30	1,5	2,0
30	1,5	2,0
30	1,5	2,0
40	2,0	2,7
40	2,0	2,7
40	2,0	2,7
50	2,5	3,5
50	2,5	3,4



Şekil 4.4 Sülfisoksazol için kalibrasyon eğrisi

Sülfisoksazol için kalibrasyon eğrisi denklemi eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 1,3484$$

$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0254$$

$$R^2 = 0,999$$

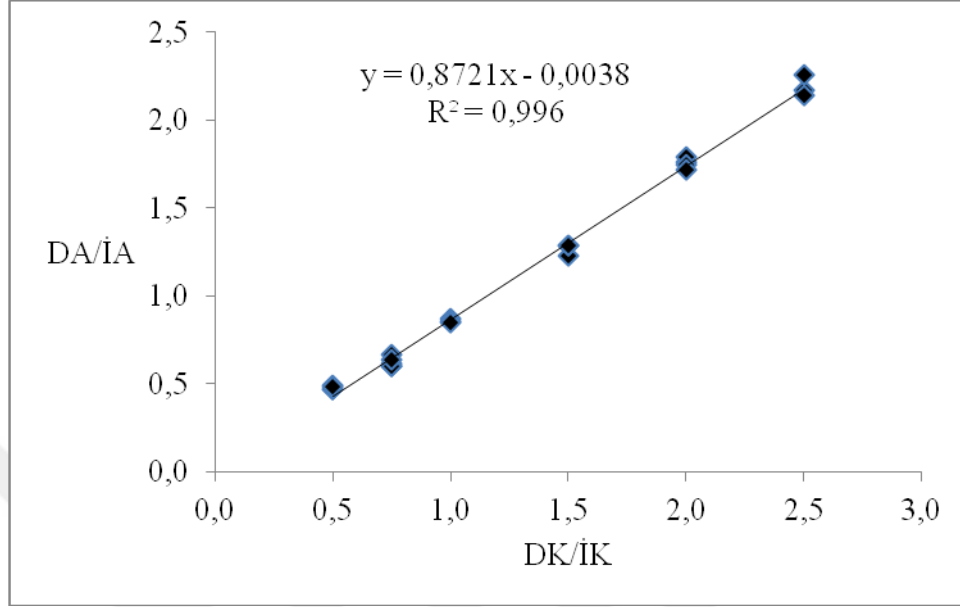
Sülfametoksazol kalibrasyon Çizelge 4.5 'te ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Doğal sülfametoksazol konsantrasyonu/izotop sülfametoksazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfametoksazol alanı/izotop sülfametoksazol alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
15	0,8	0,6
15	0,8	0,7
15	0,8	0,6
15	0,8	0,6
15	0,8	0,6
20	1,0	0,9
20	1,0	0,9
20	1,0	0,9
30	1,5	1,2
30	1,5	1,3
30	1,5	1,3
40	2,0	1,8
40	2,0	1,8
40	2,0	1,7
40	2,0	1,7
50	2,5	2,2
50	2,5	2,3
50	2,5	2,1

DK: Doğal konsantrasyonu, İK: İzotop konsantrasyonu

DA: Doğal alanı, İA: İzotop alanı



Şekil 4.5 Sülfametoksazol için kalibrasyon eğrisi

Sülfametoksazol için kalibrasyon eğrisi denklemi eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;
 $y = ax + b$

a (eğim) = 0,8721

b (kesme noktası) = 0,0038

R^2 = 0,996

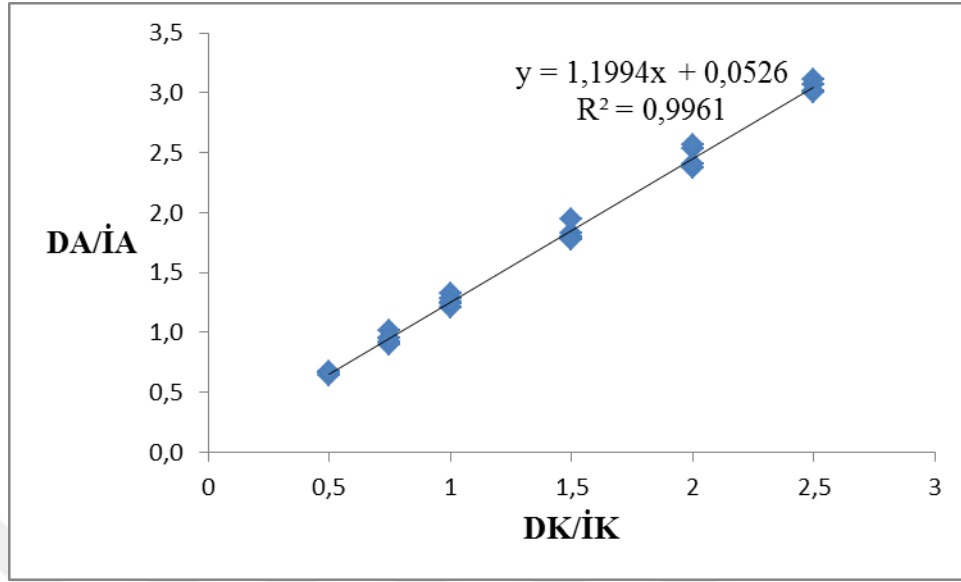
Sülfatiazol kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.6’da ve Şekil 4.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 Doğal sülfatiazol konsantrasyonu/izotop sülfatiazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfatiazol alanı/izotop sülfatiazol alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,7
10	0,5	0,7
10	0,5	0,6
10	0,5	0,7
10	0,5	0,7
15	0,75	1,0
15	0,75	0,9
15	0,75	0,9
15	0,75	0,9
15	0,75	1,0
20	1	1,3
20	1	1,2
20	1	1,2
20	1	1,3
20	1	1,2
30	1,5	1,8
30	1,5	1,8
30	1,5	1,8
30	1,5	1,9
30	1,5	1,8
40	2	2,4
40	2	2,5
40	2	2,6
40	2	2,4
50	2,5	3,1
50	2,5	3,1
50	2,5	3,0
50	2,5	3,0

DK: Doğal konsantrasyonu, İK: İzotop konsantrasyonu

DA: Doğal alanı, İA: İzotop alanı



Şekil 4.6 Sülfatiazol için kalibrasyon eğrisi

Sülfatiazol için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 1,1994$$

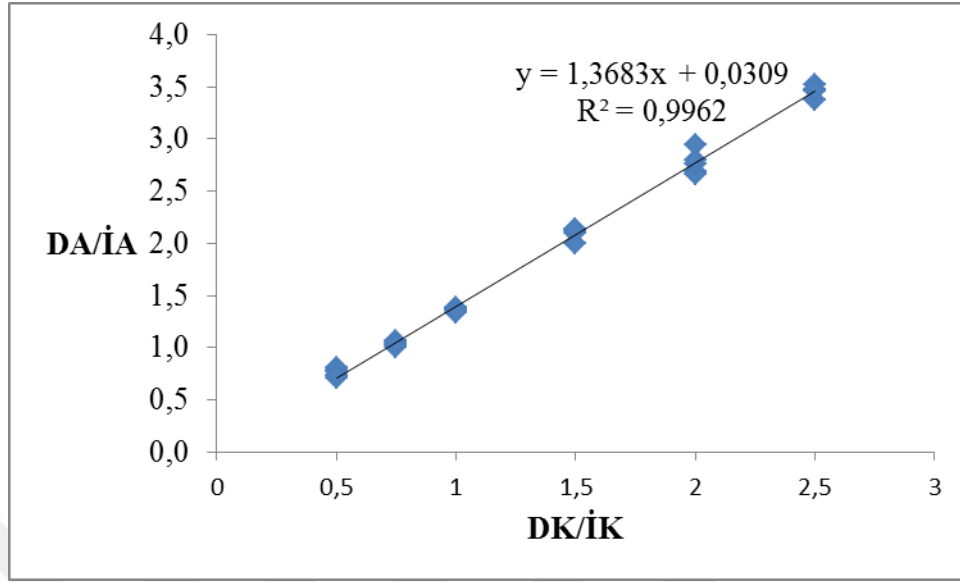
$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0526$$

$$R^2 = 0,996$$

Sülfadimetoksin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.7’de ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 Doğal sülfadimetoksin konsantrasyonu/izotop sülfadimetoksin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfadimetoksin alanı/izotop sülfadimetoksin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,8
10	0,5	0,7
10	0,5	0,8
10	0,5	0,8
10	0,5	0,7
15	0,75	1,0
15	0,75	1,1
15	0,75	1,1
15	0,75	1,0
15	0,75	1,0
20	1	1,4
20	1	1,4
20	1	1,4
20	1	1,4
20	1	1,3
30	1,5	2,1
30	1,5	2,1
30	1,5	2,0
30	1,5	2,1
30	1,5	2,1
40	2	2,9
40	2	2,7
40	2	2,7
40	2	2,8
40	2	2,8
50	2,5	3,5
50	2,5	3,4
50	2,5	3,5
50	2,5	3,5
50	2,5	3,5



Şekil 4.7 Sülfadimetoksin için kalibrasyon eğrisi

Sülfadimetoksin için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 1,3683$$

$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0309$$

$$R^2 = 0,996$$

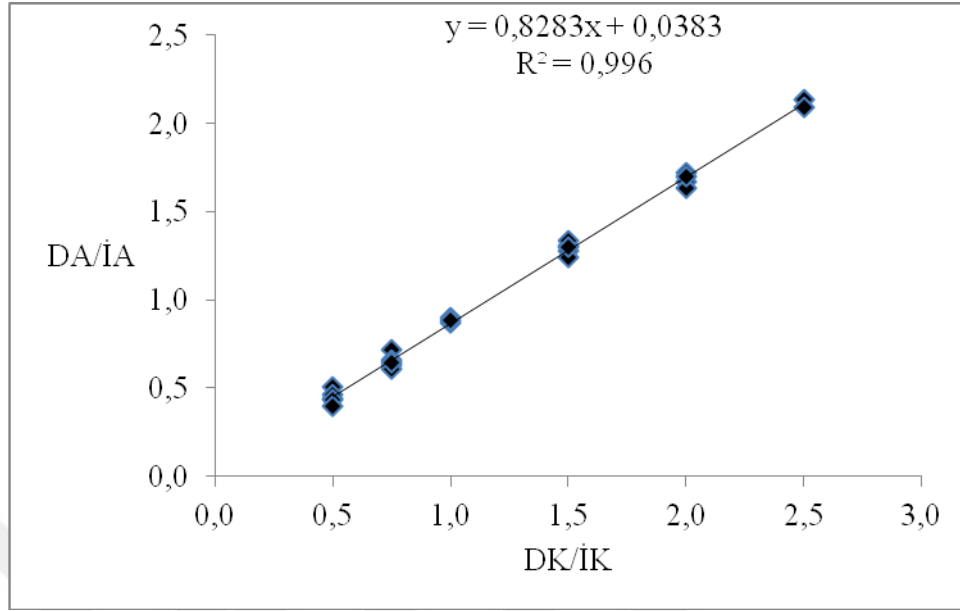
Sülfapridin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.8’de ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Doğal sülfapridin konsantrasyonu/izotop sülfapridin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfapridin alanı/izotop sülfapridin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,5
10	0,5	0,4
10	0,5	0,5
10	0,5	0,4
10	0,5	0,4
15	0,8	0,7
15	0,8	0,7
15	0,8	0,6
15	0,8	0,6
15	0,8	0,6
20	1,0	0,9
20	1,0	0,9
20	1,0	0,9
30	1,5	1,3
30	1,5	1,3
30	1,5	1,2
30	1,5	1,3
30	1,5	1,3
40	2,0	1,7
40	2,0	1,6
40	2,0	1,7
40	2,0	1,7
50	2,5	2,1
50	2,5	2,1

DK: Doğal konsantrasyonu, İK: İzotop konsantrasyonu

DA: Doğal alanı, İA: İzotop alanı



Şekil 4.8 Sülfapridin için kalibrasyon eğrisi

Sülfapridin için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 0,8283$$

$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0383$$

$$R^2 = 0,996$$

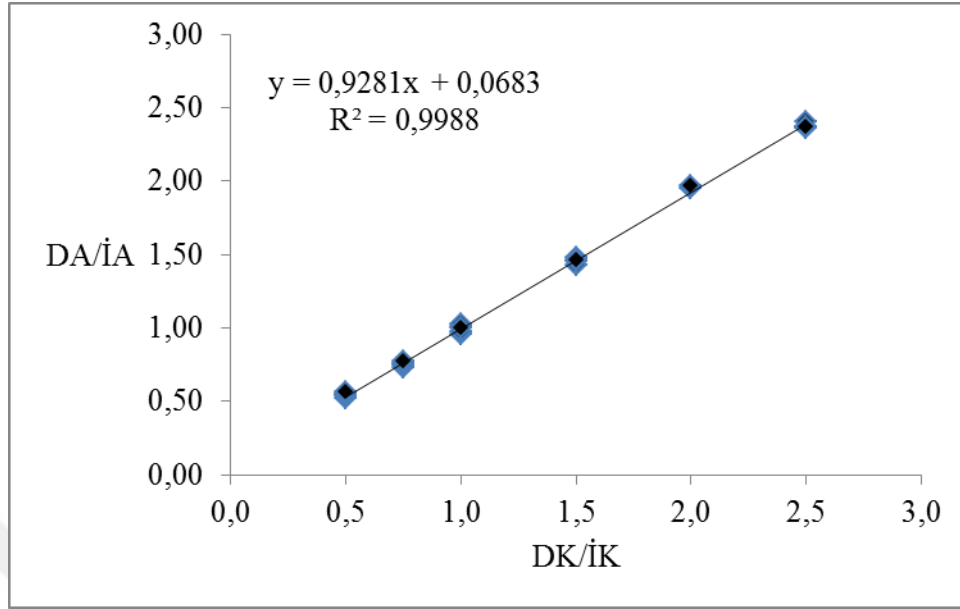
Sülfametizol kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.9’da ve Şekil 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Doğal sülfametizol konsantrasyonu/izotop sülfametizol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfametizol alanı/izotop sülfametizol alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,52
10	0,5	0,54
10	0,5	0,55
10	0,5	0,54
10	0,5	0,56
15	0,8	0,76
15	0,8	0,73
15	0,8	0,75
15	0,8	0,75
15	0,8	0,77
20	1,0	0,95
20	1,0	1,01
20	1,0	0,98
20	1,0	1,03
20	1,0	1,00
30	1,5	1,43
30	1,5	1,46
30	1,5	1,48
30	1,5	1,46
40	2,0	1,95
40	2,0	1,97
50	2,5	2,41
50	2,5	2,37
50	2,5	2,36
50	2,5	2,37

DK: Doğal konsantrasyonu, İK: İzotop konsantrasyonu

DA: Doğal alanı, İA: İzotop alanı



Şekil 4.9 Sülfametizol için kalibrasyon eğrisi

Sülfametizol için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 0,9281$$

$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0683$$

$$R^2 = 0,999$$

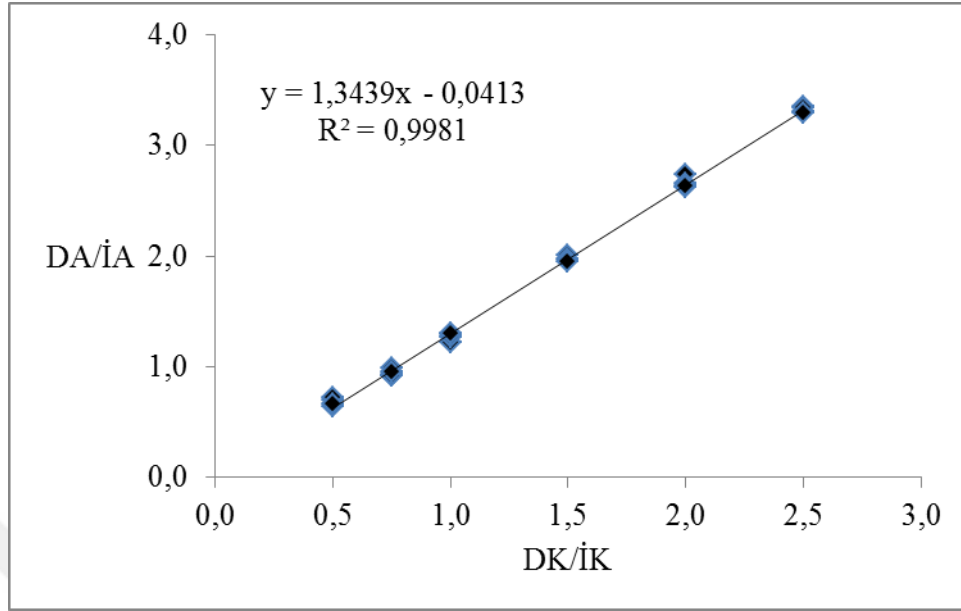
Sülfakloropridazin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.10'da ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10 Doğal sülfakloropridazin konsantrasyonu/izotop sülfakloropridazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfakloropridazin alanı/izotop sülfakloropridazin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,7
10	0,5	0,6
10	0,5	0,7
10	0,5	0,7
15	0,8	0,9
15	0,8	1,0
15	0,8	0,9
15	0,8	0,9
15	0,8	1,0
20	1,0	1,2
20	1,0	1,3
20	1,0	1,3
20	1,0	1,3
20	1,0	1,3
30	1,5	2,0
30	1,5	2,0
30	1,5	1,9
40	2,0	2,7
40	2,0	2,6
40	2,0	2,6
40	2,0	2,6
50	2,5	3,3
50	2,5	3,3
50	2,5	3,3
50	2,5	3,3

DK: Doğal konsantrasyonu, İK: İzotop konsantrasyonu

DA: Doğal alanı, İA: İzotop alanı



Şekil 4.10 Sülfakloropridazin için kalibrasyon eğrisi

Sülfakloropridazin için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 1,3439$$

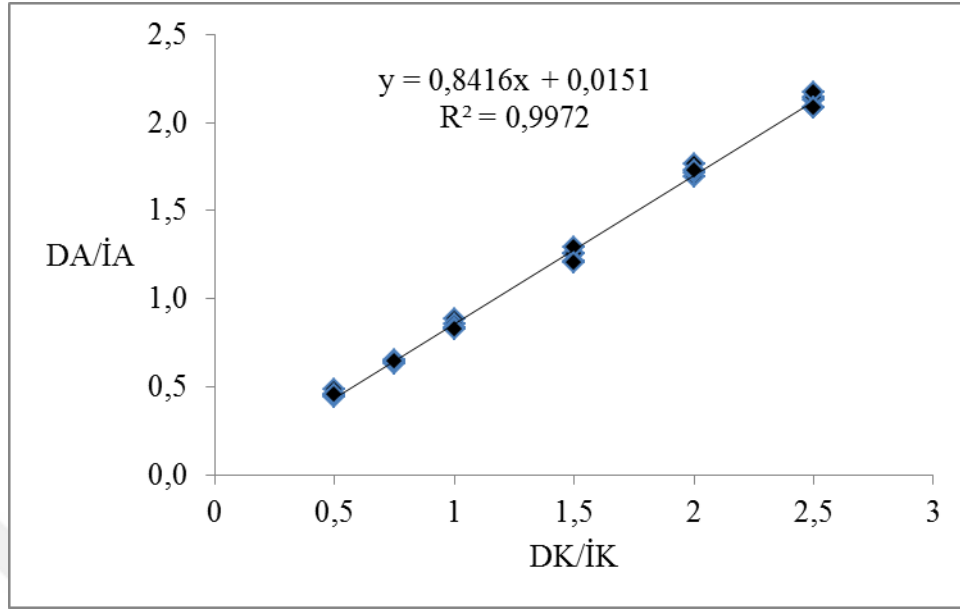
$$b \text{ (kesme noktası)} = -0,0413$$

$$R^2 = 0,998$$

Sülfadoksin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.11’de ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11 Doğal sülfadoksin konsantrasyonu/izotop sülfadoksin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfadoksin alanı/izotop sülfadoksin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,4
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
15	0,75	0,6
15	0,75	0,6
15	0,75	0,6
15	0,75	0,7
15	0,75	0,6
20	1	0,9
20	1	0,8
20	1	0,9
20	1	0,8
20	1	0,8
30	1,5	1,3
30	1,5	1,3
30	1,5	1,2
30	1,5	1,3
30	1,5	1,2
40	2	1,8
40	2	1,7
40	2	1,7
40	2	1,7
50	2,5	2,1
50	2,5	2,1
50	2,5	2,2
50	2,5	2,1
50	2,5	2,1



Şekil 4.11 Sülfadoksin için kalibrasyon eğrisi

Sülfadoksin için kalibrasyon eğrisi denklemleri eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 0,8416$$

$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0151$$

$$R^2 = 0,997$$

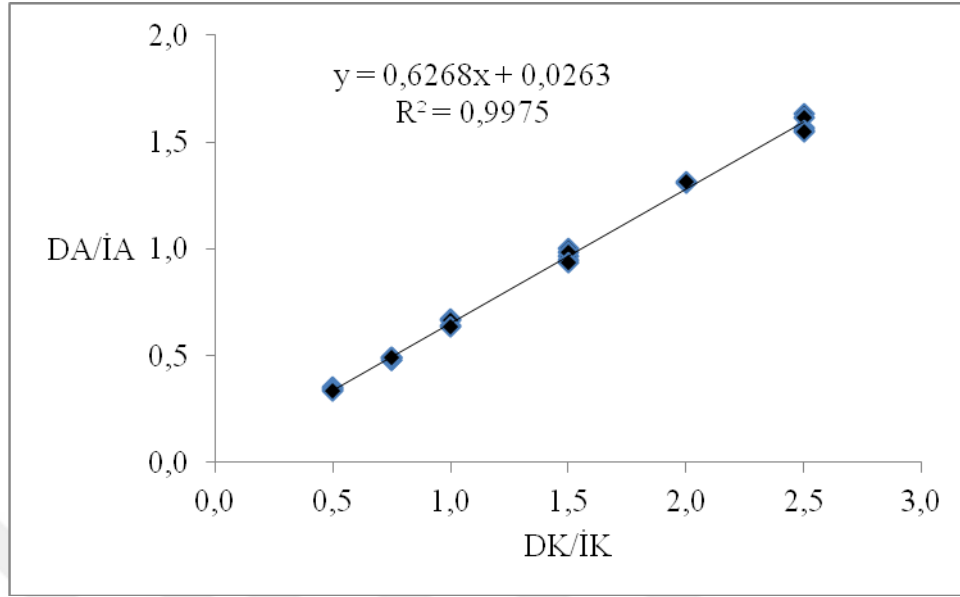
Sülfafenazol kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.12’de ve Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12 Doğal sülfafenazol konsantrasyonu/izotop sülfafenazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfafenazol alanı/izotop sülfafenazol alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,4
10	0,5	0,3
10	0,5	0,3
10	0,5	0,3
15	0,8	0,5
15	0,8	0,5
15	0,8	0,5
15	0,8	0,5
15	0,8	0,5
20	1,0	0,6
20	1,0	0,7
20	1,0	0,7
20	1,0	0,6
30	1,5	1,0
30	1,5	0,9
30	1,5	1,0
30	1,5	1,0
30	1,5	0,9
40	2,0	1,3
40	2,0	1,3
50	2,5	1,6
50	2,5	1,6
50	2,5	1,6
50	2,5	1,6
50	2,5	1,6

DK: Doğal konsantrasyonu, İK: İzotop konsantrasyonu

DA: Doğal alanı, İA: İzotop alanı



Şekil 4.12 Sülfafenazol için kalibrasyon eğrisi

Sülfafenazol için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 0,6268$$

$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0263$$

$$R^2 = 0,998$$

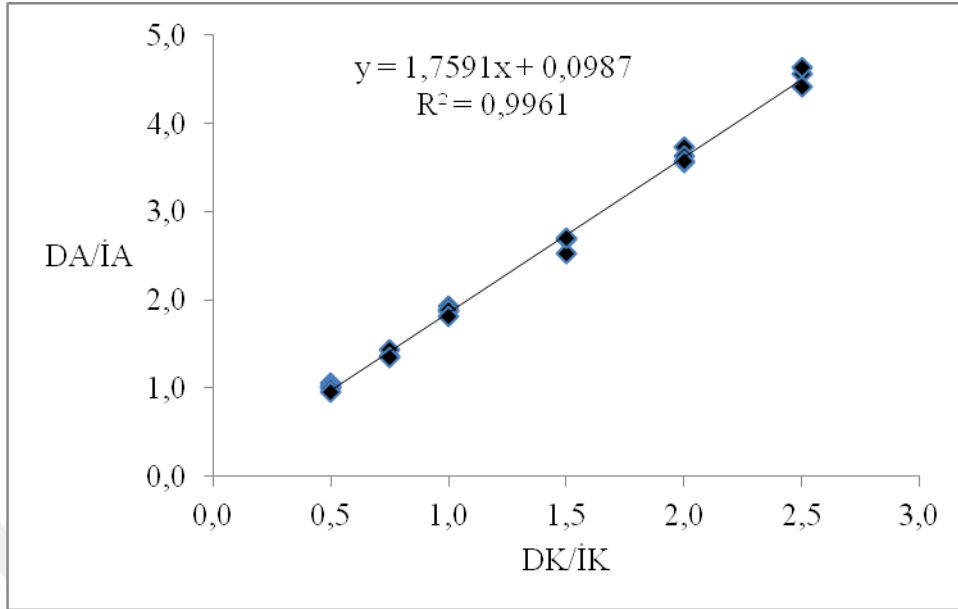
Sülfametazin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.13'te ve Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13 Doğal sülfametazin konsantrasyonu/izotop sülfametazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfametazin alanı/izotop sülfametazin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	1,1
10	0,5	1,0
10	0,5	1,0
10	0,5	1,0
10	0,5	1,0
15	0,8	1,4
15	0,8	1,4
15	0,8	1,3
20	1,0	1,9
20	1,0	1,9
20	1,0	1,9
20	1,0	1,8
30	1,5	2,7
30	1,5	2,5
30	1,5	2,7
40	2,0	3,7
40	2,0	3,6
40	2,0	3,6
40	2,0	3,6
50	2,5	4,6
50	2,5	4,4
50	2,5	4,6

DK: Doğal konsantrasyonu, İK: İzotop konsantrasyonu

DA: Doğal alanı, İA: İzotop alanı



Şekil 4.13 Sülfametazin için kalibrasyon eğrisi

Sülfametazin için kalibrasyon eğrisi denklemleri eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 1,7591$$

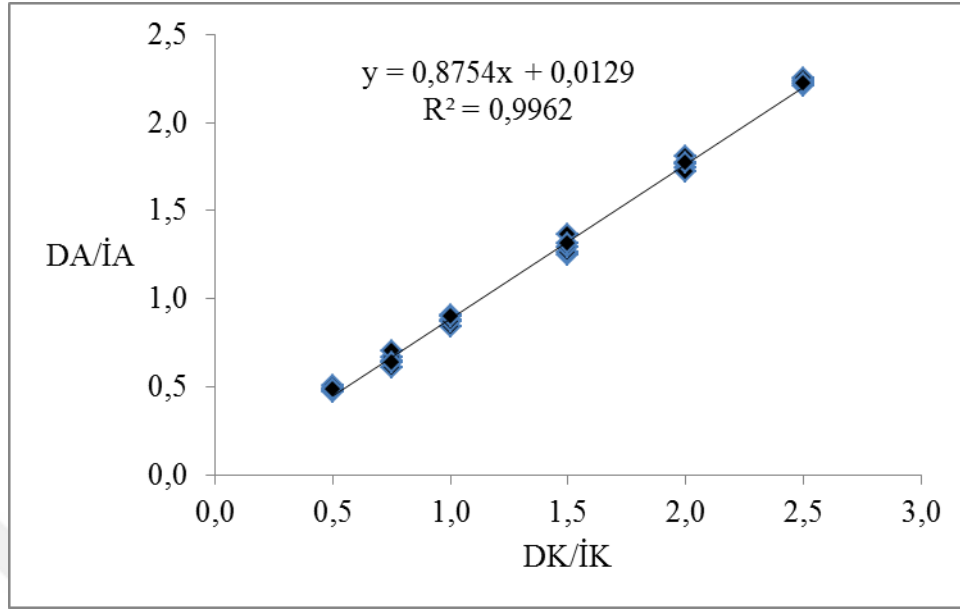
$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0987$$

$$R^2 = 0,996$$

Sülfakuinoksalin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.14'te ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.14 Doğal sülfakuinoksalin konsantrasyonu/izotop sülfakuinoksalin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfakuinoksalin alanı/izotop sülfakuinoksalin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
10	0,5	0,5
15	0,8	0,6
15	0,8	0,6
15	0,8	0,7
15	0,8	0,7
15	0,8	0,6
20	1,0	0,8
20	1,0	0,9
20	1,0	0,9
20	1,0	0,9
20	1,0	0,9
30	1,5	1,2
30	1,5	1,3
30	1,5	1,3
30	1,5	1,4
30	1,5	1,3
40	2,0	1,7
40	2,0	1,8
40	2,0	1,7
40	2,0	1,8
40	2,0	1,8
50	2,5	2,2
50	2,5	2,3
50	2,5	2,2
50	2,5	2,2



Şekil 4.14 Sülfakuinoksalin için kalibrasyon eğrisi

Sülfakuinoksalin için kalibrasyon eğrisi denklemleri eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 0,8754$$

$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0129$$

$$R^2 = 0,996$$

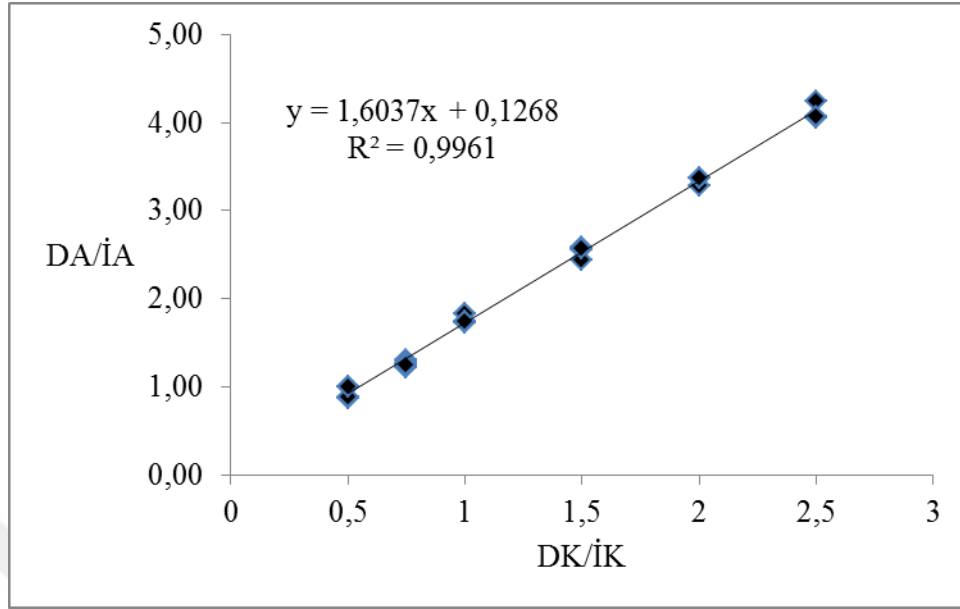
Sülfametoksipridazin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.15'te ve Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.15 Doğal sülfametoksipridazin konsantrasyonu/izotop sülfametoksipridazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfametoksipridazin alanı/izotop sülfametoksipridazin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	1,01
10	0,5	0,87
10	0,5	1,00
10	0,5	0,89
10	0,5	0,99
15	0,75	1,31
15	0,75	1,28
15	0,75	1,22
15	0,75	1,25
15	0,75	1,25
20	1	1,83
20	1	1,83
20	1	1,74
20	1	1,73
30	1	1,74
30	1,5	2,56
30	1,5	2,44
30	1,5	2,59
30	1,5	2,57
40	2	3,29
40	2	3,37
40	2	3,37
50	2,5	4,24
50	2,5	4,05
50	2,5	4,07

DK: Doğal konsantrasyonu, İK: İzotop konsantrasyonu

DA: Doğal alanı, İA: İzotop alanı



Şekil 4.15 Sülfametoksipridazin için kalibrasyon eğrisi

Sülfametoksipridazin için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 1,6037$$

$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,1268$$

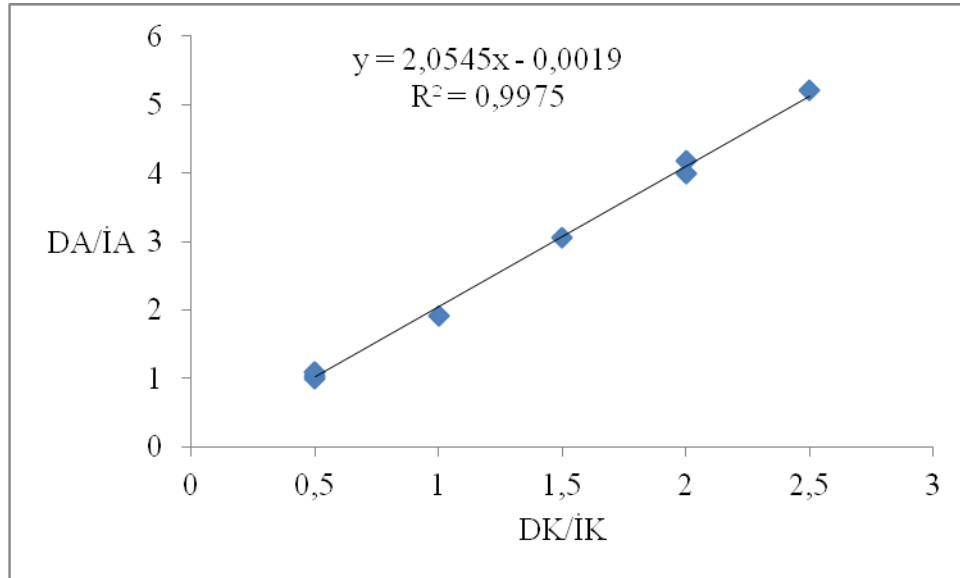
$$R^2 = 0,996$$

4.1.3. Ette 12 adet sülfonamid bileşiklerinin tayinine yönelik metodun kalibrasyon eğrileri

Sülfamerazin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.16’da ve Şekil 4.16’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16 Doğal sülfamerazin konsantrasyonu/izotop sülfamerazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfamerazin alanı/izotop sülfamerazin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	1,04461
10	0,5	1,00617
10	0,5	1,08778
10	0,5	1,09342
20	1	1,90873
30	1,5	3,05094
40	2	4,18277
40	2	3,99913
50	2,5	5,20913



Şekil 4.16 Sülfamerazin için kalibrasyon eğrisi

Sülfamerazin için kalibrasyon eğrisi denklemi eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 2,0545$$

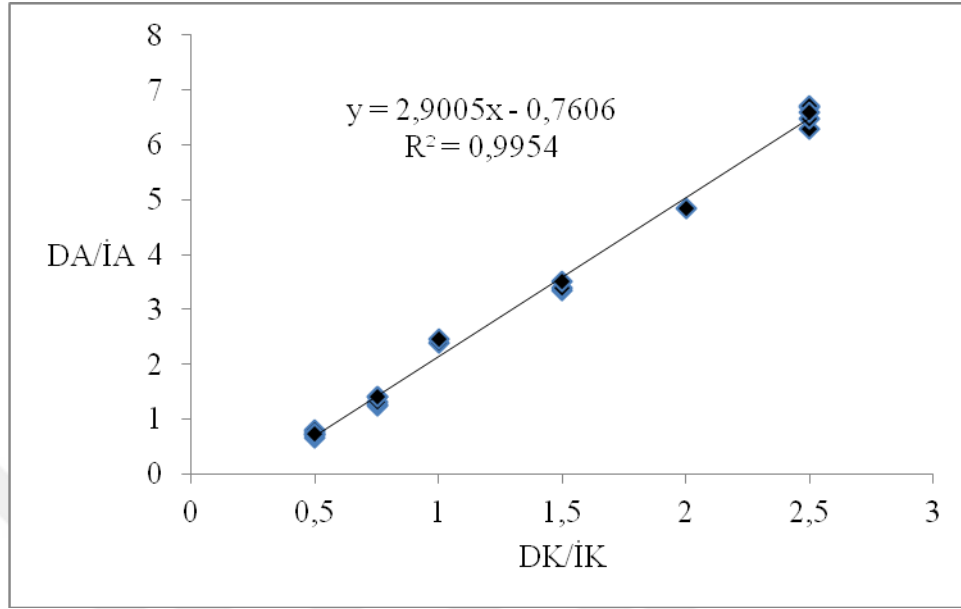
$$b \text{ (kesme noktası)} = -0,0019$$

$$R^2 = 0,998$$

Sülfadiazin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.17’de ve Şekil 4.17’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17 Doğal sülfadiazin konsantrasyonu/izotop sülfadiazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfadiazin alanı/izotop sülfadiazin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,73959
10	0,5	0,65972
10	0,5	0,76586
10	0,5	0,70414
10	0,5	0,8014
10	0,5	0,72616
15	0,75	1,41268
15	0,75	1,24616
15	0,75	1,27446
15	0,75	1,31157
15	0,75	1,40992
20	1	2,38525
20	1	2,45161
30	1,5	3,33825
30	1,5	3,39724
30	1,5	3,5105
40	2	4,84972
50	2,5	6,29211
50	2,5	6,68852
50	2,5	6,70883
50	2,5	6,47728
50	2,5	6,60508



Şekil 4.17 Sülfadiazin için kalibrasyon eğrisi

Sülfadiazin için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 2,9005$$

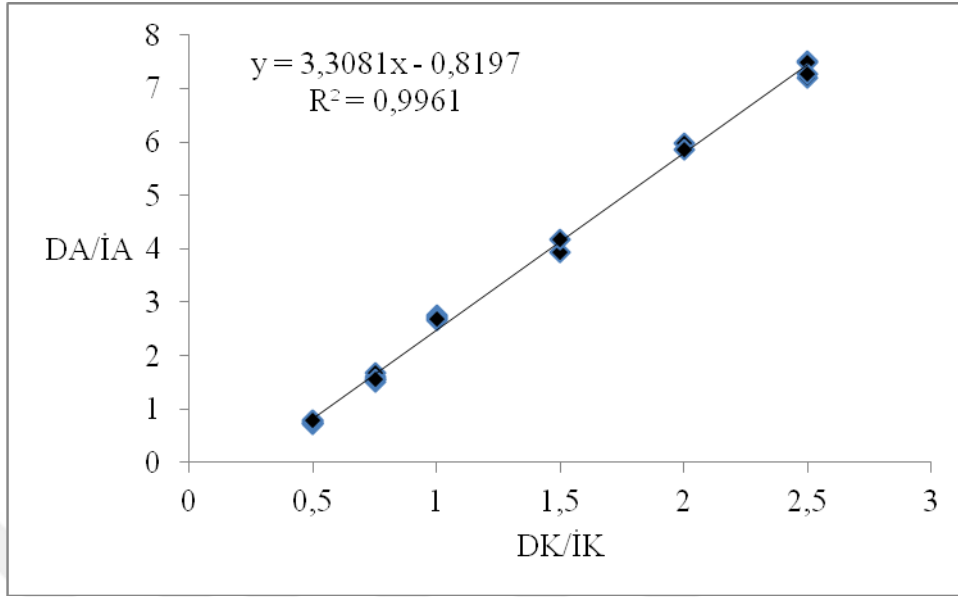
$$b \text{ (kesme noktası)} = -0,7606$$

$$R^2 = 0,995$$

Sülfisoksazol kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.18’de ve Şekil 4.18’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.18 Doğal sülfisoksazol konsantrasyonu/izotop sülfisoksazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfisoksazol alanı/izotop sülfisoksazol alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,71928
10	0,5	0,75167
10	0,5	0,73131
10	0,5	0,79946
10	0,5	0,74536
10	0,5	0,79357
15	0,75	1,54805
15	0,75	1,6046
15	0,75	1,51285
15	0,75	1,68367
15	0,75	1,56861
20	1	2,75057
20	1	2,70126
20	1	2,73821
20	1	2,66753
20	1	2,69866
20	1	3,92603
30	1,5	4,17692
40	2	5,97589
40	2	5,86651
50	2,5	7,51257
50	2,5	7,20228
50	2,5	7,4896



Şekil 4.18 Sülfisoksazol için kalibrasyon eğrisi

Sülfisoksazol için kalibrasyon eğrisi denklemi eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 3,3081$$

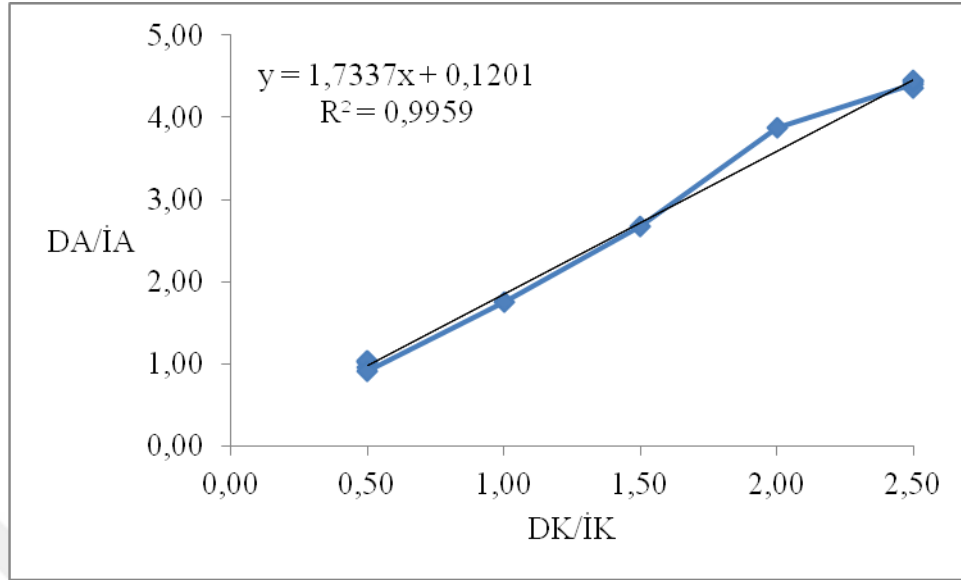
$$b \text{ (kesme noktası)} = -0,8197$$

$$R^2 = 0,996$$

Sülfametoksazol kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.19’da ve Şekil 4.19’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.19 Doğal sülfametoksazol konsantrasyonu/izotop sülfametoksazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfametoksazol alanı/izotop sülfametoksazol alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,50	1,02
10	0,50	0,96
10	0,50	1,03
10	0,50	1,04
10	0,50	0,91
20	1,00	1,75
30	1,50	2,68
40	2,00	3,87
50	2,50	4,40
50	2,50	4,36
50	2,50	4,43
50	2,50	4,46



Şekil 4.19 Sülfametoksazol için kalibrasyon eğrisi

Sülfametoksazol için kalibrasyon eğrisi denklemleri eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 1,7337$$

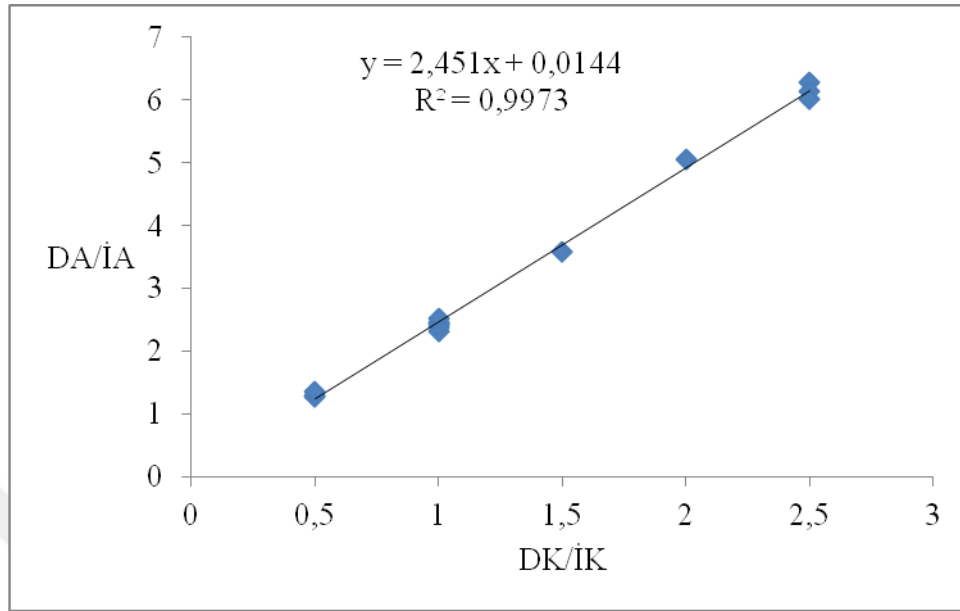
$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,1201$$

$$R^2 = 0,996$$

Sülfatiazol kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.20’de ve Şekil 4.20’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20 Doğal sülfatiazol konsantrasyonu/izotop sülfatiazol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfatiazol alanı/izotop sülfatiazol alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	1,29187
10	0,5	1,27471
10	0,5	1,35253
20	1	2,46602
20	1	2,38447
20	1	2,44217
20	1	2,31793
20	1	2,4188
20	1	2,51706
30	1,5	3,58662
40	2	5,06334
50	2,5	6,27144
50	2,5	6,14741
50	2,5	6,0099



Şekil 4.20 Sülfatiazol için kalibrasyon eğrisi

Sülfatiazol için kalibrasyon eğrisi denklemleri eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 2,451$$

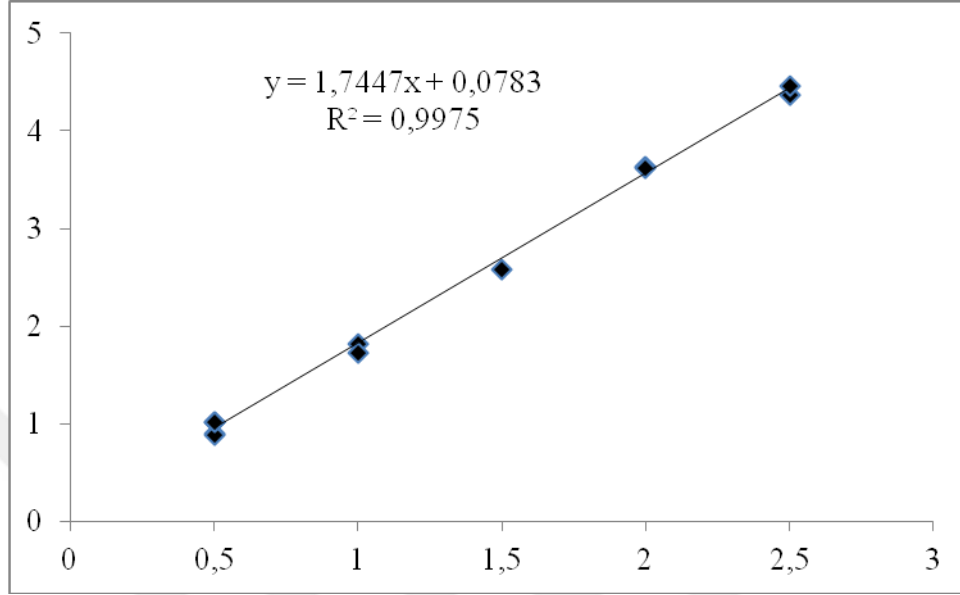
$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0144$$

$$R^2 = 0,997$$

Sülfapridin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.21’de ve Şekil 4.21’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.21 Doğal sülfapridin konsantrasyonu/izotop sülfapridin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfapridin alanı/izotop sülfapridin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	1,01337
10	0,5	1,01805
10	0,5	0,90233
10	0,5	0,88876
10	0,5	1,02029
20	1	1,82071
20	1	1,72355
30	1,5	2,57967
40	2	3,63662
40	2	3,6309
40	2	3,61423
50	2,5	4,36565
50	2,5	4,46356



Şekil 4.21 Sülfapridin için kalibrasyon eğrisi

Sülfapridin için kalibrasyon kalibrasyon eğrisi denklemi eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 1,7447$$

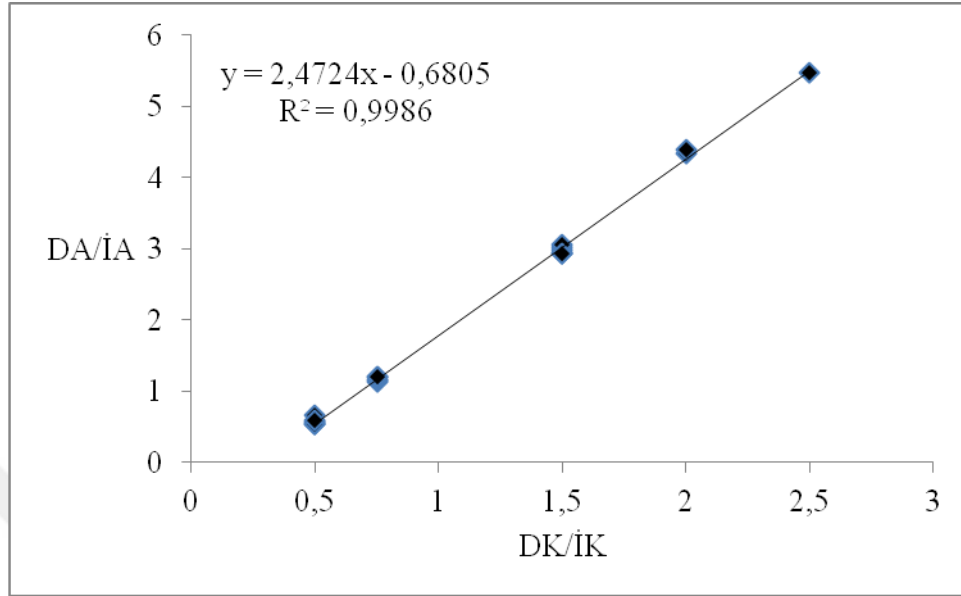
$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0783$$

$$R^2 = 0,998$$

Sülfametizol kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.22’de ve Şekil 4.22’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.22 Doğal sülfametizol konsantrasyonu/izotop sülfametizol konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfametizol alanı/izotop sülfametizol alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,65505
10	0,5	0,53492
10	0,5	0,54818
10	0,5	0,5668
10	0,5	0,54136
15	0,5	0,58368
15	0,75	1,19717
15	0,75	1,14278
15	0,75	1,13227
15	0,75	1,17415
15	0,75	1,20097
30	1,5	3,023
30	1,5	2,9954
30	1,5	2,95494
30	1,5	3,0609
30	1,5	2,9336
30	1,5	2,94239
40	2	4,34676
40	2	4,38829
50	2,5	5,47718



Şekil 4.22 Sülfametizol için kalibrasyon eğrisi

Sülfametizol için kalibrasyon kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 2,4724$$

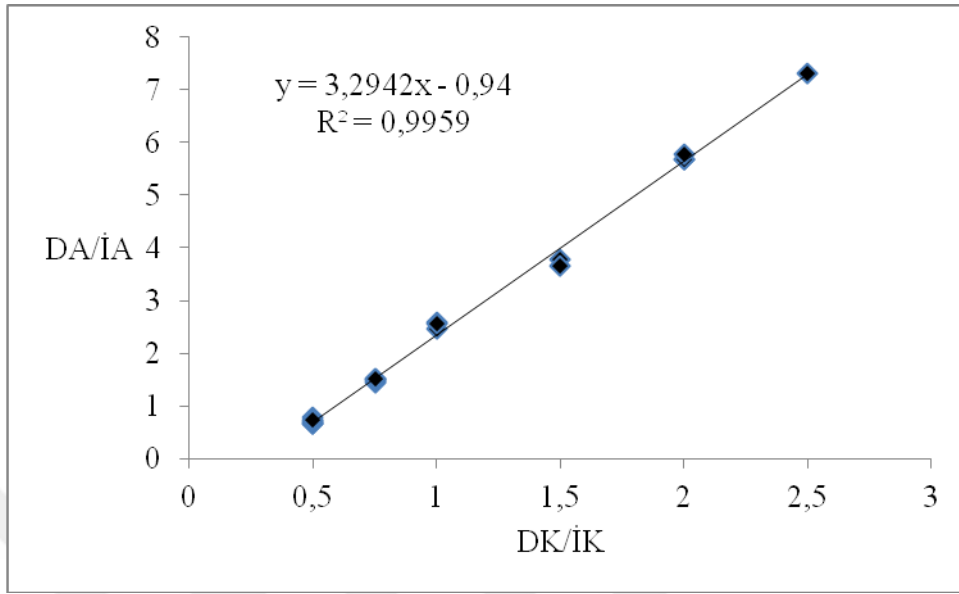
$$b \text{ (kesme noktası)} = -0,6805$$

$$R^2 = 0,999$$

Sülfakloropridazin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.23'te ve Şekil 4.23'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.23 Doğal sülfakloropridazin konsantrasyonu/izotop sülfakloropridazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfakloropridazin alanı/izotop sülfakloropridazin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,69511
10	0,5	0,78409
10	0,5	0,65335
10	0,5	0,67382
10	0,5	0,71748
10	0,5	0,74072
15	0,75	1,50353
15	0,75	1,48225
15	0,75	1,43621
15	0,75	1,45922
15	0,75	1,52009
20	1	2,5966
20	1	2,47673
20	1	2,563
30	1,5	3,78186
30	1,5	3,66061
40	2	5,66885
40	2	5,67765
40	2	5,78883
50	2,5	7,32055



Şekil 4.23 Sülfakloropridazin için kalibrasyon eğrisi

Sülfakloropridazin için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 3,2942$$

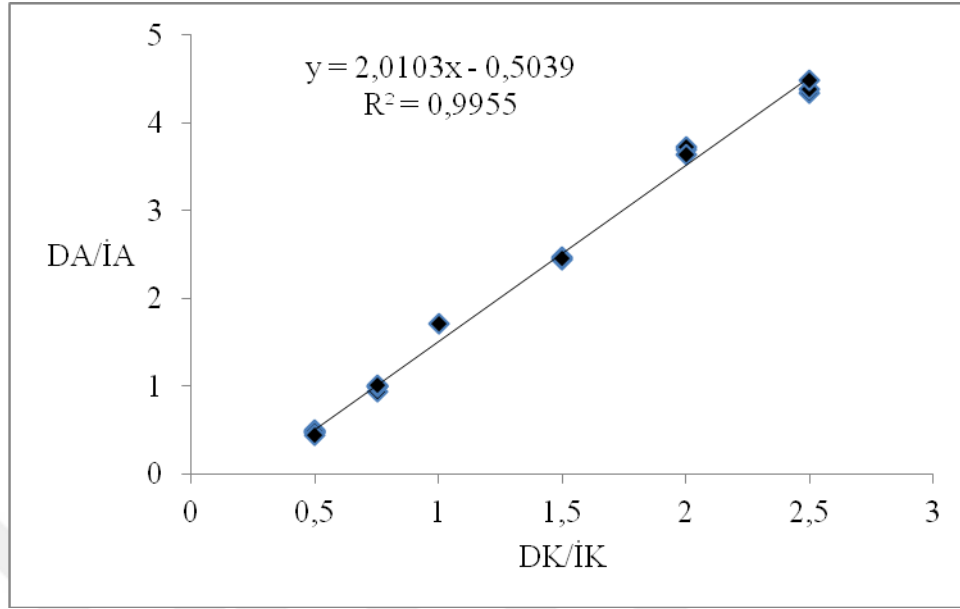
$$b \text{ (kesme noktası)} = -0,94$$

$$R^2 = 0,996$$

Sülfadoksin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.24'te ve Şekil 4.24'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.24 Doğal sülfadoksin konsantrasyonu/izotop sülfadoksin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfadoksin alanı/izotop sülfadoksin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,49139
10	0,5	0,46746
10	0,5	0,50276
10	0,5	0,4705
10	0,5	0,49001
10	0,5	0,44655
15	0,75	1,00103
15	0,75	0,9337
15	0,75	0,99861
15	0,75	0,9994
15	0,75	1,01594
20	1	1,71802
30	1,5	2,44378
30	1,5	2,46785
30	1,5	2,45267
40	2	3,69283
40	2	3,72201
40	2	3,64484
50	2,5	4,34713
50	2,5	4,38746
50	2,5	4,49044



Şekil 4.24 Sülfadoksin için kalibrasyon eğrisi

Sülfadoksin için kalibrasyon eğrisi denklemleri eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 2,0103$$

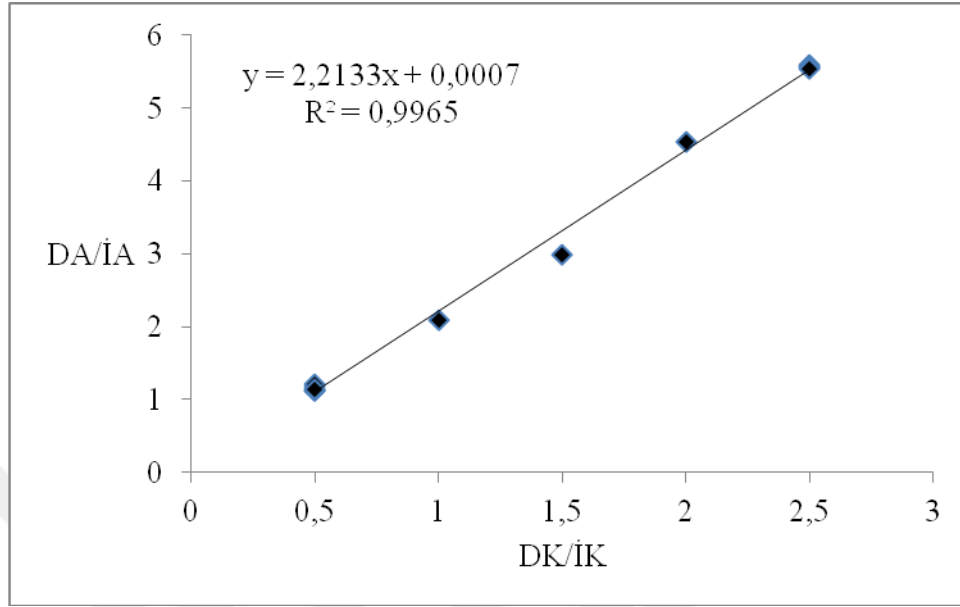
$$b \text{ (kesme noktası)} = -0,5039$$

$$R^2 = 0,996$$

Sülfametazin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.25’de ve Şekil 4.25’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.25 Doğal sülfametazin konsantrasyonu/izotop sülfametazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfametazin alanı/izotop sülfametazin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	1,12603
10	0,5	1,17089
10	0,5	1,12943
10	0,5	1,20429
10	0,5	1,14045
20	1	2,09365
30	1,5	2,97975
40	2	4,53149
50	2,5	5,55106
50	2,5	5,59323
50	2,5	5,57423
50	2,5	5,53904



Şekil 4.25 Sülfametazin için kalibrasyon eğrisi

Sülfametazin için kalibrasyon eğrisi denklemleri eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 2,2133$$

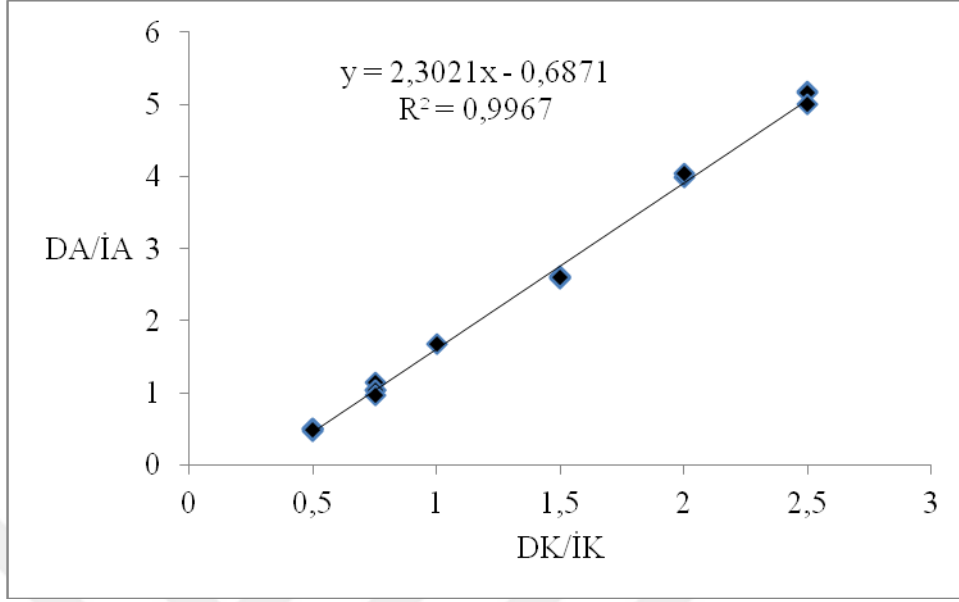
$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,0007$$

$$R^2 = 0,997$$

Sülfakuinoksalin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.26’da ve Şekil 4.26’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.26 Doğal sülfakuinoksalin konsantrasyonu/izotop sülfakuinoksalin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfakuinoksalin alanı/izotop sülfakuinoksalin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	0,47653
10	0,5	0,50993
10	0,5	0,50282
10	0,5	0,51367
10	0,5	0,4945
15	0,75	1,14094
15	0,75	1,04231
15	0,75	1,04317
15	0,75	0,97693
20	1	1,68209
30	1,5	2,61414
30	1,5	2,61211
30	1,5	2,58743
30	1,5	2,61193
40	2	3,9903
40	2	4,04901
50	2,5	5,17825
50	2,5	5,16455
50	2,5	5,0042



Şekil 4.26 Sülfakuinoksalin için kalibrasyon eğrisi

Sülfakuinoksalin için kalibrasyon eğrisi denklemleri eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 2,3021$$

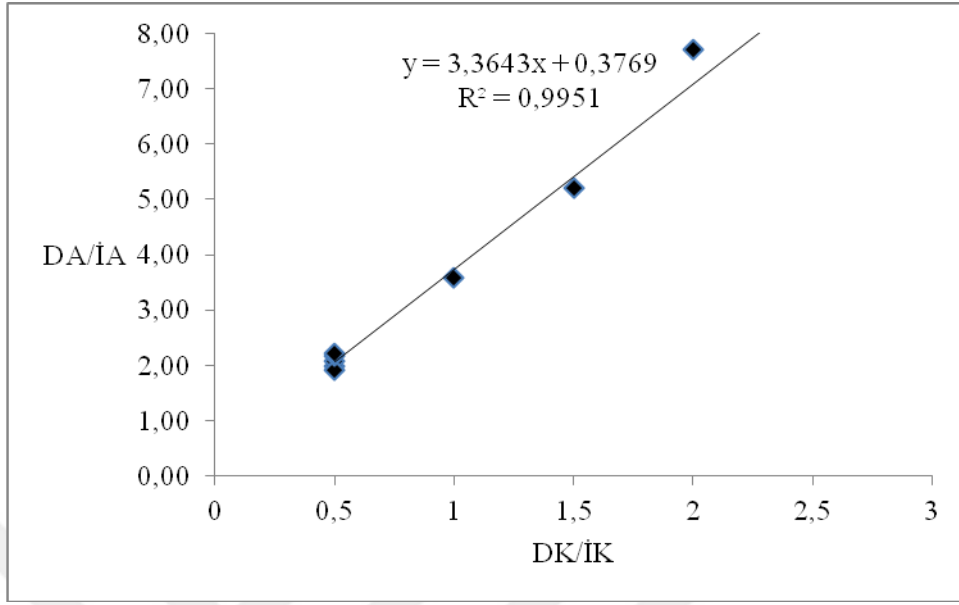
$$b \text{ (kesme noktası)} = -0,6871$$

$$R^2 = 0,997$$

Sülfametoksipridazin kalibrasyon bilgileri Çizelge 4.27’de ve Şekil 4.27’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.27 Doğal sülfametoksipridazin konsantrasyonu/izotop sülfametoksipridazin konsantrasyonu değerlerine karşılık doğal sülfametoksipridazin alanı/izotop sülfametoksipridazin alanı değerleri

Derişim (ng/g)	DK/İK	DA/İA
10	0,5	1,99
10	0,5	2,08
10	0,5	1,92
10	0,5	2,17
10	0,5	2,21
20	1	3,59
30	1,5	5,21
40	2	7,71
50	2,5	8,67
50	2,5	8,67
50	2,5	8,74
50	2,5	8,77



Şekil 4.27 Sülfametoksipridazin için kalibrasyon eğrisi

Sülfametoksipridazin için kalibrasyon eğrisi denklemini eğimi, kesme noktası ve R-kare değeri;

$$y = ax + b$$

$$a \text{ (eğim)} = 3,3643$$

$$b \text{ (kesme noktası)} = 0,3769$$

$$R^2 = 0,995$$

4.1.4. Sulfonamidlerin sütte ekstraksiyon çalışması

Literatürde, saflaştırma ve sulfonamidlerin sütte zenginleştirilmesi metodu için çöktürme, ultrafiltrasyon, sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) ve katı faz ekstraksiyon (SPE), iyon değişimi, C18, siklodekstrin bağlı faz, alümina ve sikloheksil kullanıldığından bahsedilmektedir (Wang ve ark. 2006).

Bu çalışmada yapılan pek çok deneme ve imkanlar dahilinde, sütlerden sulfonamidlerin zenginleştirilmesi çalışmasında sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğine karar verilmiştir. Literatürde sütte sulfonamid ekstraksiyonlarının çoğunda çok aşamalı saflaştırma prosedürleri kullanılmaktadır. Fakat tandem kütle spektrometri veya florimetri yöntemleri diğer yöntemlere göre daha sade saflaştırma prosedürleri gerektirirler ya da hiç saflaştırma prosedürü gerektirmezler. Tandem kütle spektrometrelerle, son derece özel algılama olmadan, 50-500 ng/mL kalıntı seviyesinde MRL (10 ng/mL) üzerinde olan örnekler, matriks etkisinin sonuca ağır etkileri olmadan analiz edilebilirler (Ho Kim ve ark. 2003). Dedeksiyon tekniklerindeki avantajlara rağmen, antibiyotiklerin hayvansal dokularda tespitindeki temel problem, matriste yüksek miktarda bulunan yağ ve proteinle antibiyotik etkileşmesinin HPLC-MS analizini etkilemesidir (Abdallah ve ark. 2014).

Sütte bulunan sulfonamid bileşikleri, sütün özütlenerek analize hazır hale getirilmelidir. Çünkü süt matriksinin içerisinde bulunan yağlar, proteinler, enzimler, laktoz nedeniyle günümüz teknolojisinde doğrudan sütün hassas sulfonamid bileşiklerinin tayin edilmesi mümkün değildir. Bu amaç doğrultusunda QuEChERS, C18 SPE ekstraksiyon, sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. Geri kazanımı en iyi olan ekstraksiyon yöntemi ile metod geliştirilmiştir. Ekstraksiyonunda, kütle transfer sıvısı (ekstraksiyon sıvısı) olarak asetonitril ve etil asetat denenmiş ve geri kazanımlara bakılarak asetonitril-etilasetat karışımı (AcCN:EA) 6:4 en iyi ekstraksiyon çözeltisi olarak bulunmuştur.

Bu ekstraksiyon tekniği aşağıda özetlenmiştir;

- Ekstraksiyon yöntemi olarak Cai ve ark. (2008) tarafından yapılmış olan çalışma modifiye edildi.
- 5 mL süte doğal ve izotop sulfonamid bileşikleri eklendi.
- Bu karışıma 10 mL 6:4 oranında AcCN:EA eklendi (protein çöktürme basamağı).

- Bu çözelti, kütle transferi için 1-2 dk vortekslenerek karıştırıldı (protein çöktürme basamağı).
- Karışım, 10.000 rpm’de 10 dk santrifüjlendi (protein çöktürme basamağı).
- Üst fazdan (bu faz, AcCN:EA fazıdır. Bu fazda protein miktarı oldukça mikronize olmuştur.) 6 mL alınarak azot altında AcCN:EA uçuruldu.
- Tamamen kurutulmuş tüpe 1,5 mL hekzan ilave edildi (yağ uzaklaştırma basamağı).
- Bu çözelti vortekslendi (yağ uzaklaştırma basamağı).
- Sonra üzerine 1,5 mL % 10 MeOH’lü su ilave edildi (temizleme-cleanup basamağı).
- Çözelti vortekslendi (temizleme-cleanup basamağı). Bu durumda çözelti bifazik olur (temizleme-cleanup basamağı).
- Alt fazdan 1 mL alınarak santrifüj edildi ve üst fazdan 500 µL alınarak viale konuldu.
- Vialdeki örnek LC-MS/MS’de analiz edildi.

Sütte sülfonamid analizinin en kritik noktası ekstraksiyon yönteminin belirlenmesidir. Çünkü analiz yönteminin, doğruluğunu, kesinliğini, düşük belirsizliğini, yüksek tekrarlanabilirliğini belirleyen en önemli aşamalardan birisi ekstraksiyondur. 9 aylık süreç boyunca pek çok ekstraksiyon metodu denenmiş olup ilgili bilgileri ileriki konularda ayrıntılı olarak verilecektir. Bunlardan %91-114 geri kazanıma sahip olan modifiye sıvı-sıvı ekstraksiyonu sütte sülfonamid analiz metodu geçerli kılma çalışmasının ekstraksiyon yöntemi olarak kabul edilmiştir. Bu kabulün nedeni, metodun geri kazanım değerinin, %80-120 aralığında olmasıdır.

4.1.5. Sülfonamidlerin etten ekstraksiyon çalışması

Biyolojik materyallerden (et, süt, meyve, sebze gibi) matriks etkisinin maksimum olması, matriks içeriğinin analiti baskılaması, bu içerikler (yağlar, karbonhidratlar, proteinler ve mineraller ve benzerleri) ile analitin moleküler etkileşmesi, analitin bu ortamda doğrudan tayinini engellemektedir (Abdallah ve ark. 2014). Bunun için ette birçok ekstraksiyon çalışması yapılarak (klasik çözücü özütleme yöntemleri ve basınçlandırılmış çözücü özütleme yöntemi) geri kazanımı en iyi olan ekstraksiyon yöntemi olarak katı sıvı ekstraksiyonu bulunmuş ve bu yöntemle metodu geçerli kılma adımları geliştirilmiştir.

Bu ekstraksiyon tekniği aşağıda sunulmuştur;

- 5 gr et numunesi alınıp, üzerine sũlfonamid doğal ve izotop karışımları eklendi.
- Bu karışıma 10 mL AcCN çözücüsü eklendi (protein çöktürme basamağı).
- Bu çözelti, kütle transferi için 1-2 dk vortekslenerek karıştırıldı (protein çöktürme basamağı).
- Karışım, 4°C’de 11400 rpm’de 10 dk santrifüjiendi (protein çöktürme basamağı).
- Üst fazdan (bu faz, AcCN fazıdır. Bu fazda protein miktarı oldukça mikronize olmuştur.) 6 mL alınarak azot altında AcCN uçuruldu.
- Tamamen kurutulmuş tüpe 1,5 mL hekzan ilave edildi (yağ uzaklaştırma basamağı).
- Bu çözelti vortekslendi (yağ uzaklaştırma basamağı).
- Sonra üzerine 1,5 mL % 20 MeOH’lü su ilave edildi (temizleme-clean up basamağı).
- Çözelti vortekslendi (temizleme-clean up basamağı). Bu durumda çözelti bifazik olur (temizleme-clean up basamağı).
- Alt fazdan 1 mL alınarak santrifüj edildi ve 500 µL alınarak viale konuldu.
- Vialdeki örnek LC-MS/MS’de analiz edildi.

Sütte olduğu gibi ette de sũlfonamid bileşiklerinin analizi sürecindeki en önemli basamak ekstraksiyon işlemidir. Dolayısıyla ekstraksiyon tekniğinin belirlenmesi işlemi kritiktir.

Bu bağlamda, ayrıntıları ileri ki konularda açıklanacak olup, denenen pek çok özütleme metodu sonucunda; bunlardan %82-116 geri kazanıma sahip olan modifiye katı-sıvı ekstraksiyonu ette sũlfonamid analiz metodu geçerli kılma çalışmasının ekstraksiyon yöntemi olarak belirlenmiştir. Bu kabulün nedeni, metodun geri kazanım değerinin, %80-120 aralığında olmasıdır.

4.2.Metot Geçerli Kılma ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplamaları

4.2.1.Sütte sũlfonamid tayininde metodun geçerli kılınması

4.2.1.1.Performans kriterleri

Metodun performans kriterleri başka bir deyişle metot geçerli kılma kabul kriterleri Çizelge 4.28’de verilmiştir. Her bir parametre için kabul kriterlerinin sağlanması dair açıklamalar parametrelere ait alt başlıklarda sunulmuştur. Bu kriterler, TÜBİTAK UME

Organik Kimya Laboratuvarı araştırmacıları tarafından kurum içi metot olarak oluşturulmuştur.

Çizelge 4.28 Sütte sülfonamid tayini metot geçerli kılma kabul kriterleri

Değişken	Kabul Kriteri
LOD ve LOQ	$LOQ \leq E_n$ düşük seviye kalibrasyon çözeltisinin derişimi olmalıdır.
Tekrarlanabilirlik	$RSD < \%15$ olmalıdır.
Ara Kesinlik	$RSD < \%15$ olmalıdır.
Gerçeklik / Geri Kazanım	$\% 80-120$ olmalıdır.
Doğrusal Aralık	$r^2 \geq 0,996$ olmalıdır.
Sağlamlık	t-testi ve F testi uygulandığında sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmamalıdır.
rnek Kararlığı	t-testi ve F testi uygulandığında sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmamalıdır.
Bağlı Genişletilmiş lm Belirsizliği	$U(x), \% \leq \%13$ olmalıdır.

Sütte sülfonamid tayininde metot geçerli kılma planı ise izelge 4.29’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.29 Sütte sülfonamid tayininde metot geçerli kılma planı

Değişken	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün	6. Gün
Tekrarlanabilirlik (gün içi ve günlerarası)	3 örneğe doğal 15 ppb, izotop 20 ppb (cihazda her biri 3 okuma)	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb (cihazda x 3 okuma)	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb (her biri 3 okuma)	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb (her biri 3 okuma)	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb (her biri 3 okuma)	
Geri kazanım	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb 3 örneğe doğal 40 ppb, izotop 20 ppb (tekrarlanabilirlik gün içi)					
LOD ve LOQ		LOD ve LOQ için doğal 10 ppb, izotop 20 ppb 5 örnek (her biri 3 okuma)	LOD ve LOQ için doğal 10 ppb, izotop 20 ppb 5 örnek (her biri 3 okuma)			
Sağlamlık				3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb: 10,2 mL AcCN:EA	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb: 5,1 mL süt	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb (1,7 mL hekzan)
Sağlamlık				3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb 9,8 mL AcCN: EA	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb: 4,9 mL süt	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb (1,3 mL hekzan)

4.2.1.2. Algılama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

LOD ve LOQ değerleri için standart sapmaya dayalı tespit üzerinden hesaplama yapılmıştır. Standart sapmaya dayalı tespit, kör örneğin standart sapmasına dayalı tespit yapılır. LOQ; kör örnek çok düşük derişimde analit içeriyorsa, kör örnekle yapılan 10 ölçümün standart sapmasının 10 katı alınarak hesaplanır. Kör örnek hiçbir şekilde analit içermiyorsa, kör örneğe algılama sınırına yakın derişimde analit ilave edilerek hazırlanan örnekle yapılan 10 ölçümün standart sapmasının 10 katı alınarak hesap yapılır. Kullanılan süt kör örneklerinde herhangi bir sülfonamid bileşiğine rastlanmamıştır. Buna bağlı olarak, kör örneğe 10 ppb doğal, 20 ppb izotop analit eklenerek 10 örnek 3'er defa okuma ile ölçülmüştür. 10 ölçüm sonucuna ait standart sapma, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Sütte tayin edilen 14 adet sülfonamid bileşiğine ait IDMS analiz yöntemi algılama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) Çizelge 4.30'da sunulmuştur.

Çizelge 4.30 Sütteki sülfonamid bileşiklerine ait IDMS analiz yöntemi LOD ve LOQ sonuçları

Analit	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Sülfamerazin	2,45	8,16
Sülfadiazin	2,38	7,93
Sülfisoksazol	2,19	7,30
Sülfametoksazol	2,56	8,53
Sülfatiazol	1,82	6,07
Sülfadimetoksin	2,74	9,13
Sülfapridin	2,28	7,61
Sülfametizol	2,66	8,87
Sülfadoksin	1,99	6,66
Sülfakloropridazin	2,41	8,05
Sülfafenazol	2,41	8,04
Sülfametazin	2,45	8,16
Sülfakuinoksalin	2,63	8,75
Sülfametoksipridazin	2,92	9,73

4.2.1.3. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik

Tekrarlanabilirlik ölçümleri için 15 ppb, 25 ppb ve 40 ppb seviyelerinde, her konsantrasyondan üçer örneğin LC-MS/MS cihazında üçer defa okuma yapılarak analizi yapılmıştır. Elde edilen örnekler tekrarlanabilirlik koşullarında analiz edilmiştir.

Ara kesinlik ölçümleri 5 farklı günde tekrarlanabilirlik ölçümlerinde olduğu gibi 25 ppb'lik 3 örneğin analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Analizlerden elde edilen ölçüm sonuçları tek yönlü ANOVA kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik ile ara kesinlik ölçüm sonuçları ve istatistiksel değerlendirmelere ait veriler Ek 1'de verilmiştir.

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik için bağıl standart sapma değerleri aşağıdaki eşitlikler (4.1 ve 4.2) kullanılarak hesaplanmıştır;

$$RSD_{\text{tekrarlanabilirlik}} = \frac{\sqrt{MS_{\text{gün içi}}}}{W_{\text{ortalama}}} \times 100 \quad (4.1)$$

$$RSD_{\text{ara kesinlik}} = \frac{\sqrt{MS_{\text{günler arası}} - MS_{\text{gün içi}}}}{W_{\text{ortalama}}} \times 100 \quad (4.2)$$

eşitlikte,

$MS_{\text{gün içi}}$: Gün içi ölçüm sonuçlarının karelerinin ortalaması;

$MS_{\text{günler arası}}$: Günler arası ölçüm sonuçlarının karelerinin ortalaması;

W: Analite ait ortalama kütle kesrini ifade etmektedir.

Elde edilen sütteki sülfonamid bileşiklerine ait IDMS analiz yöntemi tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçları Çizelge 4.31'de verilmiştir.

Çizelge 4.31 Sütteki sülfonamid bileşiklerine ait IDMS analiz yöntemi tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçları

Analit	%RSD_{tekrarlanabilirlik}	%RSD_{ara kesinlik}
Sülfamerazin	7,72	4,20
Sülfadiazin	5,72	2,88
Sülfisoksazol	6,41	7,33
Sülfametoksazol	7,50	8,65
Sülfatiazol	5,02	5,13
Sülfadimetoksin	3,73	14,25
Sülfapridin	6,70	3,40
Sülfametizol	7,08	2,85
Sülfadoksin	8,32	7,23
Sülfakloropridazin	8,31	11,68
Sülfafenazol	5,77	8,77
Sülfametazin	8,05	7,87
Sülfakuinoksalin	4,26	1,82
Sülfametoksipridazin	5,55	3,00

Sonuç olarak, Çizelge 4.31. incelendiğinde $RSD_{tekrarlanabilirlik}$ ve $RSD_{arakesinlik}$ değerleri metot performans kabul kriteri olarak belirlenen %15'den küçük olduğundan kriterin sağlandığı gözlenmiştir.

4.2.1.4. Gerçeklik/Geri kazanım

Gerçeklik ölçümlerinde piyasada aynı matrikse veya benzer matrikse sahip sertifikalı referans malzeme bulunmadığı için üçer adet (15 ppb, 25 ppb ve 40 ppb) sülfonamid bileşikleri ile standart ekleme yoluyla matriks örnek ve kör örnek bağımsız olarak hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Bu koşullarda geri kazanım hesaplaması (4.3) aşağıdaki eşitlik kullanılarak yapılmıştır.

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{W_{\text{ölçülen}}}{W_{\text{eklenen}}} \times 100 \quad (4.3)$$

Bu eşitlikte,

$W_{\text{ölçülen}}$: Standart ekleme yapılan örnek (spiked) ile ekleme yapılmayan örnek (blank) ölçüm sonuçları arasındaki fark, (ng/g)

W_{eklenen} : Eklenen analit miktarı, (ng/g)

Elde edilen % geri kazanım değerlerinin ortalaması Çizelge 4.32’de verilmiştir.

Çizelge 4.32 Sütteki sülfonamit bileşiklerine ait geri kazanım sonuçları

Analit	Geri kazanım (%)		
	15 ng/g	25 ng/g	40 ng/g
Sülfamerazin	104,15	101,77	109,75
Sülfadiazin	108,66	104,72	106,21
Sülfisoksazol	105,02	97,10	94,61
Sülfametoksazol	100,57	99,07	102,03
Sülfatiazol	107,73	98,95	96,37
Sülfadimetoksin	110,33	101,30	102,00
Sülfapridin	109,94	103,03	101,58
Sülfametizol	99,28	95,53	94,13
Sülfadoksin	113,86	108,00	112,78
Sülfakloropridazin	102,22	96,24	98,13
Sülfafenazol	108,38	96,02	93,07
Sülfametazin	99,99	98,58	90,85
Sülfakuinoksalin	103,04	98,85	96,75
Sülfametoksipridazin	102,36	98,31	93,94

Standart ekleme yapılmış örnekleri kullanılarak yapılan geri kazanım çalışmasına ait tüm % geri kazanım sonuçları Ek 2’te verilmiştir. Sonuç olarak, Çizelge 4.32. incelendiğinde geri kazanım değerleri metot performans kabul kriteri olarak belirlenen % 80-120 aralığında olduğundan kriterin sağlandığı gözlenmiştir.

4.2.1.5.Doğrusallık ve çalışma aralığının oluşturulması

Metodun doğrusal aralığı (analit 1: sülfamerazin, analit 2: sülfadiazin, analit 3: sülfisoksazol, analit 4: sülfametoksazol, analit 5: sülfatiazol, analit 6: sülfadimetoksin, analit 7: sülfapridin, analit 8: sülfametizol, analit 9: sülfadoksin, analit 10: sülfakloropridazin, analit 11: sülfafenazol, analit 12: sülfametazin, analit 13: sülfakuinoksalin, analit 14: sülfametoksipridazin) kütle kesirleri sırasıyla 10; 15; 20; 30; 40; 50 (µg/kg) aralığını kapsayacak şekilde altı noktalı kalibrasyon grafiği kullanılarak test edilmiştir. Eğrinin şeklinin ve eğimlerinin gözlemlenmesi için her bir analit için bir kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon katsayıları Çizelge 4.33’te verilmiştir.

Çizelge 4.33 Sütteki 14 adet sülfonamid bileşiğinin kalibrasyon eğrisine ait regresyon katsayıları

Sülfonamidler	Regresyon katsayısı (R ²)
Sülfamerazin	0,996
Sülfadiazin	0,997
Sülfisoksazol	0,999
Sülfametoksazol	0,996
Sülfatiazol	0,996
Sülfadimetoksin	0,996
Sülfapridin	0,996
Sülfametizol	0,999
Sülfadoksin	0,997
Sülfakloropridazin	0,998
Sülfafenazol	0,998
Sülfametazin	0,996
Sülfakuinoksalin	0,996
Sülfametoksipridazin	0,996

Sonuç olarak, Çizelge 4.33'te görüleceği üzere, her bir analit için çizilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon katsayıları (R^2 değerleri) metot performans kabul kriteri olarak belirlenen $r^2 \geq 0,996$ kriterini sağlamıştır.

4.2.1.6.Sağlamlık

Metodun sağlamlığının test edilmesi amacıyla, metodun kritik basamaklarında ufak değişimler yapılarak metot uygulanmış ve örnekler analiz edilmiştir. Uygulanan metodun en kritik basamağı ekstraksiyondur. Uygulanan metodun sağlamlığının test edilmesi için metodun bazı basamaklarındaki bazı parametreler sabit tutularak bir parametre değiştirilmiş ve metot uygulanmıştır. Metodun uygulanması sonucu elde edilen örnekler analiz edilmiştir. Metodun basamaklarında sabit tutulan ve değiştirilen parametreler Çizelge 4.34'te verilmiştir.

Çizelge 4.34 Metodun basamaklarında sabit tutulan ve değiştirilen parametreler

Çözücü (AcCN:EA) miktar değişimi	Matriks (süt) miktar değişimi	Çözücü (hekzan) miktar değişimi
3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb, 10,2 mL AcCN:EA	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb, 5,1 mL süt	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb, 1,7 mL hekzan
3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb, 9,8 mL AcCN: EA	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb, 4,9 mL süt	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb, 1,3 mL hekzan

ACN: Asetonitril, EA: Etilasetat

Her bir parametre ve parametre değişim değeri için hazırlanan örnek çözeltileri bağımsız üçer örnek hazırlama sonrasında elde edilmiştir. Ölçüm sonuçları arasındaki anlamlı bir farkın varlığını sorgulamak için t-testi; sonuçların kesinliğini sorgulamak için F-testi uygulanarak ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen istatistiksel değerlendirme sonuçları Ek 3'te verilmiştir.

Sonuç olarak, Ek 3'te verilen istatistiksel değerlendirmeler incelendiğinde genellikle $t_{\text{deneysel}} \leq t_{\text{kritik}}$ olduğundan metodun kritik basamaklarında yapılan küçük değişiklikler ölçüm sonuçları arasında anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. Ayrıca $F_{\text{deneysel}} \leq F_{\text{kritik}}$ olduğundan

sonuçların kesinliği arasında da anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu sonuç metot performans kriterini sağlamaktadır.

4.2.2.Sütte ölçüm belirsizliği hesaplamaları

Ölçüm belirsizliği EURACHEM/CITAC (Anonim 2012b) Analitik Kimyada Belirsizlik Hesaplanması Kılavuzuna ve ISO Ölçüm Belirsizliği Açıklama Kılavuzuna (GUM) (Anonim 2008b) göre hesaplanmıştır. Ölçüm belirsizliğini hesaplamada metodun geçerli kılınması yaklaşımı kullanılmıştır.

Ölçüm belirsizliği hesaplamasında aşağıdaki verilen eşitlik (4.4) kullanılarak hesaplama yapılmıştır;

$$U = k \sqrt{\frac{u_{\text{tekrarlanabilirlik}}^2}{n_{\text{tekrar}}} + \frac{u_{\text{ara kesinlik}}^2}{n_{\text{gün sayı}}^2} + u_{\text{gerçeklik}}^2 + u_{\text{kal}}^2} \quad (4.4)$$

Burada;

U : Genişletilmiş belirsizlik

k : Kapsam faktörü = 2 (% 95 güvenirlilik seviyesi)

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$: Tekrarlanabilirlikten kaynaklanan ölçüm belirsizliği

$u_{\text{ara kesinlik}}$: Ara kesinlikten kaynaklanan ölçüm belirsizliği

$u_{\text{gerçeklik}}$: Geri kazanım/gerçeklikten kaynaklanan ölçüm belirsizliği

u_{kal} : Kalibrasyondan kaynaklanan ölçüm belirsizliği

n_{tekrar} : Tekrar sayısı

$n_{\text{gün sayı}}$: Gün sayısı

Sütteki 14 adet sülfonamid bileşiklerinin belirsizlik hesaplamalarına ait sonuçlar Çizelge 4.35'te verilmiştir.

Çizelge 4.35 Sütteki 14 adet sulfonamid bileşiklerinin belirsizlik hesaplamaları

	SMR	SDZ	SIX	SMX	STZ	SDM	SP	SMT	SDO	SCP	SNZ	SMZ	SQX	SMP
U_{kal}	0,45	0,52	0,26	0,45	0,44	0,19	0,43	0,19	0,37	0,23	0,36	0,29	0,43	0,40
U_{tekrarlanabilirlik}	1,51	1,09	1,20	1,40	0,91	0,72	1,29	1,31	1,61	1,52	1,06	1,51	0,78	1,04
U_{ara kesinlik}	0,27	0,18	0,46	0,54	0,31	0,92	0,22	0,18	0,47	0,71	0,54	0,49	0,11	0,19
U_{gerçeklik}	0,89	0,64	0,74	0,87	0,56	0,71	0,75	0,77	0,97	0,97	0,68	0,92	0,45	0,61
u(x), %⁽¹⁾	5,73	4,75	4,84	5,94	4,29	4,52	5,07	4,88	6,12	6,36	4,79	5,92	3,73	4,34
U(x), %⁽²⁾	11,45	9,50	9,67	11,87	8,59	9,04	10,14	9,77	12,25	12,71	9,59	11,84	7,46	8,67

⁽¹⁾Bağıl standart ölçüm belirsizliği, ⁽²⁾ Bağıl birleştirilmiş standart ölçüm belirsizliği

Sonuç olarak, tüm analitler için hedef ölçüm belirsizliği değeri $k = 2$ (% 95 güvenirlilik seviyesinde) % 13'den küçüktür. Dolayısıyla metodun performans kabul kriteri karşılanmaktadır.

4.2.3. Ette Sülfonamid Tayininde Metodun Geçerli Kılınması

4.2.3.1. Performans kriterleri

Metodun performans kriterleri başka bir deyişle metot geçerli kılma kabul kriterleri Çizelge 4.36'da verilmiştir. Her bir parametre için kabul kriterlerinin sağlanmasına dair açıklamalar parametrelere ait alt başlıklarda sunulmuştur. Metot geçerli kılma planı Çizelge 4.37'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.36 Ette 12 adet sülfonamidin tayin metodunu geçerli kılma kabul kriterleri

Değişken	Kabul Kriteri
LOD ve LOQ	$LOQ \leq$ En düşük seviye kalibrasyon çözeltisinin derişimi olmalıdır.
Tekrarlanabilirlik	$RSD < \%15$ olmalıdır.
Ara Kesinlik	$RSD < \%15$ olmalıdır.
Gerçeklik/Geri Kazanım	% 80-120 olmalıdır.
Doğrusal Aralık	$r^2 \geq 0,995$ olmalıdır.
Sağlamlık	t-testi ve F testi uygulandığında sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmamalıdır.
Örnek Kararlılığı	t-testi ve F testi uygulandığında sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmamalıdır.
Bağıl Genişletilmiş Ölçüm Belirsizliği	$U(x), \% \leq \%14$ olmalıdır.

Çizelge 4.37 Ette sülfonamid tayininde metot geçerli kılma planı

	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün	6. Gün
Tekrarlanabilirlik (gün içi ve günler arası)	3 örneğe doğal 15 ppb, izotop 20 ppb (cihazda her biri 3 okuma) 3 örneğe doğal 25 ppb, IS 20 ppb 3 örneğe doğal 40 ppb, izotop 20 ppb (tekrarlanabilirlik gün içi)	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb (cihazda x3 okuma)	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb (her biri 3 okuma)	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb (her biri 3 okuma)	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb (her biri 3 okuma)	
LOD ve LOQ		LOD ve LOQ için doğal 10 ppb, izotop 20 ppb 5 örnek (her biri 3 okuma)	LOD ve LOQ için doğal 10 ppb, izotop 20 ppb 5 örnek (her biri 3 okuma)			
Sağlamlık				3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb : 10,2 mL AcCN	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb: 5,5 g et	3 örneğe 25 ppb doğal , izotop 20 ppb (1,7 mL hekzan)
Sağlamlık				3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb 9,8 mL AcCN	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb: 4,5 g et	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb (1,3 mL hekzan)

Et örneğinin hazırlanması şu şekilde gerçekleştirildi; 5 g et alındı. Üzerine doğal ve izotop sülfonamidler eklendi. Karışımın homojenize olması, matriksle fiziksel veya kimyasal etkileşebilmesi için bir süre bekletildi. Sonra et üzerine 10 mL AcCN ilave edildi. Bu çözelti 1-2 dk vortekslendi. Sonra 4°C’de 11400 rpm’de 10 dk santrifüjlendi. Üst fazdan 6 mL alınarak azot altında uçuruldu. Tamamen kurutulmuş tüpe 1,5 mL hekzan ilave edildi. Bu çözelti vortekslendi. Sonra üzerine 1,5 mL % 20 MeOH’lü su ilave edildi. Çözelti vortekslendi. Çözelti bifazik oldu. Alt fazdan 1 mL alınarak santrifüj edildi ve üstten 500 µL alınarak LC-MS/MS’de analiz edildi.

4.2.3.2. Algılama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

LOD ve LOQ değerleri için standart sapmaya dayalı tespit üzerinden hesaplama yapılmıştır. Standart sapmaya dayalı tespit, kör örneğin standart sapmasına dayalı tespit yapılır. LOQ eğer kör örnek çok düşük derişimde analit içeriyorsa, kör örnekle yapılan 10 ölçümün standart sapmasının 10 katı alınarak hesaplanır. Kör örnek hiçbir şekilde analit içermiyorsa, kör örneğe algılama sınırına yakın derişimde analit ilave edilerek hazırlanan örnekle yapılan 10 ölçümün standart sapmasının 10 katı alınarak hesap yapılır. Kullanılan et kör örneklerinde herhangi bir sülfonamid bileşiğine rastlanmamıştır. Buna bağlı olarak, kör örneğe 10 ppb doğal, 20 ppb izotop analit eklenerek 10 örnek 3’er defa okuma ile ölçülmüştür. 10 ölçüm sonucuna ait standart sapma, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama için aşağıdaki eşitlikler (4.5, 4.6) kullanılmıştır:

$$LOD = 3 \times SD \quad (4.5)$$

$$LOQ = 10 \times SD \quad (4.6)$$

Bu eşitlikte,

SD: Sülfonamid bileşiklerinin standart sapmasını ifade etmektedir.

Sonuç olarak, Çizelge 4.38 incelendiğinde ette sülfonamid bileşiklerinin LOD ve LOQ değerleri sunulmaktadır. Bu durumda metot performans kabul kriterinin sağlandığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.38 Ette 12 adet sülfonamit bileşiklerine ait LOD ve LOQ sonuçları

Analit	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Sülfamerazin	2,84	9,46
Sülfadiazin	2,87	9,55
Sülfisoksazol	2,09	6,95
Sülfametoksazol	2,68	8,92
Sülfatiazol	2,98	9,96
Sülfapridin	2,66	8,85
Sülfametizol	2,66	8,85
Sülfadoksin	2,53	8,42
Sülfakloropridazin	2,05	6,82
Sülfametazin	2,37	7,89
Sülfakuinoksalin	2,42	8,06
Sülfametoksipridazin	2,99	9,96

4.2.3.3. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik

Tekrarlanabilirlik ölçümleri için 3 alt örnek çözeltisinin tek bir çalışmada analizi yapılmıştır. Analizlerde 3 alt örnek hazırlama işlemi yapılmıştır. Alt örnek çözeltileri bağımsız 3 örnek hazırlama (ekstraksiyon ve saflaştırma) sonrasında elde edilmiştir. Elde edilen örnekler tekrarlanabilirlik koşullarında analiz edilmiştir.

Ara kesinlik ölçümleri 5 farklı günde tekrarlanabilirlik ölçümlerinde olduğu gibi üçer alt örneğin analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Analizlerden elde edilen ölçüm sonuçları tek yönlü ANOVA kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik ile ara kesinlik ölçüm sonuçları ve istatistiksel değerlendirmelere ait veriler Ek 4’de verilmiştir.

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik için bağıl standart sapma değerleri aşağıdaki eşitlikler (4.7 ve 4.8) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$RSD_{\text{tekrarlanabilirlik}} = \frac{\sqrt{MS_{\text{gün içi}}}}{W_{\text{ortalama}}} \times 100 \quad (4.7)$$

$$RSD_{\text{ara kesinlik}} = \frac{\sqrt{MS_{\text{günler arası}} - MS_{\text{gün içi}}}}{W_{\text{ortalama}}} \times 100 \quad (4.8)$$

eşitlikte,

$MS_{\text{gün içi}}$: Gün içi ölçüm sonuçlarının karelerinin ortalaması;

$MS_{\text{günler arası}}$: Günler arası ölçüm sonuçlarının karelerinin ortalaması;

W: Analite ait ortalama kütle kesrini ifade etmektedir.

Elde edilen ette 12 adet sülfonamit bileşiklerine ait tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçları Çizelge 4.39’da verilmiştir.

Çizelge 4.39 Ette 12 adet sülfonamit bileşiklerine ait tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçları

Analit	%RSD _{tekrarlanabilirlik}	%RSD _{ara kesinlik}
Sülfamerazin	8,19	5,05
Sülfadiazin	2,87	9,55
Sülfisoksazol	2,09	6,95
Sülfametoksazol	2,68	8,92
Sülfatiazol	4,51	1,44
Sülfapridin	5,99	3,53
Sülfametizol	6,11	2,39
Sülfadoksin	7,83	2,10
Sülfakloropridazin	7,54	4,38
Sülfametazin	8,64	5,11
Sülfakuinoksalin	9,88	1,0
Sülfametoksipridazin	7,81	4,31

Sonuç olarak, Çizelge 4.39 incelendiğinde $RSD_{\text{tekrarlanabilirlik}}$ ve $RSD_{\text{arakesinlik}}$ değerleri metot performans kabul kriteri olarak belirlenen %15'den küçük olduğundan kriterin sağlandığı gözlenmiştir.

4.2.3.4. Gerçeklik/Geri kazanım

Gerçeklik ölçümlerinde piyasada aynı matrikse veya benzer matrikse sahip sertifikalı referans malzeme bulunmadığı için üçer adet (15 ppb, 25 ppb ve 40 ppb) sülfonamid bileşikleri ile standart eklenmiş matriks örnek ve blank örnek bağımsız olarak hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

Bu koşullarda geri kazanım hesaplaması aşağıdaki eşitlik (4.9) kullanılarak yapılmıştır:

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{W_{\text{ölçülen}}}{W_{\text{eklenen}}} \times 100 \quad (4.9)$$

Bu eşitlikte,

$W_{\text{ölçülen}}$: Ekleme yapılan örnek (spiked) ile ekleme yapılmayan örnek (blank) ölçüm sonuçları arasındaki fark, (ng/g)

W_{eklenen} : Eklenen analit miktarı, (ng/g)

Ette elde edilen 12 adet sülfonamid bileşiklerine ait geri kazanım sonuçları Çizelge 4.40'ta verilmiştir.

Çizelge 4.40 Ette 12 adet sülfonamid bileşiklerine ait geri kazanım sonuçları

Analit	Ortalama geri kazanım (%)		
	15 ng/g	25 ng/g	40 ng/g
Sülfamerazin	82,98	82,93	82,30
Sülfadiazin	88,01	115,79	90,60
Sülfisoksazol	90,49	93,22	97,30
Sülfametoksazol	86,38	93,87	94,66
Sülfatiazol	89,20	94,46	99,52
Sülfapridin	108,92	104,57	104,47
Sülfametizol	87,88	95,88	94,45
Sülfadoksin	96,89	100,94	113,7
Sülfakloropridazin	94,37	97,00	104,7
Sülfametazin	112,79	105,88	101,15
Sülfakuinoksalin	96,52	96,19	96,35
Sülfametoksihidridazin	86,45	93,77	92,65

Standart eklenmiş örnekleri kullanılarak yapılan geri kazanım çalışmasına ait tüm % geri kazanım sonuçları Ek 5’de verilmiştir.

Sonuç olarak; Çizelge 4.40 incelendiğinde geri kazanım değerleri metot performans kabul kriteri olarak belirlenen % 80-120 aralığında olduğundan kriterin sağlandığı gözlenmiştir.

4.2.3.5. Doğrusallık ve çalışma aralığının oluşturulması

Metodun doğrusal aralığı (analit 1: sülfamerazin, analit 2: sülfadiazin, analit 3: sülfisoksazol, analit 4: sülfametoksazol, analit 5: sülfatiazol, analit 6: sülfapridin, analit 7: sülfametizol, analit 8: sülfadoksin, analit 9: sülfakloropridazin, analit 10: sülfametazin, analit 11: sülfakuinoksalin, analit 12: sülfametoksihidridazin) kütle kesirleri sırasıyla 10; 15; 20; 30; 40; 50 (µg/kg) aralığını kapsayacak şekilde altı noktalı kalibrasyon grafiği kullanılarak test edilmiştir. Eğrinin şeklinin ve eğimlerinin gözlemlenmesi için her bir analit için 1 kalibrasyon grafiği

hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon katsayıları Çizelge 4.41’de verilmiştir.

Çizelge 4.41 Ette 12 adet sülfonamid bileşiklerinin kalibrasyon eğrilerine ait regresyon katsayıları

Sülfonamidler	Regresyon katsayısı (r^2)
Sülfamerazin	0,998
Sülfadiazin	0,995
Sülfisoksazol	0,996
Sülfametoksazol	0,996
Sülfatiazol	0,997
Sülfapridin	0,998
Sülfametizol	0,999
Sülfadoksin	0,996
Sülfakloropridazin	0,996
Sülfametazin	0,997
Sülfakuinoksalin	0,997
Sülfametoksipridazin	0,995

Sonuç olarak, Çizelge 4.41’den de görüleceği üzere her bir analit için çizilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon katsayıları (R^2 değerleri) metot performans kabul kriteri olarak belirlenen $R^2 \geq 0,995$ kriterini sağlamıştır.

4.2.3.6.Sağlamlık

Metodun sağlamlığının test edilmesi amacıyla, metodun kritik basamaklarında ufak değişimler yapılarak metot uygulanmış ve örnekler analiz edilmiştir. Uygulanan metodun en kritik basamağı ekstraksiyondur. Uygulanan metodun sağlamlığının test edilmesi için metodun bazı basamaklarındaki bazı parametreler sabit tutularak bir parametre değiştirilmiş ve metot uygulanmıştır. Metodun uygulanması sonucu elde edilen örnekler analiz edilmiştir.

Metodun basamaklarında sabit tutulan ve değiştirilen parametreler Çizelge 4,42’de verilmiştir.

Çizelge 4.42 Metodun basamaklarında sabit tutulan ve değiştirilen parametreler

Çözücü (ACN) miktar değişimi	Matriks (et) miktar değişimi	Çözücü (hekzan) miktar değişimi
3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb, 10,2 mL AcCN	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb, 5,5 g et	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb, 1,7 mL hekzan
3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb, 9,8 mL AcCN	3 örneğe 25 ppb doğal, izotop 20 ppb: 4,5 g et	3 örneğe doğal 25 ppb, izotop 20 ppb, 1,3 mL hekzan

AcCN:Asetonitril

Her bir parametre ve parametre değişim değeri için hazırlanan örnek çözeltileri bağımsız üçer örnek hazırlama sonrasında elde edilmiştir. Ölçüm sonuçları arasındaki anlamlı bir farkın varlığını sorgulamak için t-testi; sonuçların kesinliğini sorgulamak için F-testi uygulanarak ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen istatistiksel değerlendirme sonuçları Ek 6'da verilmiştir. Sonuç olarak, Ek 6'da verilen istatistiksel değerlendirmeler incelendiğinde, genellikle $t_{\text{deneysel}} \leq t_{\text{kritik}}$ olduğundan metodun kritik basamaklarında yapılan küçük değişiklikler ölçüm sonuçları arasında anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. Ayrıca $F_{\text{deneysel}} \leq F_{\text{kritik}}$ olduğundan sonuçların kesinliği arasında da anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu sonuç metod performans kriterini sağlamaktadır.

4.2.4. Ette ölçüm belirsizliği hesaplamaları

Ölçüm belirsizliği EURACHEM/CITAC (Anonim 2012b) Analitik Kimyada Belirsizlik Hesaplanması Kılavuzuna, ISO Ölçüm Belirsizliği Açıklama Kılavuzuna (GUM) (Anonim 2008b) göre hesaplanmıştır. Ölçüm belirsizliğini hesaplamada metodun geçerli kılınması yaklaşımı kullanılmıştır. Ölçüm belirsizliği hesaplamasında aşağıdaki verilen eşitlik (4.10) kullanılarak hesaplama yapılmıştır.

$$U = k \sqrt{\frac{u_{\text{tekrarlanabilirlik}}^2}{n_{\text{tekrar}}} + \frac{u_{\text{ara kesinlik}}^2}{n_{\text{günsayısı}}} + u_{\text{gerçeklik}}^2 + u_{\text{kal}}^2} \quad (4.10)$$

Burada;

U : Genişletilmiş belirsizlik

k : Kapsam faktörü = 2 (% 95 güvenirlilik seviyesi)

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$: Tekrarlanabilirlikten kaynaklanan ölçüm belirsizliği

$u_{\text{ara kesinlik}}$: Ara kesinlikten kaynaklanan ölçüm belirsizliği

$u_{\text{gerçeklik}}$: Geri kazanım/gerçeklikten kaynaklanan ölçüm belirsizliği

u_{kal} : Kalibrasyondan kaynaklanan ölçüm belirsizliği

n_{tekrar} : Tekrar sayısı

$n_{\text{gün sayısı}}$: Gün sayısı

Ette 12 adet sulfonamid bileşiğine ait belirsizlik hesaplamalarına ait sonuçlar Çizelge 4.43’de verilmiştir.

Çizelge 4.43 Ette 12 adet sulfonamid bileşiğine ait belirsizlik hesaplamaları

	SMR	SDZ	SIX	SMX	STZ	SP	SMT	SDO	SCP	SMZ	SQX	SMP
u_{kal}	0,45	0,45	0,39	0,65	0,43	0,41	0,20	0,45	0,49	0,61	0,43	0,68
$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	1,54	1,71	1,57	1,54	0,96	1,31	1,30	1,79	1,62	1,93	2,06	1,50
$u_{\text{ara kesinlik}}$	0,32	0,39	0,20	0,08	0,03	0,09	0,17	0,16	0,31	0,13	0,07	0,28
$u_{\text{gerçeklik}}$	0,87	0,96	0,90	0,89	0,55	0,73	0,74	1,03	0,91	1,08	1,19	0,85
$u(x), \%^{(1)}$	3,71	3,75	3,14	3,89	3,59	4,33	2,28	3,28	3,46	3,97	3,88	6,28
$U(x), \%^{(2)}$	11,86	12,23	10,63	11,40	7,19	8,66	8,35	11,13	10,97	12,5	13,79	12,56

⁽¹⁾Bağıl standart ölçüm belirsizliği, ⁽²⁾ Bağıl birleştirilmiş standart ölçüm belirsizliği

Sonuç olarak, tüm analitler için hedef ölçüm belirsizliği değeri $k = 2$ (%95 güvenirlilik seviyesinde) % 14’den küçüktür dolayısıyla metodun performans kabul kriteri karşılanmaktadır.

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1.Ette ve Sütte LC/MS-MS Analiz Parametrelerinin Optimizasyonu

Tayin edilen 14 adet sülfonamid bileşiği ve bu bileşiklerin 14 adet izotopu farklı matrikslerde (süt ve et) olsa da enjeksiyona metanol medyasından transfer edildiği için LC-MS/MS kromatografik yöntemi aynıdır.

Çalışılan metotta kullanılan kromatografik yöntem oluşturulmadan önce Çizelge 3.1’de sunulan mobil faz oranı, sıcaklık ve mobil faz hızı seçildi. Bu seçimde; bileşiklere ait piklerin ayrımının muntazam olması, pik şekillerinin Gauss eğrisi biçiminde olması, sinyal/gürültü oranlarının uygun olması, matriks etkisinin gözlemlenmesi, çözünürlük, yakalama zamanı ve ana iyon molekül ağırlığı, mobil faz karışım oranları/oranlardaki değişim, mobil faz akış hızı parametreleri etkin oldu.

Kalitatif ve kantitatif analizlerde, cihaza ait MS bölümünde bileşiklerin doğru tayin edilebilmesi için ana iyonların analiz edilebilmesi gerekmektedir. Bu gereklilik kapiler voltajı ve çarpışma enerjisi ile sağlanır. Bu voltaj değerleri, süt ve et matriksleri için Çizelge 5.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1 Doğal ve izotop sülfonamid bileşikleri için LC-MS/MS optimum koşulları

Sülfonamidler	Ana İyon	Kantitatif	Kapiler (eV)	Çarpışma Enerjisi (eV)	Yakalanma Zamanı (dk)	Mobil Faz A	Mobil Faz B	Akış Programı		
								%A	%B	Akış hızı (µL/dk)
Sülfamerazin	265	156	80	20	13,172	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfadiazin	251	156	80	15	11,349	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
Sülfisoksazol	268	156	80	10	17,335	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
								65	35	400
Sülfametoksazol	254	156	80	18	16,681	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
								65	35	400

Çizelge 5.1'in devamı

Sülfonamidler	Ana İyon	Kantitatif	Kapiler (eV)	Çarpışma Enerjisi (eV)	Yakalanma Zamanı (dk)	Mobil Faz A	Mobil Faz B	Akış Programı		
								%A	%B	Akış hızı (µL/dk)
Sülfatiazol	256	155,9	80	14	12,127	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfadimetoksin	311	156	100	20	19,048	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
								65	35	400
Sülfapridin	250	156	100	20	12,895	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	45	55	400
								95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
Sülfametizol	271	156	100	12	14,401	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	65	35	400
								95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
Sülfadoksin	311	156	100	18	16,305	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	65	35	400
								95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
Sülfakloropridazin	284,9	156	100	14	15,909	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	65	35	400
								95	5	400
								95	5	400
								85	15	400

Çizelge 5.1'in devamı

Sülfonamidler	Ana İyon	Kantitatif	Kapiler (eV)	Çarpışma Enerjisi (eV)	Yakalanma Zamanı (dk)	Mobil Faz A	Mobil Faz B	Akış Programı		
								%A	%B	Akış hızı (µL/dk)
Sülfafenazol	315	160	60	20	19,745	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
								65	35	400
								45	55	400
Sülfametazin	279	186	110	20	14,014	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfakuinoksalin	301	156	100	15	19,246	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
								65	35	400
								45	55	400
Sülfametoksidipridazin	281	155,9	100	17	14,434	% 5 ACN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 ACN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfafenazol ¹³ C ₆	321	158	60	22	19,746	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
								65	35	400
								45	55	400

Çizelge 5.1'in devamı

Sülfonamidler	Ana İyon	Kantitatif	Kapiler (eV)	Çarpışma Enerjisi (eV)	Yakalanma Zamanı (dk)	Mobil Faz A	Mobil Faz B	Akış Programı		
								%A	%B	Akış hızı (µL/dk)
Sülfakuinoksalin ¹³ C ₆	307	161,9	100	15	19,243	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
								65	35	400
								45	55	400
Sülfapridin ¹³ C ₆	256	113,9	100	16	12,135	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfametizol ¹³ C ₆	276,9	161,9	100	12	14,398	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfadimetoksin ¹³ C ₆	317	155,9	100	20	19,055	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
								65	35	400
Sulfadoksin d3	314	155,9	100	16	16,241	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
								65	35	400

Çizelge 5.1'in devamı

Sülfonamidler	Ana İyon	Kantitatif	Kapiler (eV)	Çarpışma Enerjisi (eV)	Yakalanma Zamanı (dk)	Mobil Faz A	Mobil Faz B	Akış Programı		
								%A	%B	Akış hızı (µL/dk)
Sulfametoksipridazin d3	284	128,9	100	16	14,391	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfadiazin d4	255	160	80	15	11,262	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfatiazol d4	260	160	80	14	12,039	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfametoksazol d4	258	160	80	16	16,630	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfamerazin d4	269	160	80	18	13,091	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
Sülfametazin d4	283	186	110	18	13,953	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400

Çizelge 5.1'in devamı

Sülfonamidler	Ana İyon	Kantitatif	Kapiler (eV)	Çarpışma Enerjisi (eV)	Yakalanma Zamanı (dk)	Mobil Faz A	Mobil Faz B	Akış Programı		
								%A	%B	Akış hızı (µL/dk)
Sülfisoksazol d4	272	160	80	13	17,279	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400
								65	35	400
Sulfakloropridazin d4	289	160	100	14	15,863	% 5 AcCN, % 0,1 formik asit içeren % 95 H ₂ O	% 95 AcCN, % 0,1 formik asit içeren %5 H ₂ O	95	5	400
								95	5	400
								85	15	400
								65	35	400

5.2.Örnek Hazırlama Metodu Optimizasyonu

5.2.1.Süt örneklerini hazırlama metodu optimizasyonu

Sütte çözünmüş olan sülfonamid bileşiklerinin doğrudan analizi pek mümkün değildir. Çünkü süt matriksinin içinde oldukça yapısal bileşen bulunmaktadır. Bu nedenle sülfonamid bileşiklerinin ekstrakte edilerek LC/MS-MS analizine hazır hale getirilmesi elzemdir. Bu gerek doğrultusunda QuEChERS, C18 SPE ekstraksiyon, sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. Geri kazanımı en iyi olan ekstraksiyon yöntemi ile metot geliştirilmiştir.

Geliştirilen yöntem bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemidir. Bu metot geliştirilirken dikkate alınan hususlar;

- Geri kazanımda yüksek verimi,
- Süreç kolaylığı,
- Maliyet minimizasyonu,
- Matriks etkisinin minimizasyonu,
- Kimyasal tedarik kolaylığıdır.

Aşağıda her bir ekstraksiyon tekniğine dair yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

5.2.1.1.Katı faz ekstraksiyonu çalışmaları

Katı faz ekstraksiyon (solid phase extraction, SPE) çalışmasında Agilent Publication 5990-3713EN yöntemi kullanılmıştır. Sütten sülfonamidlerin katı faz ekstraksiyonu prosedürü (Gonzalez ve ark. 2009) aşağıda açıklanmıştır.

Katı faz ekstraksiyon kartuşunun (Agilent SampliQ SCX) hazırlık aşaması şu şekildedir;

- 2 mL metanolde %0,1 formik asit çözeltisi ve ardından 2 mL suda %2 formik asit çözeltisi ile katı faz ekstraksiyon kartuşundan geçirilerek aktive edilir.
- 5 mL süt alınır. Örneğe 200 µL sülfonamid karışımı (doğal ve izotop) eklenir. Süte 5 mL AcCN eklenir, santrifüj edilir ve supernatant ortamdan çekilir. 5 mL supernatant, katı faz ekstraksiyon kartuşuna yüklenir.

Kartuş, vakum altında 1 dk kurutulur. Ardında kurutulan katı faz ekstraksiyon kartuşuna;

- 2 mL % 5 MeOH su içinde ile yıkama,
- 1 mL 0,5 M HCl asit ile yıkama,
- 2 mL % 20 MeOH suda ile yıkama,
- Kartuş tekrar vakum altında 3 dk kurutma,
- 2,5 mL metanolde % 5 amonyak çözeltisi ile yıkama ve elde edilen süzöntüyü azot altında kurutma,
- Kuru vial 1 mL çözücü (9:1 su: metanol) eklenerek, 5 dk vorteksleme, işlemleri uygulanır.

Sonra elde edilen sülfonamid çözeltisi LC-MS/MS’de analiz edilir. Geri kazanıma bakıldığında geri kazanımın % 50-60’dan az olduğu görülmüştür.

5.2.1.2.Sıvı-sıvı ekstraksiyonu

Sıvı sıvı ekstraksiyon çalışmasında Agilent 5990-0013EN kullanılmıştır. Sütten sülfonamidlerin sıvı-sıvı ekstraksiyonu prosedürü (Sun ve ark. 2012) aşağıda açıklanmıştır.

- 1 mL süt alınır, hem kör hem de örnek için üzerine 2 mL saf su eklenir.
- Örneğe 200 µL sülfonamid karışımı (doğal ve izotop) eklenir.
- Önce 5 mL AcCN sonra da 50 µL asetik asit eklenir.
- 2 g sodyum sülfat eklenir.
- 0,5 g sodyum klorid eklenir. 1-2 dk vortekslenir. Sonra çözelti 10000 rpm’de 22°C’de 15 dk santrifüj edildi.
- Üst tabakadan 4 mL alınır.
- Üst tabaka azot altında kurutulur.

Tamamen kurutulmuş santrifüj tüpüne 200 µL AcCN, 800 µL su ilave edildi. Bu çözelti vortekslenir. Vortekslenen çözelti 0,2 µm’lik filtreden geçirilir. Sonra elde edilen sülfonamid çözeltisi LC-MS/MS’de analiz edilir. Bu yöntemde geri kazanımın % 40-45’den az olduğu görülmüştür.

5.2.1.3.Modifiye QUECHERS metodu

Sütte modifiye QUECHERS metodu Parab ve Amritkar (2012)'ın çalışmasına göre denenmiştir. İçerisinde 40 ppb doğal ve 40 ppb izotop sülfonamid bileşikleri olan 10 mL süt örneğine aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

- 10 mL süt santrifüj tüpüne konulur.
- %1 asetik asit içeren 10 mL AcCN çözeltisi süte eklenir.
- Mevcut çözeltiye, 10 mL 0,1 M EDTA çözeltisi eklenir.
- Ardından, 4 g susuz magnezyum sülfat ve 1 g sodyum asetat eklenir.
- Süt örneği 1 dk vortekslenir.
- 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.
- Ardından üst fazdan, 2 mL örnek alınır. Bu örnek 0,2 µm'lik filtreden geçirilir.
- Bu çözeltiden alınan 1 mL örnek alınıp, 1 mL su ile seyreltilir.

Sonra elde edilen sülfonamid çözeltisi LC-MS/MS'de analiz edilir. Geri kazanımın % 30-%42'den az olduğu görülmüştür.

5.2.1.4.Modifiye sıvı-sıvı ekstraksiyonu

Sıvı sıvı ekstraksiyon çalışmasında Zengxuan Cai ve ark. (2008)'nın çalışması modifiye edilerek kullanılmıştır.

Sütten sülfonamidlerin modifiye sıvı sıvı ekstraksiyonu prosedürü şöyledir;

- 5 mL süt örneği alınır.
- Üzerine doğal ve izotop sülfonamid bileşikleri eklenir.
- Sonra süt üzerine 10 mL (AcCN:EA) (6:4) oranında ilave edilir.
- Bu çözelti 1-2 dk vortekslenir ve 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenir.
- Üst fazdan 6 mL alınarak çözücü azot altında uçurulur.
- Tamamen kurutulmuş tüpe 1,5 mL hekzan ilave edilir. Bu çözelti vortekslenir.
- Sonra üzerine 1,5 mL % 10 MeOH'lü su eklenir. Çözelti vortekslenir. Çözelti iki fazlı olur. Alt fazdan 1 mL alınarak santrifüj edilir ve santrifüj sonrası üst fazdan 500 µL alınır.

Bu çözelti, LC-MS/MS’de analiz edilir. Geri kazanımın %70-120 aralığında olduğu görülmüştür.

5.2.1.5. Metodun geri kazanımının irdelenmesi

25 ppb doğal ve 20 ppb izotop sülfonamid ile kontamine edilmiş 3 adet uzun ömürlü süt (UHT) numunesine yukarıda ifade edilen modifiye sıvı-sıvı ekstraksiyon metodu uygulanmıştır. Ayrıca 2 adet kör uzun ömürlü süt (UHT) numunesine yukarıda ifade edilen modifiye sıvı-sıvı ekstraksiyon metodu uygulanmış, ekstraksiyon sonrası özüte 25 ppb doğal ve 20 ppb izotop sülfonamid bileşikler eklenmiştir. Elde edilen özütler, LC-MS/MS cihazında analiz edilmiştir. Sonuçlar birbiriyle karşılaştırılmıştır. Geri kazanım aralığının, % 91-114 olduğu görülmüştür. Geri kazanım sonuçlarının, metod geçerli kılma geri kazanım kriterini (% 80-120) sağladığı görülmüştür.

Ekstraksiyonda ana amaç sülfonamid bileşiklerini yüksek verimle matriksten transfer edebilmektir. Bu hedef doğrultusunda, asetonitril kullanılarak örnekten sülfonamidler özütlenirken, proteinler çöktürülmektedir. Santrifüj vasıtasıyla çöken protein ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Etil asetat ise asetonitril ortamında sülfonamid bileşiklerini çekmek için kullanılan oldukça iyi bir sülfonamid bileşikler sıvı-sıvı özütleme ajanıdır. Ortamdaki yağ ise hekzan kullanılarak bertaraf edilir (Zengxuan Cai ve ark. 2008). Çünkü yağlar hekzan ile çok iyi çözünürken ortama % 10 metanollü su karışımı eklendiğinde yağ hekzan ile faz yaparak sülfonamid bileşiklerinden uzaklaşır ve sülfonamidler % 10 metanollü su karışım fazına geçer.

Ekstraksiyonunda, kütle transfer sıvısı (ekstraksiyon sıvısı) olarak asetonitril ve etil asetat denenmiş ve geri kazanımlara bakılarak etil asetat-asetonitril karışımı (AcCN:EA) 6:4 en iyi ekstraksiyon çözeltisi olarak bulunmuştur.

5.2.1.6. Matriks etkisinin incelenmesi

Ekstraksiyon çalışmasında geri kazanımların bu denli düşük olması nedeniyle matriksin etkisinin incelenmesine karar verildi. Öncelikle, matriks baskılamasını görmek için bir kör numuneye modifiye sıvı-sıvı özütleme metodu uygulandı. Özütleme sonrası oluşan % 10 metanollü su fazından 900 µL vial e alındı ve tartıldı. Üzerine 2000 ppb doğal sülfonamid karışımından 50 µL ve 2000 ppb izotop sülfonamid karışımından 50 µL eklendi. Başka bir vial e %10 MeOH çözeltisinden 900 µL konuldu. Üzerine 2000 ppb doğal sülfonamid karışımından 50

µL ve 2000 ppb izotop sülfonamid karışımından 50 µL eklendi. Her iki örnek LC-MS/MS cihazında analiz edildi.

Hazırlanan çözeltiler analiz edilerek, ana bileşen ve izotoplu bileşen arasındaki ilişkiyi gösteren yanıt faktörleri (RF) elde edildi (RF değeri 1,25-0,95 aralığında olmalıdır).

$$RF = A_{ABx} \times C_{ISx} / A_{ISx} \times C_{ABx}$$

RF: Yanıt faktörü

C_{ABx} : Ana bileşiğin derişimi (ng/g)

A_{ABx} : Ana bileşiğin kromatogramdaki pikin alanı

C_{ISx} : İzotop bileşiğin derişimi (ng/g)

A_{ISx} : İzotop bileşiğin kromatogramdaki pikin alanı

Çizelge 5.2’de yer alan RF yüzde oranlarının %100’e oldukça yakın olmasından dolayı matriks etkisinin oldukça düşük olduğu görüldü. Sonuç olarak kalibrasyonlar matriks eşleşmeli olarak yapıldı.

Çizelge 5.2 Matrikste ve çözücünde sülfonamid bileşiklerinin yanıt faktör yüzde oranları

MATRİKS		ÇÖZÜCÜ		Oran
Bileşikler	Yanıt faktör	Bileşikler	Yanıt faktör	%
Sülfatiazol	1,15E+00	sülfatiazol	1,16E+00	99
Sülfapridin	9,03E-01	sülfapridin	1,03E+00	88
Sülfametazin	9,79E-01	sülfametazin	1,08E+00	91
Sülfamerazin	8,64E-01	sülfamerazin	9,07E-01	95
Sülfadiazin	1,18E+00	sülfadiazin	1,06E+00	111
sülfadimetoksin	1,55E+00	sülfadimetoksin	1,49E+00	104
sülfametoksazol	8,19E-01	sülfametoksazol	7,91E-01	104
Sülfadoksin	8,82E-01	sülfadoksin	8,37E-01	105
Sülfisoksazol	1,21E+00	sülfisoksazol	1,18E+00	103
Sülfafenazol	5,96E-01	sülfafenazol	6,24E-01	96
sülfakuinoksalin	8,53E-01	sülfakuinoksalin	8,80E-01	97
sülfakloropridazin	1,16E+00	sülfakloropridazin	1,20E+00	97
Sülfametizol	9,17E-01	sülfametizol	8,93E-01	103
sülfametoksipridazin	1,67E+00	sülfametoksipridazin	1,64E+00	102

5.2.2.Et Örneklerini Hazırlama Metodu Optimizasyonu

Ette bulunan sülfonamid bileşiklerinin, etten özütlenerek analize hazır hale getirilmelidir. Çünkü et matriksinin içinde yağlar, proteinler, karbonhidratlar ve mineraller gibi yapısal madde varlığı nedeniyle günümüz teknolojisinde doğrudan etten hassas sülfonamid bileşiklerinin analizini yapmak mümkün değildir. Bu amaç doğrultusunda klasik çözücü ekstraksiyon yöntemi ve hızlandırılmış çözücü özütleme yöntemi uygulanmıştır. Geri kazanımı en iyi olan ekstraksiyon yöntemi ile metot geçerli kılma adımları geliştirilmiştir. En iyi ekstraksiyon çözücüsü olarak asetonitril bulunmuştur.

Aşağıda her bir ekstraksiyon tekniğine dair yapılan çalışmalar sunulmuştur;

5.2.2.1.Katı-sıvı özütleme

Yöntem 1.

5 g kıyma 50 mL'lik santrifüj tüpünde tartıldı. Üstüne 200 µL doğal ve izotop karışımı eklendi. Karışımın, yarım saat dengeye gelmesi beklendi. Sonra üzerine 5 mL su eklenerek vortekslendi ve 10 mL %1 asetik asit içeren asetonitril eklendi. Çözelti tekrar vortekslendi. Sonra üzerine 4 g sodyum sülfat eklendi. Ardından 1 g sodyum klorid eklendi. Çözelti tekrar vortekslendi. Çözelti, 4°C'de 11400 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Sonra çözeltinin üstteki 6 mL'lik kısım alındı. Bu faz, -18 °C'de 1 saat dinlendirildi. Sonra tekrar 4°C de 11400 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Sonra alınan üst kısım azot altında tamamen kurutuldu. Kuruyan örneğe 200 µL asetonitril ve 800 µL su eklendikten sonra 0,2 µm'lik filtreden geçirildi. LC-MS/MS cihazıyla analiz edildi. Geri kazanımın %25-30'in altında olduğu belirlendi.

Yöntem 2.

5 g kıyma 50 mL'lik santrifüj tüpünde tartıldı. Üstüne 200 µL doğal izotop karışımı eklendi. Karışımın, yarım saat dengeye gelmesi beklendi. Sonra üzerine 5 mL su eklenerek ultrasound cihazıyla karıştırıldı ve 10 mL %1 asetik asit içeren asetonitril eklendi. Çözelti tekrar ultrasound cihazıyla karıştırıldı. Sonra üzerine 4 g sodyum sülfat eklendi. Ardından 1 g sodyum klorid eklendi. Çözelti tekrar ultrasound cihazıyla karıştırıldı. Çözelti, 4 °C'de 11400 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Sonra çözeltinin üstteki 6 mL'lik kısım alındı. Bu faz, -18°C'de 1 saat dinlendirildi. Sonra tekrar 4°C'de 11400 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Sonra alınan üst kısım

azot altında tamamen kurutuldu. Kuruyan örneğe 200 µL asetonitril ve 800 µL su eklendikten sonra 0,2 µm'lik filtreden geçirildi. LC-MS/MS cihazıyla analiz edildi. Geri kazanımın %25-30 aralığında olduğu belirlendi.

Yöntem 3.

5 g kıyma 50 mL'lik santrifüj tüpünde tartıldı. Üstüne 200 µL doğal ve izotop karışımı eklendi. Karışımın, yarım saat dengeye gelmesi bekledi. Sonra üzerine 5 mL su eklenerek vortekslendi ve 10 mL %1 asetik asit içeren asetonitril eklendi. Çözelti tekrar vortekslendi. Sonra üzerine 4 g sodyum sülfat eklendi. Ardından 1 g sodyum klorid eklendi. Çözelti tekrar vortekslendi. Çözelti, 4°C'de 11400 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Sonra çözeltinin üstteki 6 mL'lik kısım alındı. Bu faz, -18 °C'de 1 saat dinlendirildi. Sonra tekrar 4°C'de 11400 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Sonra alınan üst kısım azot altında tamamen kurutuldu. Kuruyan örneğe 200 µL asetonitril ve 800 µL su eklendikten sonra 0,2 µm'lik filtre yerine bulanıklık gidermek ve madde kaybını önlemek için Eppendorf santrifüj ile 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. LC-MS/MS cihazıyla analiz edildi. Geri kazanımın %25-40 aralığında olduğu belirlendi.

Yöntem 4.

Katı-sıvı ekstraksiyon çalışmasında Zengxuan Cai ve ark. (2008)'nın çalışması modifiye edilerek kullanılmıştır. Etten sülfonamidlerin modifiye sıvı sıvı ekstraksiyonu prosedürü aşağıda açıklanmıştır;

1 g et alındı. Üzerine 200 µL sülfonamid doğal ve izotop karışımları eklendi. 5 dk bekledi. 10 mL asetonitril ilave edilerek ultratoraksta 1-2 dk parçalandı. 4°C'de santrifüj yapıldı. Üst faz 50 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı ve üst faz 50 mL santrifüj tüpüne ilave edildi. İki defa 10 mL n-hekzan ile ekstraksiyon yapılarak yağ molekülleri ortamdaki uzaklaştırıldı. Çözeltiye vorteks yapıldı. Çözeltiye, 10 mL su ve 10 mL etil asetat eklenerek sıvı-sıvı ekstraksiyon yapıldı. Toplanan etil asetat fazı rotaevaporatörde konsantre edildi ve nitrojen gazı altında uçuruldu. Kuruyan örneğe 200 µL asetonitril eklendi ve 800 µL su eklendi. Örnek 0,2 µm'lik filtreden geçirildi. LC-MS/MS cihazıyla analiz edildi. Geri kazanımın %25-40 aralığında olduğu belirlendi.

Yöntem 5.

5 g et numunesi alınır. Üzerine 200 µL sülfonamid doğal ve izotop karışımı eklendi. Üzerine 10 mL AcCN ilave edildi. Çözelti vortekslendi. 4°C’de 11400 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Sonra santrifüj edilen çözeltinin üst fazından 6 mL alınır. Asetonitril, azot altında uçuruldu. Kurutulan sülfonamid kalıntısı, 1,5 mL hekzan ile çözüldü ve ardından vortekslendi. Üzerine %20 metanol içeren 1,5 mL su ilave edildi ve tekrar vortekslendi. Çözelti santrifüj yapıldı. Alt fazdan alınarak LC-MS/MS cihazıyla analiz edildi. Geri kazanımın %75-120 aralığında olduğu belirlendi.

Yöntem 6.

ASE (Automatic Solid Phase Extraction, otomatik katı faz ekstraksiyonu) çalışması olarak Alessandra ve ark. (2004)’nın çalışması denenmiştir. Etten sülfonamidlerin ASE ekstraksiyonu prosedürü aşağıda açıklanmıştır;

Et homojenizatörde parçalandı. Bu işlem örneğe eklenen deiyonize su ile yapıldı. Homojenizatör 5000 rpm’de çalıştırıldı ve ardından 15 dakika sonra 25000 rpm’e çıkarıldı. Fazla su uçuruldu. 2 g homojenize örnek tartıldı, doğal ve izotop eklendi ve 4 g C18 rezin ile karıştırıldı. Homojen bir kıvam elde edildi. Bu karışım 11 mL’lik cam fiber filtre içeren hücreye transfer edildi.

Hücre ASE’nin tepsisine yerleştirildi. ASE cihazına metot yüklendi ve cihaz başlatıldı. Ekstraksiyondan sonra örnek vialleri -18°C’de bir saat ekstrakte edilen lipidlerin çökmesi için bekletildi. Vialler 10000 rpm’de santrifüj edildi. 100 µL süpernatant analiz için LC-MS/MS’e enjekte edildi. Geri kazanımın %25-32’nin altında olduğu belirlendi.

5.2.2.2.Ultratorax ve vorteks işleminin karşılaştırılması

Geri kazanımların düşük olmasından dolayı ultratoraks cihazının ekstraksiyona etkisi incelendi. Bu bağlamda, etten sülfonamidlerin ekstraksiyonunda ultratoraks ile vorteks işleminin karşılaştırması için Yöntem 1.’de anlatılan metod ile 4 tane deneme yapıldı.

1. örnek üzerine 5 mL su eklendi sonra 10 mL ACN eklendi.

2. örneğe sadece 15 mL ACN eklendi. 1. ve 2. örnekler ultratoraks ile 10000 rpm’de parçalandı.

3. örneğe, 5 mL su eklendi ve 10 mL AcCN eklendikten sonra vorteks cihazı ile karıştırıldı.

4. örneğe sadece 15 mL AcCN eklenerek vortekslendi.

Dört örneğin LC-MS/MS’de analizi sonucunda vorteks ile ultratorax işleminin sülfonamidlerin et dokusundan ekstrakte edilmesinde önemli bir farklılık gözlemlenmedi.

5.3.Metot Geçerli Kılma ve Belirsizlik Hesapları

5.3.1.Sütte 14 adet sülfonamid bileşiklerinin tayinine yönelik metodun geçerli kılınması ve belirsizlik hesapları

Sütte 14 adet sülfonamid bileşiklerinin tayinine yönelik metodun geçerli kılınması için doğrusallık/çalışma aralığı, algılama sınırı (LOD)/tayin sınırı (LOQ), tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir.

Çalışma aralığında doğrusallık ifadesi olarak regresyon katsayısının (R^2) 0,996 değerine eşit ya da üzeri olmasıdır. Söz konusu çalışmada regresyon katsayılarının 0,996-0,999 aralığında olduğu görüldü. Bu sebeple geliştirilen metodun istenilen çalışma aralığında olduğu ispatlandı.

Literatürde bu kadar fazla sülfonamid bileşiklerinin izotop seyreltme yöntemiyle sütte tayini konusunda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Rhijn ve ark. (2002) çalışmasında, 5 adet sülfonamid bileşiği (Sulphadiazine (SDZ), sulphadimidine (SMZ), sulphamethoxazole (SMX), sulphadoxine (SDX), sulphadimethoxine (SDM) için sadece 1 adet izotop (d7-Sulphadimidine (CEC-MAT 41)) kullanarak regresyon katsayısını 0,99 bulmuştur.

Koesukwiwat ve ark. (2007), 6 adet sülfonamid bileşiği (sülfadiazin, sülfatiazol, sülfametazin, sülfametoksipridazin, sülfametoksazol, sülfadimetoksin) için sadece 1 adet izotop seyreltme tekniği kullanarak regresyon katsayısını 0,999-0,997 aralığında bulmuştur.

LOQ değerleri için hedef en düşük seviye kalibrasyon çözeltisinin derişimine eşit ya da küçük olması (≤ 10 ppb) konulmuştur. Bu bağlamda, belirlenen en yksek LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 2,92 ppb ve 9,73 ppb olduğu bulunmuştur. LOD değerleri 1,82-2,92 ppb aralığında, LOQ değerleri 6,07-9,73 ppb aralığındadır. Geliştirilen metotla hedeflenen LOD ve LOQ değerlerinin sağlandığı görülmektedir.

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik bağlı standart sapma değerleri için belirlenen hedeflerin sırasıyla %8,32 ve %14,25 ile sağlandığı görülmektedir.

Geri kazanım çalışmasında, geri kazanım aralığı hedefinin %80-120 olarak belirlenmiş olup, bu hedef aralığını %90,85 ile sülfametazin alt sınırı, % 114 ile slfadoksinin sağladığı görülmektedir.

Sağlamlık alışmaları laboratuvarından kaynaklanan bazı küçük sapmaların ve bunların analiz sonuçları üzerine etkisini incelemektedir. Bu küçük sapmalar; ön işlem çalışmalarında, analiz n işlemlerinde, temizleme basamaklarında olabilmektedir. Mevcut çalışmada bu küçük sapmalar, ekstraksiyon basamağında AcCN:EA, hekzan ve süt miktarlarında değişim olarak belirlemiştir. İstatistiksel değerlendirmeler incelendiğinde $t_{\text{deneysel}} \leq t_{\text{kritik}}$ olduğundan metodun kritik basamaklarında yapılan küçük değişiklikler ölçüm sonuçları arasında anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. Ayrıca $F_{\text{deneysel}} \leq F_{\text{kritik}}$ olduğundan sonuçların kesinliği arasında da iki bileşik hariç anlamlı bir fark gözlenmemiştir. F testinde anlamlı farkların gözlemlendiği bileşikler sülfakloropridazin ve sülfafenazol olup, değişimin gözlemlendiği parametre süt miktarıdır. Bu sonuçlar dışında metot performans kriterini sağlamaktadır.

5.3.2. Ette 12 adet sülfonamid bileşiğinin tayinine yönelik metodun geçerli kılınması ve belirsizlik hesapları

Ette 12 adet sülfonamid bileşiklerinin tayinine yönelik metodun geçerli kılınması için doğrusallık/çalışma aralığı, algılama sınırı (LOD)/tayin sınırı (LOQ), tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir.

Çalışma aralığında doğrusallık ifadesi olarak regresyon katsayısının (R^2) 0,995 değerine eşit ya da üzeri olmasıdır. Söz konusu çalışmada regresyon katsayılarının 0,995-0,999 aralığında olduğu görüldü. Bu sebeple geliştirilen metodun istenilen çalışma aralığında olduğu ispatlandı.

Literatürde bu kadar fazla sülfonamid bileşiklerinin izotop seyreltme yöntemiyle ette tayini konusunda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Moretti ve ark. (2002) çalışmalarında, 11 adet sülfonamid bileşiği sülfanilamit, sülfametazin, sülfadimidin, sulfapridin, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfakuinoksalin, sulfamerazin, sülfametoksazol, sülfatiazol, sulfaguanidine için sadece 2 adet izotop (sülfametazin- $^{13}\text{C}_6$, sülfanilamit- $^{13}\text{C}_6$) kullanarak regresyon katsayısını 0,99 bulmuştur. Geliştirilen metotla hedeflenen regresyon katsayısı değerlerinin 0,995-0,999 aralığını sağlandığı görülmektedir.

LOQ değerleri için hedef en düşük seviye kalibrasyon çözeltisinin derişimine eşit ya da küçük olması (≤ 10 ppb) konulmuştur. Bu bağlamda, belirlenen en yüksek LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 2,99 ppb ve 9,96 ppb olduğu bulunmuştur. LOD değerleri 2,05-2,99 ppb aralığında, LOQ değerleri 6,82-9,96 ppb aralığındadır. Geliştirilen metotla hedeflenen LOD ve LOQ değerlerinin sağlandığı görülmektedir.

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik bağıl standart sapma değerleri için belirlenen hedefleri sırasıyla %9,88 ve %9,55 ile sağlandığı görülmektedir.

Geri kazanım hedef aralığı, %80-120 olarak belirlenmiştir. Yapılan geri kazanım çalışmasında, en düşük geri kazanım değerinin %82,30 ile sülfamerazin bileşğinde, en yüksek geri kazanım değerinin %115,79 ile sülfadiazin bileşğinde olduğu görülmektedir.

Sağlamlık çalışmaları laboratuvarından kaynaklanan bazı küçük sapmaların ve bunların analiz sonuçları üzerine etkisini incelemektedir. Bu küçük sapmalar; ön işlem çalışmalarında, analiz ön işlemlerinde, temizleme basamaklarında olabilmektedir. Mevcut çalışmada bu küçük sapmalar, ekstraksiyon basamağında AcCN, hekzan ve et miktarlarında değişim olarak belirlemiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler incelendiğinde $t_{\text{deneysel}} \leq t_{\text{kritik}}$ olduğundan metodun kritik basamaklarında yapılan küçük değişiklikler ölçüm sonuçları arasında anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. Ayrıca $F_{\text{deneysel}} \leq F_{\text{kritik}}$ olduğundan sonuçların kesinliği arasında iki bileşik hariç anlamlı bir fark gözlenmemiştir. F testinde anlamlı farkların gözlemlendiği bileşikler sülfatiazol ve sülfametizol olup, değişimin gözlemlendiği parametre sülfatiazol için ACN miktarı, sülfametizol için hekzan miktarıdır. Bu sonuçlar dışında metod performans kriterini sağlamaktadır.

5.4. Metodun Piyasadaki Örnekler Üzerine Uygulanışı

Süt örneklerine, 5.2.1.4. Modifiye Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu başlığında açıklandığı gibi ekstraksiyon metodu uygulanmıştır. Ardından LC-MS/MS cihazında analize tabi tutulmuştur. Belirlenen sonuçlar aşağıdaki Çizelge 5.3'te sunulmuştur.

UHT ve pastörize sütlerde sülfonamid bileşiklerine rastlanmamasının nedeni olarak üretici firmaların denetleme sistemlerinin etkisi ve ayrıca sülfonamid bileşiklerinin ısıl işleminden dolayı bozunmaları belirtilebilir (Roca ve ark 2013).

Yapılan saha uygulaması çalışmasında sokak sütlerinde sülfonamid bileşiklerinin varlığına rastlanmıştır. Sülfametazin için bulunan değer $6,46 \pm 0,76$ ng/g, sülfisoksazol için bulunan değer $7,3 \pm 0,71$ ng/g olup bu değerler 2015 ve 2016 Kalıntı İzleme Planında (Anonim 2015a) belirtilen sınır değerlerin altındadır.

Çizelge 5.3 Geliştirilen metodun piyasa sütlerine uygulanması ile elde edilen değerler (ng/g)

Süt örnekleri	Sülfonamid Bileşikleri													
	SMR	SDZ	SIX	SMX	STZ	SDM	SP	SMT	SDO	SCP	SNZ	SMZ	SQX	SMP
UHT 1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
UHT 2	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
UHT 3	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
UHT 4	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
UHT 5	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
UHT 6	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
P 1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
P 2	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
P 3	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
P 4	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
P 5	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
P 6	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
S 1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
S 2	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
S 3	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	6,46±0,76	n/a	n/a
S 4	n/a	n/a	7,3±0,71	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
S 5	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
S 6	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

n/a: not available (tespit edilemez)

Sonuç olarak bu tezde sütte 14 adet sülfonamid bileşiklerini (sülfatiazol, sülfapridin, sülfametazin, sülfamerazin, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfametoksazol, sülfadoksin, sülfisoksazol, sülfafenazol, sülfakuinoksalin, sülfakloropridazin, sülfametizol, sülfametoksipridazin) ve ette 12 adet sülfonamid bileşiklerini (sülfatiazol, sülfapridin, sülfametazin, sülfamerazin, sülfadiazin, sülfametoksazol, sülfadoksin, sülfisoksazol, sülfakuinoksalin, sülfakloropridazin, sülfametizol, sülfametoksipridazin) tayin etmeye yönelik metrolojik izlenebilirliği sağlanmış birincil (primer) bir yöntem geliştirilmiştir. Çalışmada geniş bir sülfonamid bileşik ailesinin eşlenik izotopları kullanmıştır. Metodun örnek hazırlama aşamasında süt ve et ürünlerine en uygun ekstraksiyon yöntemlerinin belirlenmesi çalışmaları

sonucunda sülfonamid bileşiklerinin sütten ekstraksiyonu için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi, etten ekstraksiyonu için katı-sıvı ekstraksiyon yöntemi modifiye edilerek geliştirilmiş olup metodun ekstraksiyon yönteminin QuEChERS, ASE, SPE ekstraksiyon yöntemlerinden daha sade ve pratik olduğu görülmüştür. Ekstraksiyondaki ve analitlerin analizindeki hatalar ve sapmalar izotop dilüsyon metoduyla minimize edilmiştir. Metot saha çalışmalarında rutin analizlerde kullanılabilecek bir metottur.



6.KAYNAKLAR

- Abboud, J.L.M, Notaria, R. (1999). Critical compilation of scales of solvent parameter. Part I. Pure, non-hydrogen bond donor solvents, *Pure and Applied Chemistry*, 71 (4): 645-718.
- Abdallah, H., Arnaudguilhem, C., Faber, J., 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.
- Acar, J., Uygun, Ü. (2007). Doğal Toksik Maddeler ve Kontaminantlar. Gıda Kimyası, Editör İ. Saldamlı, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, Türkiye, 587.
- Agarwal, V.P. (1990). Detection of SMZ residues in milk by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatog. Related Technol.*, 13: 3531–3539.
- Agarwal, V.P. (1993). Application of solid phase extraction for the analysis of sulfonamides in milk by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 16: 3793–3799.
- Akgün, H., Balkan, A., Bilgin, A., Çalış, Ü., Gökhan, N., Dalkara, S., Erdoğan, H., Erol, D., Ertan, M., Özkanlı, F., Palaska, E., Saraç, S., Şafak, C., Tozkoparan, B. (2004). *Farmasötik Kimya*. 2. Baskı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
- Akkan A.G. (1997). Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, 2-3 Mayıs, İstanbul, s. 53-62.
- Akkan, A.G., Karaca, M. (2003). Veteriner iç hastalıklarında antibiyotiklerin kullanımı. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14 (2):72-77.
- Altun, F., Divrikli, Ü., Soylak, M., Elçi, L. (2012). Dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu ile bazı eser metallerin tayini. 2. Eser Analiz Çalıştayı, Trabzon.
- Aguilera-Luiz, M.M., Vidal, J.L.M., Romero-Gonzalez, R., Frenich, A.G. (2008). Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1205: 10–16.
- Anonim (2017a). Principles of Operation. <http://global-haditech.com/prinsipal-prima-pro-sentinel-pro-brochure.html#sthash.CS4BrFBa.dpbs>. (erişim tarihi: 02.01.2017).
- Anonim (2017b). Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry. http://www.jeolusa.com/DesktopModules/Bring2mind/DMX/Download.aspx?EntryId=284&Command=Core_Download&language=en-US&PortalId=2&TabId=337.(erişim tarihi: 02.01.2017).
- Anonim (2016c). LC Packings Ultimate nano HPLC connected to the Bruker Esquire HCT Ion Trap. <http://penyfan.ugent.be/labo/joelv/Esquire.html>. (erişim tarihi: 24.12.2016).
- Anonim (2016b). Mass Spectrometry. <http://alevelnotes.com/Mass-Spectrometry/124>. (erişim tarihi: 24.12.2016).
- Anonim (2016a). Kromatografi. <http://www.analitik.hacettepe.edu.tr/Demolar/kromatografi.pdf>. (erişim tarihi: 20.10.2016).

- Anonim (2015a). Ulusal Kalıntı İzleme Planı. www.tarim.gov.tr/GKGM/Belgeler_gida/ulusal_kalinti_izleme_plani.docx. (erişim tarihi: 12.04.2015).
- Anonim (2015b). Statutory Instrument. No: 787. The animal and animal product (Examination for residues and maximum residue limits). England and Scotland Regulation 2015. <http://www.ggd.org.tr/icerik.php?id=656>. (erişim tarihi: 14.08.2016).
- Anonim (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed. (erişim tarihi: 21.09.2016).
- Anonim (2013a). TUBITAK-Ulusal Metroloji Enstitüsü (UME). Metroloji, Birinci baskı, Promat Basım Yayın San. ve Tic. A.Ş. Kocaeli. (erişim Tarihi:10.11.2016).
- Anonim (2013b). Canlı hayvan ve hayvansal ürünlerde kalıntı izleme genelgesi genelge tarihi: 01/03/2013 genelge no: 9. (erişim tarihi: 20.01.2017).
- Anonim (2013c). Quantitative LC-MS Guide, 1st Ed. Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, RSC Analytical Methods Committee.
- Anonim (2012a). International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, www.bipm.org. A previous version is published as ISO/IEC Guide 99:2007, ISO Geneva. (erişim tarihi: 02.02.2016).
- Anonim (2012b). EURACHEM/CITAC Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Third Edition. (erişim Tarihi: 20.01.2017).
- Anonim (2011a). Eurochem Guide. Terminology in Analytical Measurement. Introduction to VIM 3. First edition. (erişim tarihi: 20.01.2017).
- Anonim (2011b). Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler İle Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik. RG: 17.12.2011, No.28145. (erişim tarihi: 24.12.2016).
- Anonim (2010). Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), JCGM 100:2008 (corrected version 2010), www.bipm.org. Printed as ISO/IEC Guide 98-3:2008, ISO Geneva. (erişim tarihi: 10.12.2016).
- Anonim (2009). Kütle Spektrometresi. Bilsen Beşergil Ders Notları. http://www.bayar.edu.tr/besergil/kutle_1.pdf. (erişim tarihi: 24.12.2016).
- Anonim (2008a). Uluslararası metroloji sözlüğü. Temel ve genel kavramlar ilgili terimler. JCGM 200:2008(TR/EN/FR)http://www.ume.tubitak.gov.tr/sites/images/uluslararasi_metroloji_s_ozlugu.pdf (erişim tarihi: 11.05.2016).
- Anonim (2008b). JCGM 100:2008. GUM 1995 with minor corrections. Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement. <http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html> (erişim tarihi: 13.05.2016).
- Anonim (2005a). Validation of analytical procedures: text and methodology”, ICH Harmonised Tripartite Guideline. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific (erişim tarihi: 8.07.2016).
- Anonim (2005b). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva. (erişim tarihi: 17.04.2016).

- Anonim (2004). Prontosil. <https://global.britannica.com/science/Prontosil>. (erişim tarihi: 15.03.2015).
- Anonim (2002a). Food Insecurity in the World. <http://www.fao.org/docrep/> (erişim tarihi: 28.01.2017).
- Anonim (2002b). Türk Gıda Kodeksinin 2002/30 sayılı tebliği, Hayvansal Gıda Maddelerindeki Maksimum Kalıntı Düzeyleri (erişim tarihi: 24.06.2016).
- Anonim (2001). IUPAC recommendations. Selectivity in Analytical Chemistry. Pure Applied. Chemistry, 73(8):1381–1386.
- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. Journal of Chromatography B, 877:2224-2234.
- Ardrey, R. E. (2003). Liquid Chromatography- Mass Spectrometry: An Introduction. John Wiley & Sons, Ltd.
- Baran, W., Adamek, E., Ziemianska, J., Sobczak, A. (2011). Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. J. Hazard. Mat., 196: 1–15.
- Barbieri, G., Bergamini, C., Ori, E., Resca, P. (1995). Determination of sulfonamides in meat and meat products. Industrie Alimentari, 34: 1273–1276.
- Başoğlu, A. (2000). Veteriner İç Hastalıklarında Genel Tedavi. Selçuk Üniv. Basımevi, Konya. 109-160.
- Beckey, H.D. (1977). Principles of field ionization and field desorption in mass spectrometry, Pergamon Press, Oxford.
- Benninghoven, A., Sichtermann, W.K. (1978). Detection, identification and structural investigation of biologically important compounds by secondary ion mass spectrometry. Analytical Chemistry, 50:1180.
- Bercaru, O., Ulberth, F., Emons, H., Vandecasteele C. (2006). Accurate quantification of PAHs in water in the presence of dissolved humic acids isotope dilution mass spectrometry, Analytical Bioanalytical Chemistry, 384:1207-1213.
- Bilandzic, N., Kolanovic BS, Varenina I., Scortichini G., Annunziata L., Brstilo M., Rudan N. (2011). Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. Food Control, 12, 1941-1948.
- Bogdanov, S. (2003). Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products. Apiacta, 38, 190-197.
- Boyd, B., Bjork, H., Billing, J., Shimelis, O., Axelsson, S., Leonora, M., Yilmaz, E. (2007). Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. J. Chromatogr. A, 1174, 63-71.
- Boque, R., Maroto, J., Riu, F.X. (2002). Validation of analytical methods. 53:128-143.
- Binici, B. (2014). Plastik maddeler içerisinde PBDE ve PBB bileşiklerinin GC-IDMS yöntemiyle tayini. Doktora tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Brenna, J.T., Corso, T.N., Tobias, H.J., Caimi, R.J., (1997). High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. *Mass Reviews*, 16:227-258.
- Bruins, A.P. (1994). Atmospheric pressure ionization mass spectrometry II. Applications in pharmacy, biochemistry and general chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 13:2, 81-90.
- Burtis, CA, Ashwood E.R. (1994). *Tietz textbook of clinical chemistry*. Second ed. W.B.Saunders Company. 241. Philadelphia.
- Burtis CA., Ashwood E.R. (2005). *Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler*. Aslan D. 5. Baskı. Palme Yayıncılık. Ankara.
- Cai, Z., Yu, Z., Pan, H., Tie, X., 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.
- Can, H.Y., Çelik, T.H. (2008). Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı ve kalıntı riski. *Veteriner Hekim Dergisi*, 79(4):35-40.
- Cengiz, E. (2011). Kayısı (*Prunus armeniaca L*) ve kayısı çekirdeğinde kuersetinin HPLC-MS ile tayini. Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Chafer-Perica C., Maquieira A., Puchades R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends Anal. Chem.*, 29, 1038-1049.
- Chan, S., Kong, M.F., Wong, Y.C., Wong, S.K., Sin and D.W.M. (2007). Application of isotope dilution gas chromatography- mass spectrometry in analysis of organochlorine pesticide residues in ginseng root. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 55:3339-3345.
- Chapman, J.R. (1993). *Practical Organic Mass Spectrometry*, İkinci Baskı, Wiley.
- Cheng, Y., Huang, S., Singco, B., Huang, H. (2011). Analyses of sulfonamide antibiotics in meat samples by on-line concentration capillary electrochromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218:7640–7647.
- Chiavarino, B. Crestoni, M.E., Marzio, A.D., Fornanni, S. (1998). Determination of sulphonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. *Journal of Chromatography B*, 706, 269-277.
- Clark, S.B., Turnipseed, S.B., Madson, M.R., Hurlbut, J.A., Kuck, L.R., Sofos, J.N. (2005). Confirmation of sulfamethazine, sulfathiazole, and sulfadimethoxine residues in condensed milk and soft-cheese products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *JAOAC Int.* 88, 736–743.
- Combs, M.T. (1997). Optimal analysis of sulfonamides from biological matrices using supercritical fluids. Phd Thesis, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, Virginia.
- Combs, M.T., Ashraf-Khorassani, M., Taylor, L.T. (1999). HPLC: atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy of eight regulated sulfonamides. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 19:301–308.
- Conzuelo, F., Campuzano, S., Gamella, M., Pinacho, D., Reviejo, A.J., Marco, M.P., Pingarron, J.M. (2013). Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous

- determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk. *Biosensors and Bioelectronics*. 50:100–105.
- Coşkun, Ö. (2016). Separation techniques: Chromatography. *North Clin.* 3(2):156-60.
- Covey, T. R., Lee, E. D., Henion, J. D., (1986). Mass Spectrometry for the Determination of Drugs in Biological Samples. *Analytical Chemistry*, 58:2453-2460.
- Dal-Ho Kim, Jong Oh C., Jinseog K., Dai Woon L. (2011). *Journal of liquid Chromatography & Related Technologies*, 26(7):1149–1159.
- Dean, J.R. (2009). Extraction techniques in analytical sciences. John Wiley, 281, England.
- Demirli, Ş. (2012). Zeytin yapraklarından saf oleuropein eldesi için moleküler baskılı katı faz ekstraksiyon sistemi geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Deng, X.J., Yang, H.-Q., Li, J.Z., Song, Y., Guo, D.H., Luo, Y., Du, X.N., Bo, T. (2011). Multiclass residues screening of 105 veterinary drugs in meat, milk, and egg using ultra high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 34: 2286–2303.
- Diserens, J.M., Renaudbezot, C., Savoyperroud, M.C. (1991). Simplified determination of sulfonamides residues in milk, meat and eggs. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 87: 205–211.
- Dmitrienko, S.G., Kochuk, E.V., Apyari, V.V., Tolmacheva, V. V., Yolotov, Y.A (2014). Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection. *Analytica Chimica Acta* 850: 6–25.
- Dubreil-Chéneau, E., Pirotta, Y., Verdon, E., 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.
- Dunford, N., Irmak, S., Jonnala, R. (2010). Pressurised solvent extraction of policosanol from wheat straw, germ and bran, *Food Chemistry*, 119 (3): 1246–1249.
- Dreisewerd, K. (2003). The desorption process in MALDI. *Chemical Reviews (ACS publications)*, 103:395.
- Eisert, R., Levsen, K. (1996). Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: A new method for the analysis of organics in water. *Journal of Chromatography A*. 733:143-157.
- Elizabeta, D. S., Zehra, H. M., Biljana, S. D., Pavle, S., Risto, U. (2011). Screening of veterinary drug residues in milk from individual farms in Macedonia. *Mac. Vet. Rev.* 1: 5-13.
- Ellison, S.L.R., King, B., Rösslein, M., Salit, M. Williams, A. (eds.) (2003). *Eurachem/CITAC Guide Traceability in chemical measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement*, 1st ed, Eurachem, www.eurachem.org.
- Ettre, L.S., Sakodinskii, K.I. (1993). M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903). *Chromatografia*. 35:223.

- EURACHEM/CITAC Guide: Traceability in Chemical Measurement (2003). Available from <http://www.eurachem.org> and <http://www.citac.cc>.
- EURACHEM Guide, Terminology in Analytical Measurement - Introduction to VIM 3 (2011). <http://www.eurachem.org>.
- Farooq, M.U., Su, P., Yang, Y. (2009). Applications of a Novel Sample Preparation Method for the Determination of Sulfonamides in Edible Meat by CZE. *Chromatographia* 69 :1107–1111.
- Fenn, JBI., Mann, M., Meng, CK., Wang, SF., Whitehouse, CM. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246(4926): 64-71.
- Forti, A.F., Scortichini, G. (2009). Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 637, 214-219.
- Franek, M., Kolar, V., Deng, A., Crooks, S. (1999). Determination of sulfadimidine (sulfamethazine) residues in milk, plasma, urine and edible tissues by sensitive ELISA. *Food Agric. Immunol.*, 11, 339.
- Fuh, M.R.S., Chan, S. (2001). Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography–electrospray-mass spectrometry. *Talanta* 55:1127-1139.
- Furusawa, N. (2000). HPLC determination of sulfadimethoxine and its hydroxyl metabolites following SPE of edible chicken tissues. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 23: 1413–1422.
- Furusawa, N. (2001). Determining the procedure for routine residue monitoring of SMZ in edible animal tissues. *Biomed. Chromatogr.*, 15: 235–239.
- Furusawa, N., Kishida, K. (2001). High-performance liquid chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulfonamides in milk. *Fresenius J Anal Chem.*, 371:1031–1033.
- Furusawa, N. (2003). Rapid high-performance liquid chromatographic determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents. *Anal. Chim. Acta*, 481: 255–259.
- Furusawa, N., Mukai, T. (1994). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine and their N4-acetyl metabolites in foods of animal origin. *J. Chromatogr. A*, 677: 81–85.
- García-Cañas V, Simó C, Castro-Puyana M, Cifuentes A. (2014). Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics., *Electrophoresis*, 35(1):147-69.
- García AM., Gamiz L., Lara FJ., Iruela MD., Cruces C. (2009). Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395, 967-986.
- Gentili, A., Perret, D., Marchese, S., Sergi, M., Olmi, C., Curini, R. (2004). Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: A new method for the analysis of organics in water. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4614-4624.

- Gonzalez, C.A., Usher, M.K., Brooks, A.E., Majors, R.E. (2009). Determination of sulfonamides in milk using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Application Note.
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., Gennaro, M.C. (2010). Signal suppression/enhancement in high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217:3929-3937.
- Gross, J.H. (2004). *Mass Spectrometry*. 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Güneş, M.E, Güneş,N., Cıbık, R. (2009). Oxytetracycline and sulphonamide residues analysis of honey samples from Southern Marmara region in Turkey. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 15:163-167.
- Han, R. W., Zheng, N., Yu, Z.N., Wang, J., Xu, X. M., Qu, X.Y., Li, S.L., Zhang, Y.D., Wang, J. Q. (2015). Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 181:119-126.
- Han, J., Wang, Y., Liu, Y., Li, Y. ,Lu, Y., Yan, Y., Ni, L. (2013). Ionic liquid-salt aqueous two-phase extraction based on salting-out coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of sulfonamides in water and food. *Anal. Bioanal. Chem.* 405:1245–1255.
- Hiba, A., Carine, A., Haifa, A. R., Ryszard, L., Farouk, J. (2016). Monitoring of twenty two sulfonamides in edible tissues: investigation of new metabolites and their potential toxicity. *Food Chemistry*, 192:212-227.
- Hela, W., Brandtner, M., Widek, R., and Schuh, R. (2003). Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC–DAD for detection. *Food Chem.*, 83: 601–608.
- Hewavitharana, A.K. (2011). Matrix matching in liquid chromatography-mass spectrometry with stable isotope labelled internal standarts-Is it necessary? *Journal of Chromatography A*, 1218:359-361.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Ingeldoh, A., Stahl, B. (1990). Matrix assisted UV-laser desorption ionization: a new approach to mass spectrometry of large molecules, in *Biological Mass Spectrometry*, p. 49 (eds. A.L. Burlingame and J.A. McCloskey), Elsevier, Amsterdam.
- Hochstrasser DF, Sanchez JC, Appel RD. (2002). Proteomics and its trends facing nature's complexity. *Proteomics*, 2:807-12.
- Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry. Principles and applications*, III. baskı, England.
- Hoffmeister, A., Suhren, G., Heeschen, W. (1991). High pressure liquid chromatographic determination of sulfadimidine residues in milk-incidence in consumer milk from various European countries. *Milchwissenschaft- Milk Sci. Intern.*, 46: 770-774.
- Ho, CS., Lam, CWK, Chan, MHM, Cheung, RCK, Law, LK., Lit, LCW, Ng, KF, Suen, MWM Tai, HL. (2003). *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*. *Clin Biochem Rev.* 24(1):3-12.

- Hou, J., Yan, J., Zhang, F., Zhao, Q., Chen, H., Zhang, Y., Li, G., Li, Y., Ding, L. (2014). Evaluation of intercalated α -zirconium phosphate as sorbent in separation and detection of sulfonamides in honey. *Food Chem.* 150:58–64.
- Huet, A.C., Fodey, F., Haughey, S.A., Weigel, S., Elliott, C., Delahaut, P. (2010). Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods. *Trend Anal Chem*, 29: 1281-1294.
- ICH (2005). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). www.ich.org
- ISO/IEC (2005). 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva.
- Ito, Y., Oka, H., Ikai, Y., Matsumoto, H., Miyazaki, Y., Nagase, H. (2000). Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis. V. Simultaneous determination of sulfonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 898: 95–102.
- Jornet, D., González-Martínez, M.A., Puchades, R., Maquieira, A. (2010). Antibiotic immunosensing: Determination of sulfathiazole in water and honey *Talanta*, 81: 1585–1592.
- Jessome, L.L., Volmer, D.A. (2006). Ion Suspension: A Major Concern in Mass Spectroscopy. *LCGC North America*, 24, 498–510.
- Jones, M. (2000). *Organic Chemistry*, 2nd ed. New York. W. W. Norton & Company, Inc.
- Juan-borrás, M., Periche, A., Domenech, E., 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 LCMS- MS. *Food Control*, 50: 243-249.
- Kaya, S. (2007): Antibiyotikler. 329-469. Alınmıştır: S Kaya (Ed), *Veteriner Farmakoloji*, Cilt 2, 4. Baskı. Medisan Yayınevi, Ankara.
- Kámmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75:417–434.
- Kebarle, P., Tang, L. (1993). From ions in solution to ions in the gas phase. The mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 65:972A.
- Kermit, K. M., Boyd, R. K., Eberlin, M. N., Langley, G. J., Li, L., Naito, Y. (2013). Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.*, ASAP Article.
- Kılıç E., Yılmaz H. (2013). *Enstrümental Analiz. Bilim Yayınları*, 1038, Ankara.
- Kıvrak, İ., Kıvrak, Ş., Harmandar, M. (2016). Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Sci. Technol, Campinas*, 36(1): 90-96.
- Kim, D., Choi, J., Lee, D. (2002). Determination of Sulfonamides in Meat by Liquid Chromatography Coupled with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23:11.

- Kim, D., Choi, J., Kim, J., Lee, D. (2003). Application of a Polymeric Solid Phase Extraction for the Analysis of Sulfonamides in Milk by LC/MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26: 1149–1159.
- Kiser, J.S. (1984). Subtherapeutic Uses of Antibiotics and Sulfonamides in Animal Agriculture in Handbook Series in Zoonoses, Section D: Antibiotics, Sulfonamides, and Public Health, Vol. 1, J.H. Steele and G.W. Beran, eds., CRC Press, Boca Raton, 94.
- Kishida, K., Furusawa, N. (2001a). Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken. *J. Chromatogr. A*, 937: 49–55.
- Kishida, K., Furusawa, N. (2001b). High-performance liquid chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulfonamides in milk. *Fres. J. Anal. Chem.*, 371: 1031–1033.
- Kishida, K., Furusawa, N. (2003). Toxic/harmful solvents-free technique for HPLC determination of six sulfonamides in meat. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 26: 2931–2939.
- Kishida, K., Furusawa, N. (2004). Determining SMZ in pork using HPLC with a 100% water mobile phase. *LC GC N. Amer.*, 22:1092–1096.
- Kishida, K., 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.
- Knochenmuss, R. (2002). A quantitative model of UV matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Mass Spectrom.*, 37, 867.
- Koesukwiwat, U., Jayanta, S., 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.
- Konak, Ü.İ. (2016). Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (UHPLC-HR/MS) ile bebek gıdalarında sülfonamid grubu antibiyotik kalıntılarının ve metabolitlerinin belirlenmesi için analiz metodu geliştirilmesi. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Kostadinovic, L., Pavkov, S., Gaal, F. (1999). An improved method for the determination of sulfachloropyrazine in meat and liver of broilers during and after their treatment for coccidiosis. *Acta Aliment.*, 28: 311–319.
- Kowalski, P., Plenis, A., Oledzka, I., Konieczna, L. (2011). Capillary electrophoresis in analysis of veterinary drugs. *J. Pharm. Biomed. A* 54:160–167.
- Kök, Z. (2016). İzmir ilindeki hipermarketlerde satışı yapılan kültür alabalık, çipura ve levrek balıklarının kas dokularında sülfonamid grubu antibiyotiklerin varlığının araştırılması. Doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kung, T., Tsai, C.W., Ku, B.C., 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.
- Laloux, J., Romnee, J.M., Marin, C., Vanwijnsberghe, D. (1996). Determination of sulfonamides in milk using fluorecamine derivatization and HPLC separation. *Milchwissenschaft-Milk Sci. Intern.*, 51: 517–520.
- Lewis, J. K., Wei, J., Siuzdak, G. (2000). Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. In : *Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers (Ed.). Wiley, pp. 5880–5894, Chichester.
- Li, S.G., Zhao, J.M., Wang, W.X., Jin, Y., Du, Y.G. (2005). Simultaneous determination of ten sulfa drugs in chicken meat by high performance liquid chromatography coulometric array detector. *Chin. J. Anal. Chem.*, 33: 442–446.
- Long, A.R., Short, R., Barker, S.A. (1990a.) Method for the isolation and liquid chromatographic determination of eight sulfonamides in milk. *J. Chromatogr.*, 502: 87–94.
- Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S., Short, C.R., Barker, S.A. (1990b). Multiresidue method for the determination of sulfonamides in pork tissue *J. Agric. Food Chem.*, 38: 423–426.
- Loo, J.A., Udseth, H.R., Smith, R.D. (1989). Effect of reducing disulfide-containing proteins on electrospray ionization mass spectra. *Anal Biochem.* 179-404.
- Lopes, R. P., Augusti, D.V., Santos, F.A., Vargas, E.A., Augusti R. (2013). Development and validation of an efficient and innovative method for the quantification of multiclass veterinary drugs in milk by using LC–MS/MS analysis. *Anal. Methods*, 5: 5121–5127.
- Lorquet, J.C. (2000). Landmarks in the Theory of Mass Spectra. *Int. J. Mass Spectrom.* 200:43-56.
- Macedo, A.N., Brondi, S.H.G., Vieira, E.M. (2013). Development and Comparison of Sample Preparation Techniques for Chromatographic Analysis of Sulfonamide Residues in Bovine Milk, *Food Analytical Methods*. 6 (5):1466–1476.
- Malintan, N.T., Mohd, M.A. (2006). *Journal of Chromatography A*, 1127: 154-160, alınmıştır, Mallet, C.R., Lu, Z., Mazzeo, J.R. (2004). A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 49–58.
- Märk, T.D. (1986). *Electron Impact Ionization, in Gaseous ion Chemistry and Mass Spectrometry*, editör: Futrell, J.H., John Wiley and Sons, pp.61-93, New York.
- Mass Spectrometry (2017). Agilent Technologies, Inc, <https://www.agilent.com/cs/library>.
- Matz, L.M., Asbury, G.R., Hill, H.H. (2002). Two-dimensional separations with electrospray ionization ambient pressure high-resolution ion mobility spectrometry/quadrupole mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16:670-675.
- McGrane, M., O’Keeffe, M., Smyth, M.R. (1999). The analysis of sulfonamide drug residues in pork muscle using automated dialysis. *Anal. Lett.*, 32: 481–495.

- McNeal, C.J., Macfarlane, R.D. (1981). Observation of a fully protected oligonucleotide dimer at m/z 12637 by californium-252 plasma desorption mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 103 (6):1609-1610.
- Mehtabuddin, A., Mian, A., Ahmad, T., Nadeem, S., Tanveer, Z., Arshad, J. (2012). Sulfonamide residues determination in commercial poultry meat and eggs. *The Journal of Animal&Plant Sciences*, 22(2):473-478.
- Mendoza, J.H., Maggi, L., Bonetto, L., Carmena, B.R., A. Lezana, F.A. Mochol, M. Carmona, (2012). Validation of antibiotics in catfish by on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 134: 1149–1155.
- Milton, M. J.T., Wang, J.A. (2002). High accuracy method for isotope dilution mass spectrometry with application to the measurement of carbondioxide, *International Journal of Mass Spectrometry*, 218:63-73.
- Moretti, S., Dusi, G., Guisepponi, D., Pelliciotti, S., Rossi, R., Saluti, G., Cruciani, G., Galarini, R. (2016). Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat. *Journal of Chromatography A*, 1429: 175–188.
- Moors, M., Massart, D.L., McDowall, R.D. (1994). Analyte isolation by solid phase classification and recommended practices extraction (spe) on silica-bonded phases. *Pure Appl. Chem.*, 66, 277–304.
- Muccio, Z., Jackson, G.P. (2009). Isotope ratio mass spectrometry. *Analyst*, 134, 213–222.
- Msagati, T.A.M., Nindi, M.M. (2004). Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta*, 64: 87–100.
- Moriwaki, H. (2016). Electrospray ionization mass spectrometric detection of low polar compounds by adding NaAuCl_4 . *Journal of Mass Spectrometry*. 51:1096-1102.
- Nakilcioğlu, E., Ötleş, S. (2014). Basınçlı çözgen ekstraksiyonu ve Gıda Sanayiindeki Uygulamaları. *Akademik Gıda*, 12(2): 88-94.
- Özgenç, S. (2011). Chromatographic determination of sulfonamides in milk and honey. Yüksek lisans tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Özkan, O., Eşsiz, D., Yazıcı, K., Erdağ, D. (2015). Ardahan ilinde üretilen ballarda antibiyotik kalıntı düzeylerinin araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 10(2): 88-92.
- Parab, S. R., Amritkar, P.N. (2012). Development and validation of a procedure for determination of sulfonamide residues in pasteurized milk using modified quechers method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 95: 1528-1533.
- Parkinson, A., Ogilvie, B.W., Buckley, D.B., Kazmi, F., Czerwinski, M., Parkinson, O. (2013). Biotransformation of xenobiotics. In: C.D. Klaassen (Editor), *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, McGraw-Hill Education, 185-366, New York.
- Parks, O.W., Maxwell, R.J. (1994). Isolation of sulfonamides from fortified chicken tissues with supercritical CO_2 and in-line adsorption. *J. Chromatogr. Sci.*, 32: 290–293.

- Pecorelli, I., Bibi, R., Fioroni, L., Galarini, R. (2004). Validation of a confirmatory method for the determination of sulfonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. *J. Chromatogr. A*, 1032: 23–29.
- F. Conzuelo, S. Campuzano, M. Gamella, D. Pinacho, A.J. Reviejo, M.P. Marco, J.M. Pingarron, (2013). Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk. *Biosens. Bioelectron.* 50:100–105.
- Perez, N., Gutierrez, R., Noa, M., Diaz, G., Luna, H., Escobar, I., Munive, Z. (2002) Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamides, nitrofurans, and chloramphenicol residues in pasteurized milk. *J. AOAC Int.* 85: 20–24.
- Prescott, J.F., Giguère, S., Dowling, P.M. (2013). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Fifth Edition. Wiley, pp.279-294.
- Raju, N.K. (1999). The Nobel Chronicles. *The Lancet*, 353, 681.
- Ramni, K., Navneet, K., Ashutosh, U., Suri, O.P., Arti, T. (2011). High performance liquid chromatography detectors: A. Review. *International Research Journal of Pharmacy*. 2(5):1-7.
- Rayane M. , Yves-Alexis H., Marie-Hel' ene L., Jean-Claude T. , Laure J., Philippe A. Guy (2007). Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques. *Journal of Chromatography A*, 1160: 194–205.
- Reeves, V.B. (1999). Confirmation of multiple sulphonamide residues in bovine milk by gas chromatography–positive chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 723: 127-137.
- Roca, M., Althaus, R.L., Molina, M.P. (2013). Thermodynamic analysis of the thermal stability of sulfonamides in milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry detection. *Food Chemistry*, 136: 376-383.
- Roudaut, B., Garnier, M., (2002). Sulfonamide residues in eggs following drug administration via the drinking water. *Fd. Addit. Contam.*, 19: 373–378. Sulfonamides in Foodstuffs of Animal Origin 367.
- Rossi, D. T., Sinz, M. (2002). *Mass Spectrometry in Drug Discovery*, CRC Press, pp.432.
- Samanidou, V. F., Tolika, E. P., Papadoyannis, I. N. (2008). Chromatographic Residue Analysis of sulfonamides in foodstuffs of animal origin. *Separation & Purification Reviews*, 37: 325-371.
- Jurado-Sanchez, B., Ballesteros, E., Gallego, M., (2013). Comparison of microwave assisted, ultrasonic assisted and Soxhlet extractions of N-nitrosamines and aromatic amines in sewage sludge, soils and sediments, *Science of the Total Environment*, 463:293-301.
- Saraç, Y. (2015). İstanbul'da satışa sunulan içme sütlerinde antibiyotik kalıntı düzeylerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, İstanbul Aydın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall A.B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65 725.
- Scott, R.P.W. (1996). *Chromatographic detectors. Design, Function and Operation. Chromatographic Science Series. Volume 73.*
- Scott, R. P.W. (2003). *Principles and Practice of Chromatography. ChromEd Book Series.*
- Seğmenoglu, M.S. (2014). Makrolit Grubu Bazı Antibiyotiklerin Sütte Varlığının Belirlenmesi. *Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü*, 4: 9-13.
- Sezer, Ö. (2011). Süt ve balda sülfonamidlerin kromatografik tayini. Yüksek lisans tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, İzmir.
- Shaikh, B., Rummel, N., and Donoghue, D. (1999). Determination of SMZ and its major metabolites in egg albumin and egg yolk by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 22: 2651–2662.
- Shao, B., Dong, D., Wu, Y., Hu, J., Meng, J., Tu, X., Xu, S. (2005). Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 546, 174–181.
- Shelver, W.L., Rubio, F.R. (2008). ELISA for Sulfonamides and Its Application for Screening in Water Contamination. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 6609-6615.
- Shpigel, N.Y., Winkler, M., Ziv, G. (1998). Relationship between in vitro sensitivity of coliform pathogens in the udder and the outcome of treatment for clinical mastitis. *Vet Rec* 142:135.
- Skoog DA, Holler JF, Nieman TA. (1998). In principles of instrumental analysis. Molecular mass spectrometry. Philadelphia: Saunders College Publishing, 498-534.
- Soto-Chinchilla, J.J., Gamiz-Gracia, L., Garcia-Campana, A.M., Imai, K., Garcia-Ayuso, L.E. (2005). High performance liquid chromatography postcolumn chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl) phenyl] oxalate as chemiluminescent reagent. *J. Chromatogr. A*, 1095: 60–67.
- Spengler, B., Cotter, R.J. (1990) Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis. *Analytical Chemistry*, 62:793.
- Stoev, G., Michailova, A. (2000). Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 871:37–42.
- Sun, J. L., Liu, C., Song, Y., Li, J. (2012). Screening 36 veterinary drugs in animal origin food by LC/MS/MS combined with modified quechers methods. Agilent Technologies Co. Ltd., <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-0013EN.pdf>.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J. (2003). *Introduction to modern liquid chromatography*, Second Ed. A Wiley-Interscience Publication.

- Şanlı, N. (2007). Bazı sülfonamitlerin sıvı kromatografi yöntemi ile tayini. Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Tamura, H., Yotoriyama, M., Kurosaki, K., Shinohara, N. (1994). High performance liquid chromatographic analysis of sulfonamides in livestock products using matrix solid-phase dispersion (MSPD) method with silica gel. J. Food Hyg. Soc. Japan, 35: 271–275.
- Tashakkori, P. (2013). Extraction of sulfonamides from honey using admicelle solid phase extraction sorbent prior to liquid chromatographic determination. Yüksek lisans tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Taşçı, F. (2016). Gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda antibiyotik kullanımının halk sağlığı üzerine etkileri. Ayrıntı Dergisi. Cilt 4. Sayı 45.
- Taylor, P. (2005). Matrix effect: The Achilles heel of quantitative high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. Clinical Biochemistry 38: 328–334.
- Thomas, M.H., Soroka, K.E., Thomas, S.H. (1983). Quantitative thin layer chromatographic multi-sulfonamide screening procedure. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66: 881–883.
- Tölgyesi, A., Berky, R., Bekesi, K., Fekete, S., Fekete, J., Sharma, V. (2013). Analysis of sulfonamide residues in real honey samples using liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry dedection. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 36:1105–1125.
- Trathnigg, B., Fradyl, S. ve Veronik, M. (2004). Thermodynamic Study of Retention in Liquid Exclusion-Adsorption Chromatography, Journal of Chromatography A, 1038, 43–52.
- Tsai, S.C., Rau, Y.H., Hsu, S.C., Chou, C.C., Fu, W. (1998). Development of a high performance liquid chromatographic method for detection of sulfonamide residues in egg. J. Food Drug Anal., 6: 509–510.
- Ueno, R., Uno, K., Kato, M., Kubota. S.S., Aoki, T. (1991). Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine and their N4-acetylated forms in fish tissues by high performance liquid chromatography. Nippon Suisan Gakkaishi, 57: 549–554.
- Uludağ, R. (2008). Ege bölgesinde tüketime sunulan ballarda sülfonamid kalıntılarının araştırılması. Yüksek lisans tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Van Eeckhout, N.J., Castro, P.J., van Peteghem, C.H. (2000). Determination of eight sulfonamides in bovine kidney by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line extraction and sample clean-up. Rapid Commun. Mass Spectrom. 14:2331.
- van Rhijn, J.A., Lasaroms, J.J.P., Berendsena, B.J.A., Brinkmanb, U.A.T. (2002). Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of selected sulfonamides in milk. J. Chromatogr. A, 960: 121–133.
- Van Vaeck, L., Adriaens, A., Gijbels, R. (1999). Static secondary ion mass spectrometry: (S-SIMIS) Part 1. Methodology and structural information. Mass Spectrom. Rev., 18 (1):1–47.

- Vandenburg, H.J., Clifford, A. A., Bartlr, K. D., Shuang, A. Z. (1998). Factors affecting high-pressure solvent extraction (accelerated solvent extraction) of additives from polymers Analytical Chemistry, pp. 1943–1948.
- Verzegnassi, L., Stadler, R.H. (2002). A pplication of liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. Journal of Chromatography A, 977: 77-87.
- Vin~ as, P., Lo’pez Erroz, C., Campillo N., and Herna’ndez-Co’rdoba, M. (1996). Determination of sulfonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization. J. Chromatogr. A, 726: 125–131.
- VİSAD. (2006). IX. Kalkınma planı ilaç sanayii özel ihtisas komisyonu. Veteriner ilaç sanayi alt çalışma grubu (VİSAD) raporu.
- Yarsan (2013).Veteriner hekimlikte antibiyotikler (Pratik Bilgiler Rehberi). <http://www.vetfarmatoks.org.tr/antibiyotikkitaptanitim.pdf>
- Yarsan (2012). Hayvansal gıdalarda kalıntı sorunu. Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği. http://www.vetfarmatoks.org.tr/EYarsan_Kalinti.pdf
- Yılmaz, Ö. (2011). Sülfonamit yapısı üzerinden sülfoniltiyöüre ve 4-tiyazolidon bileşikleri sentezi ve biyolojik etkileri. Doktora tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Wang, S., Zhang, H., Wang, L., Duan, Z., Kennedy, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. Food Additives and Contaminants, 23(4): 362–384.
- Wang, H., Xu, Y., Song, W., Zhao, Q., Zhang, X., Zeng, Q., Chen, H. Ding, L., Ren, N. (2011). Automatic sample preparation of sulfonamide antibiotic residues in chicken breast muscle by using dynamic microwave-assisted extraction coupled with solid-phase extraction. J. Sep. Sci. 34 2489–2497.
- Watters, R. L., Eberhardt, K. R., Beary, E.S., Fassett, J. D., (1997). Protocol for isotope dilution using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for the determianation of inorganic elements. Metrologia, 34:87-96.
- Webb, K.S., ve Carter D. (1997). The Role of Isotope Dilution Mass Spectrometry in the Development of Tandem Mass Spectrometry, 11:155-158.
- Weijlard, J., Tishler, M., Erickson, A.E. (1945). Some New Aminopyrazines and their Sulfanilamide Derivatives. Journal of American Chem Soc., 67: 802-806.
- Wen, Y., Zhang, M., Zhao, Q., Feng, W.Q. (2005). Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem., 53: 8468–8473.
- Weiss C., Conte A., Milandri C., Scortichini G., Semprini P., Usberti R., Migliorati, G. (2007). Veterinary drugs residue monitoring in Italian poultry: Current strategies and possible developments. Food Cont., 18, 1068-1076.
- Werner, P.A., Brand, W.A. (2001). Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis, Rapid Commun. Mass Spectrom, 15:501-519.

- White, DG. (1998). Comparison of danfloxacin with baquiloprim/sulphadimidine for the treatment of experimentally induced *Escherichia coli* diarrhoea in calves. Vet. Rec. 143:273.
- Wu, Y., Liu, S., Shan, J., and Wang, H. (2005). Simultaneous determination of sulfonamide residues in chicken liver by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. Fenxi Huaxue, 33: 1713–1716.
- Xu, Z., Song, C., Hu, Y., Li, G. (2011). Molecularly imprinted stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography for trace analysis of sulfa drugs in complex samples. Talanta 85:97–103.
- Yang, T.C.C., Yang, I.L., Liao, L.J. (2005). Determination of sulfonamide residues in milk by on-line microdialysis and HPLC. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 27: 501–510.
- Yazar, E. (2009). Antibiyotikler. 17–37. Alınmıştır: E. Yazar (Ed), Veteriner İlaç, 3. Baskı, Nobel Matbaacılık, İstanbul.
- Yibar, A., Çetinkaya F., Soyutemiz G.E. (2012). Nitrofuran metabolite 3-amino-2-oxazolidinone residues in chicken liver. Asian J. Anim. Vet. Adv., 7:346-350.
- Yibar, A., Soyutemiz, E. (2013). Gıda değeri olan hayvanlarda antibiyotik kullanımı ve muhtemel kalıntı riski. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Dergisi, 8(1): 97-104.
- Zengxuan C., Yu Z., Hongfeng P., Xiaowei T., Yiping R. (2008). Simultaneous determination of 24 sulfonamide residues in meat by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1200: 144–155.
- Zotou, A., Vasiliadou, C. (2010). LC of sulfonamide residues in poultry muscle and eggs extracts using fluorescence pre-column derivatization and monolithic silica column. J. Sep. Sci. 33:11–22.

7.EKLER

EK-1

Sütte 14 Adet Sülfonamid Bileşiklerinin Tayinine Yönelik Metodun Tekrarlanabilirlik / Ara Kesinlik Ölçüm Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirmeler

Sülfamerazin için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	20,98	19,80		17,82	16,01		17,36	20,21	
2. gün	22,20	17,94	19,13	19,76			19,57	19,64	17,87
3. gün	22,20	18,43	19,41	19,24	18,93	20,51	22,34		22,41
4. gün	18,15	18,85		20,23	17,73		20,58	19,83	
5. gün	19,72	19,49	18,37	22,57	20,03	19,43	19,63	20,85	18,21

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	6	112,1789591	18,69649	3,697908
Satır 2	7	136,1172931	19,44533	2,097404
Satır 3	8	163,4714655	20,43393	2,778272
Satır 4	6	115,3718355	19,22864	1,349004
Satır 5	9	178,3037039	19,81152	1,705606

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	11,8584157	4	2,964604	1,296016	0,293113	2,67867
Gruplar İçinde	70,9117399	31	2,287475			
Toplam	82,7701556	35				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%7,72
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,38

Sülfadiazin için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün		19,80	17,82	16,01	17,36	20,21			
2. gün	17,92		19,19	17,58	18,70	18,51	18,81	20,01	18,59
3. gün	19,20	18,09	19,99	20,71	17,64	19,32	19,49	17,86	18,89
4. gün	18,73	18,54	21,24	19,79	19,38	18,70			
5. gün	18,45	20,52	18,57	18,82	20,52	19,61		20,38	18,18

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	5	91,1975	18,2395	3,056065
Satır 2	8	149,302345	18,66279	0,553573
Satır 3	9	171,19505	19,02167	1,035047
Satır 4	6	116,382308	19,39705	1,044322
Satır 5	8	155,066576	19,38332	0,990795

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	5,906717	4	1,476679	1,252902	0,309409	2,678667
Gruplar İçinde	36,536826	31	1,178607			
Toplam	42,443543	35				

U _{tekrarlanabilirlik}	%6,21
U _{ara kesinlik}	%0,17

Sülfisoksaazol için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	16,64	15,66			16,99		20,39		
2. gün	17,44	18,09	17,77	19,25	18,56	17,61	18,47	18,90	18,18
3. gün	18,68	19,38	19,20	18,19	19,40	17,35	17,41	20,13	18,79
4. gün	19,76	18,10		19,58	18,29		19,32	20,07	
5. gün	19,41	18,65	17,57	20,51	20,80	17,00	21,79		19,14

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	4	69,69090633	17,42273	4,241522
Satır 2	9	164,281801	18,25353	0,361009
Satır 3	9	168,5367542	18,72631	0,873928
Satır 4	6	115,1205559	19,18676	0,653336
Satır 5	8	154,8926393	19,36158	2,662444

ANOVA

Varyans						
Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar						
Arasında	13,2363	4	3,309074	2,304791	0,08048	2,678667
Gruplar İçinde	44,5079	31	1,435737			
Toplam	57,7441	35				

U _{tekrarlanabilirlik}	%7,69
U _{ara kesinlik}	%1,11

Sülfametoksazol için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	22,00	17,42	19,61	16,62	17,19	18,51			
2. gün	18,88	21,54	19,15	19,64	21,17	19,39	18,17	18,90	17,89
3. gün	19,37	17,39	18,88	17,05	16,82	19,02	17,04	16,80	18,10
4. gün	21,35	17,76	16,48	16,50	18,21	18,16			
5. gün	19,72	19,68	18,51		19,23	17,94	21,38	20,35	18,77

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	6	111,345377	18,55756	3,985538
Satır 2	9	174,738689	19,41541	1,51894
Satır 3	9	160,471085	17,83012	1,06236
Satır 4	6	108,46437	18,07739	3,180808
Satır 5	8	155,580708	19,44759	1,193083

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	18,33518	4	4,583794	2,333126	0,076146	2,658867
Gruplar İçinde	64,83372	33	1,964658			
Toplam	83,16889	37				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%10,51
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%1,56

Sülfatiazol için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	17,98	15,83	18,04	17,00	18,10	16,84			
2. gün	17,94	17,79	17,99	17,98	19,35	18,50	17,53	19,78	18,02
3. gün	18,96	17,27	18,91	18,81	18,39	18,23	18,34	18,76	17,73
4. gün	20,51	18,03	19,08	16,52	19,34	18,63			
5. gün	20,19	18,44	17,10	19,56	18,51	17,61	18,40	17,46	17,85

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	6	103,7871028	17,29785046	0,822507
Satır 2	9	164,8552243	18,31724714	0,574299
Satır 3	9	165,3986229	18,37762477	0,3286
Satır 4	6	112,1141608	18,68569347	1,809089
Satır 5	9	165,1205701	18,34673001	1,007754

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasınd	6,844239	4	1,7110	2,045340	0,109972	2,649894
Gruplar İçinde	28,443207	34	0,836565			
Toplam	35,287446	38				

$U_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%4,59
$U_{\text{ara kesinlik}}$	%0,53

Sülfadimetoksin için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün				23,00		23,03			
2. gün	20,01	20,38	19,73	19,19	20,75	19,22	17,98	19,68	19,78
3. gün	18,34	18,10	19,30	18,57	18,21	19,03	17,48	20,11	19,26
4. gün	19,60	18,48	19,27	19,32	19,95	19,68			
5. gün		19,54	17,93		19,90	18,84		18,73	18,26

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	2	46,03358233	23,01679	0,0005639
Satır 2	9	176,7269307	19,63633	0,6346589
Satır 3	9	168,4095484	18,71217	0,6260507
Satır 4	6	116,304846	19,38414	0,2575089
Satır 5	6	113,1960233	18,866	0,5586465

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	32,634870	4	8,158718	15,549171	0,000001	2,727765
Gruplar İçinde	14,167017	27	0,524704			
Toplam	46,801887	31				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%2,71
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%4,37

Sülfapridin için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	17,88	17,50	22,22	18,30	19,67	16,61			
2. gün			19,90	21,27	20,50	19,34	20,63	20,60	18,43
3. gün	17,61	18,53	21,18	18,78	18,69	19,38	17,17	18,23	20,11
4. gün	18,63	20,01			20,73		19,02	17,33	
5. gün		19,24	18,97		18,77	19,11		19,17	

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	6	112,1812787	18,69688	3,991558
Satır 2	7	140,6604641	20,09435	0,910518
Satır 3	9	169,6656529	18,85174	1,524483
Satır 4	5	95,72662289	19,14532	1,712345
Satır 5	5	95,2579485	19,05159	0,0346

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	8,308717415	4	2,077179	1,257357	0,31091	2,727765
Gruplar İçinde	44,60453264	27	1,65202			
Toplam	52,91325006	31				

U _{tekrarlanabilirlik}	%8,62
U _{ara kesinlik}	%0,25

Sülfametizol için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	18,10				17,66		18,13		
2. gün	19,23		17,66	18,54		19,16	18,47		16,51
3. gün	18,10	19,02	18,35	19,15	16,56	19,06	17,68	18,10	17,28
4. gün	18,39	18,30			19,66		19,26	18,36	
5. gün	19,44	18,54		19,97	18,68		23,65	19,10	16,20

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	3	53,89409528	17,9647	0,068557
Satır 2	6	109,5736841	18,26228	1,057598
Satır 3	9	163,2922131	18,14358	0,767442
Satır 4	5	93,97770062	18,79554	0,388087
Satır 5	7	135,584071	19,36915	4,995567

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	8,008501	4	2,002125	1,161584	0,351372	2,75871
Gruplar İçinde	43,0904	25	1,723616			
Toplam	51,0989	29				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%9,29
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,17

Sülfadoksin için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	18,10				17,66		18,13		
2. gün	19,23		17,66	18,54		19,16	18,47		16,51
3. gün	18,10	19,02	18,35	19,15	16,56	19,06	17,68	18,10	17,28
4. gün	18,39	18,30			19,66		19,26	18,36	
5. gün	19,44	18,54		19,97	18,68		23,65	19,10	16,20

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	6	116,7301089	19,45502	1,155244
Satır 2	9	183,1505894	20,35007	0,427402
Satır 3	9	170,3820938	18,93134	0,264499
Satır 4	5	99,7802586	19,95605	4,25931
Satır 5	8	147,9155436	18,48944	7,862952

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	18,2967	4	4,574183	1,755307	0,162292	2,668437
Gruplar İçinde	83,3893	32	2,605917			
Toplam	101,686	36				

$U_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%13,43
$U_{\text{ara kesinlik}}$	%1,13

Sülfakloropridazin için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	15,35	15,10		18,65	18,38		16,45		
2. gün	19,71	19,20	18,51	19,92	19,50	17,42	17,96	20,86	20,79
3. gün	18,02	16,51	18,77	17,79	16,49	18,80	17,64	17,75	20,09
4. gün	16,10	16,76			17,73		19,38	18,18	
5. gün	17,22	18,74	17,18	23,76	18,93	18,01	19,63	19,99	17,07

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	5	83,94481643	16,78896	2,755895
Satır 2	9	173,866324	19,31848	1,399373
Satır 3	9	161,8580949	17,98423	1,29096
Satır 4	5	88,14746783	17,62949	1,618236
Satır 5	9	170,524249	18,94714	4,414303

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	27,62463	4	6,906158	2,973043	0,03399	2,668437
Gruplar İçinde	74,33362	32	2,322926			
Toplam	101,9583	36				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%12,67
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%2,78

Sülfafenazol için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	17,89	17,61		18,82	17,83		16,82	15,26	
2. gün	20,19	20,08	18,29	19,43	17,46	18,87	20,13	19,26	20,07
3. gün	17,20	19,15	17,28	19,44	18,53	17,03	18,66	18,37	17,41
4. gün	18,78	17,84		19,16	17,25		19,68	17,14	
5. gün	17,24	19,39	18,31	21,08	19,49	18,42	18,44	17,44	17,72

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	6	104,2092564	17,36821	1,480693
Satır 2	9	173,7738026	19,3082	0,911743
Satır 3	9	163,0611021	18,1179	0,821128
Satır 4	6	109,8604103	18,31007	1,106933
Satır 5	9	167,5323952	18,61471	1,45791

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	Df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	14,97269	4	3,743173	3,308721	0,021545	2,649894
Gruplar İçinde	38,46438	34	1,131305			
Toplam	53,43707	38				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%6,14
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%1,58

Sülfametazin için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	18,66	15,13	19,70	17,39		17,55			
2. gün	18,74	18,44	20,44	18,42	20,05	19,64	18,10	17,62	19,39
3. gün	19,08	19,38	21,50	19,33	15,94	18,98	17,96	18,66	17,83
4. gün	15,41	18,90			18,12		18,52	18,16	
5. gün	23,13	19,85	17,57		21,38	18,39		20,12	17,98

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	5	88,42681083	17,68536	2,904049
Satır 2	9	170,8347083	18,98163	0,894161
Satır 3	9	168,6640968	18,74046	2,225389
Satır 4	5	89,12262634	17,82453	1,91716
Satır 5	7	138,4270427	19,77529	3,995126

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	Df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	17,77491073	4	4,443728	1,954375	0,127142	2,689628
Gruplar İçinde	68,21199409	30	2,273733			
Toplam	85,98690483	34				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%12,14
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%1,29

Sülfakuinoksalin için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün				17,71	18,87		20,36		
2. gün	17,63	18,07	17,63	17,73	19,56	17,85	17,12	18,12	17,85
3. gün	17,83		18,44	17,69	18,17	18,68	17,64	17,57	18,25
4. gün	19,38	17,43					18,87	17,78	
5. gün	19,86	17,89	17,21	18,92	17,60	17,85	19,37	18,28	18,04

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	3	56,93640576	18,9788	1,763929
Satır 2	9	161,5726172	17,95251	0,45091
Satır 3	8	144,2772149	18,03465	0,167918
Satır 4	4	73,45439354	18,3636	0,827407
Satır 5	9	165,0177337	18,3353	0,756527

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	2,848253	4	0,712063	1,183602	0,339509	2,714076
Gruplar İçinde	16,845	28	0,601607			
Toplam	19,69325	32				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%3,30
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,07

Sülfametoksipridazin için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	16,79	17,36		19,43	19,67		19,58	17,63	
2. gün	18,60	18,40		19,53	17,38	19,81	19,53	19,72	20,51
3. gün	18,99	18,23	20,21	18,17	16,90	17,35	18,78	19,19	20,76
4. gün	19,74	19,08		19,21	20,21		18,99	18,31	
5. gün	18,65	18,48	18,88	18,45	18,81	17,54	18,58	19,01	16,26

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	6	110,4659432	18,41099	1,660417
Satır 2	8	153,4759627	19,1845	0,981619
Satır 3	9	168,5755752	18,73062	1,551191
Satır 4	6	115,5285069	19,25475	0,429163
Satır 5	9	164,642333	18,29359	0,759114

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	Df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	5,605713294	4	1,401428	1,291759	0,293311	2,658867
Gruplar İçinde	35,8016714	33	1,084899			
Toplam	41,4073847	37				

$U_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%5,78
$U_{\text{ara kesinlik}}$	%0,19

EK-2**Sütte 14 Adet Sülfonamid Bileşiğinin Geri Kazanım Ölçüm Sonuçları**

Alt seviye standart eklenmiş (15 ppb) örnek için geri kazanım değerleri (%)

	SMR	SDZ	SIX	SMX	STZ	SDM	SP	SMT	SDO	SCP	SNZ	SMZ	SQX	SMP
1. Gün	104,15	108,66	105,02	100,57	107,73	110,33	109,94	99,28	113,86	102,22	108,38	99,99	103,04	102,36

Orta seviye standart eklenmiş (25 ppb) örnek için geri kazanım değerleri (%)

	SMR	SDZ	SIX	SMX	STZ	SDM	SP	SMT	SDO	SCP	SNZ	SMZ	SQX	SMP
1. Gün	99,68	112,64	89,84	98,98	93,88	120,97	101,14	92,13	111,52	98,71	92,18	85,86	97,46	98,62
2. Gün	102,4	99,23	94,53	100,31	93,32	101,29	108,19	94,95	113,04	100,03	99,32	98,49	97	103,54
3. Gün	107,6	103,28	101,23	96,22	100,90	100,78	98,30	98,32	109,81	97,28	97,26	101,53	101,26	101,57
4. Gün	99,85	101,15	100,37	98,45	100,58	101,01	99,22	95,42	105,85	95,84	95,57	97,88	99,13	98,47
5. Gün	101,8	98,68	99,87	102,42	95,89	98,58	97,83	95,76	112,78	97,51	95,22	105,71	98,47	94,47
Ort	102,26	103	97,17	99,28	97,51	104,52	101,02	95,30	110,6	95,86	95,91	97,90	98,66	99,33
SD	3,21	5,69	4,87	2,29	3,62	9,26	4,25	2,21	2,95	1,58	2,64	7,41	1,67	3,45

Üst seviye standart eklenmiş (40 ppb) örnek için geri kazanım değerleri (%)

	SMR	SDZ	SIX	SMX	STZ	SDM	SP	SMT	SDO	SCP	SNZ	SMZ	SQX	SMP
1. Gün	109,75	106,21	94,61	102,03	96,37	102	101,58	94,13	112,78	98,13	93,07	90,85	96,75	93,94

EK-3

Sütte 14 Adet Sülfonamid Bileşiklerinin Tayinine Yönelik Metodun Sağlamlık Testi Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfamerazin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	0,204865	1,746794	0,224194
F_{kritik}	0,264058	4,206658	0,290858
t_{deneyssel}	0,248175	0,062424	0,496354
t_{kritik}	2,228139	2,160369	2,144787

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfadiazin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	2,326521	1,746613	2,23125
F_{kritik}	3,787044	3,438101	3,787044
t_{deneyssel}	0,770965	0,078346	0,830402
t_{kritik}	2,178813	2,13145	2,178813

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfisoksazol miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	1,505287	1,096303	1,770927
F_{kritik}	4,146804	3,725725	4,206658
t_{deneyssel}	0,755516	0,019992	0,987742
t_{kritik}	2,144787	2,13145	2,160369

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfametoksazol miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	1,298952	1,180745	0,544184
F_{kritik}	5,050329	3,725725	0,598007
t_{deneyssel}	0,446392	0,058644	0,765724
t_{kritik}	2,228139	2,13145	2,178813

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfatiazol miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	2,371319	0,115487	1,96968
F_{kritik}	3,725725	0,207541	3,438101
t_{deneyssel}	0,474295	0,195741	0,496354
t_{kritik}	2,144787	2,200985	2,144787

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfadimetoksin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	5,134452	0,232277	1,116709
F_{kritik}	6,388233	0,268404	5,050329
t_{deneyssel}	0,218302	0,596184	0,130391
t_{kritik}	2,446912	2,178813	2,228139

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfapridin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	2,066765	2,1319	1,340633
F_{kritik}	4,283866	3,687499	3,787044
t_{deneyssel}	0,00524	0,033309	0,105029
t_{kritik}	2,200985	2,306004	2,144787

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfametizol miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	1,599939	1,708595	2,298112
F_{kritik}	3,725725	3,837853	4,387374
t_{deneyssel}	0,935725	0,635441	0,020165
t_{kritik}	2,13145	2,364624	2,306004

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfakloropridazin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	2,858329	0,570136	2,441788
F_{kritik}	6,094211	0,268404	3,971523
t_{deneyssel}	0,125466	0,039833	0,420202
t_{kritik}	2,200985	2,13145	2,306004

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfadoksin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	1,613407507	0,273999169	0,101631809
F_{kritik}	6,094210926	0,290858219	0,112527166
t_{deneyssel}	0,915586238	0,959901339	0,528169201
t_{kritik}	2,228138852	2,17881283	2,262157163

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfafenazol miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	3,580728	0,901801	3,190772
F_{kritik}	4,387374	0,290858	4,387374
t_{deneyssel}	0,304379	0,092214	0,014703
t_{kritik}	2,262157	2,119905	2,306004

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfametazin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	0,255092	1,293126	1,024025
F_{kritik}	5,050329	3,725725	4,875872
t_{deneyssel}	0,566616	0,77124	0,743596
t_{kritik}	2,262157	2,13145	2,200985

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfakuinoksalin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	1,410629	2,761604	2,260786
F_{kritik}	9,013455	3,438101	9,013455
t_{deneyssel}	0,354116	0,953935	0,825874
t_{kritik}	2,364624	2,160369	2,306004

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen süt örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfametoksipridazin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Süt miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	0,193462	0,181251	2,300184
F_{kritik}	0,227927	0,237718	3,787044
t_{deneyssel}	0,435185	0,364619	0,002802
t_{kritik}	2,364624	2,228139	2,178813

EK-4

Ette 12 Adet Sülfonamid Bileşiklerinin Tayinine Yönelik Metodun Tekrarlanabilirlik / Ara Kesinlik Ölçüm Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirmeler

Sülfamerazin için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün		17,20	19,45	17,31	19,22	20,46	18,07	20,16	17,11
2. gün	21,40	17,55	19,18	17,22	16,61	17,96	19,68	18,55	16,77
3. gün	16,26	20,33	21,24	18,57	20,48			19,57	19,84
4. gün	18,58	18,49	21,21	17,46	17,58	19,92	19,56		
5. gün	20,53			21,21	16,51	19,93	18,49	17,54	

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	8	148,977911	18,62224	1,873044
Satır 2	9	164,936167	18,32624	2,422717
Satır 3	7	136,299857	19,47141	2,687246
Satır 4	7	132,796433	18,97092	1,811085
Satır 5	6	114,213871	19,03565	3,332954

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	5,894708	4	1,473677	0,619291	0,652005	2,668437
Gruplar İçinde	76,147796	32	2,379619			
Toplam	82,042504	36				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%12,63
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,53

Sülfadiazin için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	21,72	21,56	17,76	20,73		21,41	21,24	20,13	19,59
2. gün	20,62				20,21	18,40	19,15	19,87	17,55
3. gün	21,69		19,07	16,69	21,83		20,99	16,72	21,49
4. gün	21,23	22,07	17,64	21,14	18,07	18,52	19,65	20,73	
5. gün	21,92	17,58		19,00	17,53	21,39	19,41		

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	8	164,160659	20,52008	1,787637
Satır 2	6	115,808999	19,3015	1,359999
Satır 3	7	138,481681	19,7831	5,271176
Satır 4	8	159,041745	19,88022	2,731798
Satır 5	6	116,834131	19,47236	3,44479

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	6,28642	4	1,571606	0,54015	0,707392	2,689628
Gruplar İçinde	87,2870443	30	2,909568			
Toplam	93,57346648	34				

U _{tekrarlanabilirlik}	%14,67
U _{ara kesinlik}	%0,75

Sülfisoksazol için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün		21,18		21,81	21,19	20,43	20,97		21,91
2. gün	23,43	22,87	18,93	19,78	22,22	19,99	20,34	21,65	18,25
3. gün	20,20	22,99	21,74	19,37	22,62	19,67	19,35		23,33
4. gün		22,06	22,59	21,59	20,11	20,90		20,67	21,37
5. gün	22,32		22,54	20,38	17,56		17,70	18,99	

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	6	127,4890029	21,24817	0,302778
Satır 2	9	187,4533408	20,82815	3,23033
Satır 3	8	169,2662601	21,15828	2,882336
Satır 4	7	149,2995145	21,3285	0,716435
Satır 5	6	119,4970776	19,91618	4,831319

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	8,3900039	4	2,097501	0,855694	0,50123	2,678667
Gruplar İçinde	75,988093	31	2,451229			
Toplam	84,378097	35				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%11,72
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,19

Sülfametoksazol için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	20,91	22,76	20,82	22,91	23,66	22,18		19,69	22,20
2. gün	18,98	21,78	19,01		23,38	23,59		21,01	19,39
3. gün	20,46		22,63	22,92			21,51		22,34
4. gün	22,31	21,90	18,74		19,75	21,84	20,81	18,90	20,75
5. gün	23,30		19,68						

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	8	175,1216626	21,89021	1,722069
Satır 2	7	147,1306473	21,01866	3,932413
Satır 3	5	109,8524705	21,97049	0,995484
Satır 4	8	165,0048518	20,62561	1,897017
Satır 5	2	42,9796686	21,48983	6,552868

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	9,259598532	4	2,3149	0,973254	0,439704	2,75871
Gruplar İçinde	59,46288357	25	2,378515			
Toplam	68,72248211	29				

U _{tekrarlanabilirlik}	%11,15
U _{ara kesinlik}	%0,03

Sülfatiazol için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	21,59	20,63	21,73		21,09	20,41	19,56	21,25	22,11
2. gün	22,00	21,30	20,41	19,30	22,30		22,08	20,39	
3. gün	19,91	22,72	21,75	22,77	21,87	22,55	20,37	19,94	20,62
4. gün	21,70	21,25			21,13	22,57	21,91	21,88	
5. gün	22,15		21,19				22,66		

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	8	168,3733775	21,04667	0,671722
Satır 2	7	147,7846286	21,11209	1,246341
Satır 3	9	192,5073245	21,3897	1,41309
Satır 4	6	130,4504464	21,74174	0,270534
Satır 5	3	66,00218276	22,00073	0,55702

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	3,327788148	4	0,831947	0,897616	0,47855	2,714076
Gruplar İçinde	25,95152649	28	0,92684			
Toplam	29,27931463	32				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%4,34
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,01

Sülfapridin için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	23,66		22,84	20,49	21,78		21,32	22,27	
2. gün	23,81	20,33	20,79		19,05		22,62	21,61	20,67
3. gün			23,19			22,22			21,73
4. gün		22,67	21,74						22,86
5. gün	23,50	19,96			21,86				

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	6	132,347104	22,05785	1,261172
Satır 2	7	148,871948	21,26742	2,467761
Satır 3	3	67,1375707	22,37919	0,552931
Satır 4	3	67,2731316	22,42438	0,358506
Satır 5	3	65,3226662	21,77422	3,124194

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	4,479182848	4	1,119796	0,6523	0,633129	2,964708
Gruplar İçinde	29,18368539	17	1,716687			
Toplam	33,66286824	21				

u _{tekrarlanabilirlik}	%7,85
u _{ara kesinlik}	%0,03

Sülfametizol için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	22,68	19,59	20,65	22,71	22,11	20,56	22,23	22,71	22,43
2. gün	21,77	21,40	20,29	22,62		19,29	22,40	21,40	20,05
3. gün	21,90	22,72		21,69	22,06		20,80		
4. gün	23,13	21,49	21,07	20,45	19,18	18,32	19,62	21,27	23,51
5. gün	20,68			20,53			19,91	20,20	23,08

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	9	195,6760951	21,74179	1,348464
Satır 2	8	169,2187236	21,15234	1,377819
Satır 3	5	109,1738535	21,83477	0,481431
Satır 4	9	188,0389081	20,89321	2,969015
Satır 5	5	104,3863163	20,87726	1,604382

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	5,741135	4	1,435284	0,847052	0,506286	2,678667
Gruplar İçinde	52,52782	31	1,694446			
Toplam	58,26895	35				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%7,96
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,14

Sülfadoksin için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün				24,15	22,78	23,53		25,48	23,92
2. gün			22,11	22,74	23,72	22,97	19,76	24,81	22,84
3. gün	21,24	19,98	21,61		21,87	22,31	25,60		22,37
4. gün	21,79	24,19	24,41	22,68	24,30	22,92	22,43	22,33	22,72
5. gün	24,02	18,11		22,91	18,88	25,35		24,90	

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	5	119,8503271	23,97007	0,97741
Satır 2	7	158,9466232	22,70666	2,431262
Satır 3	7	154,9900404	22,14143	2,981757
Satır 4	9	207,7859882	23,08733	0,934424
Satır 5	6	134,1657667	22,36096	9,719609

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	11,83324383	4	2,958311	0,92786	0,461402	2,701399
Gruplar İçinde	92,46118657	29	3,188317			
Toplam	104,2944304	33				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%13,97
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,11

Sülfakloropridazin için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	22,56					22,96		21,54	
2. gün	19,98	23,03	20,16		22,29	20,54	22,22	19,80	19,06
3. gün	19,77	24,39	22,38	20,42	20,74	24,24	21,31	23,27	19,41
4. gün	22,91	18,76	21,30	22,76	22,81	22,61	22,13	19,72	21,03
5. gün				23,26	20,34	19,07			

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	3	67,04968231	22,34989	0,536515
Satır 2	8	167,0803358	20,88504	2,040608
Satır 3	9	195,9376124	21,77085	3,537262
Satır 4	9	194,0209379	21,55788	2,229347
Satır 5	3	62,67503848	20,89168	4,631316

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	6,945107669	4	1,736277	0,662581	0,623388	2,727765
Gruplar İçinde	70,75279262	27	2,620474			
Toplam	77,69790029	31				

$U_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%12,21
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,46

Sülfametazin için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	22,76	22,70			23,55			22,56	
2. gün	20,81		22,18			21,24	22,65		
3. gün	19,90			23,78	23,50	23,64		21,13	
4. gün	23,67					23,43		23,52	
5. gün	26,34	23,11		20,58	22,38	22,65		16,91	20,13

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	4	91,55540631	22,88885	0,2003
Satır 2	4	86,8790766	21,71977	0,712441
Satır 3	5	111,9405184	22,3881	3,133462
Satır 4	3	70,62048807	23,54016	0,015557
Satır 5	7	152,0980954	21,7283	8,604854

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	9,672739973	4	2,418185	0,650319	0,634001	2,927744
Gruplar İçinde	66,93230892	18	3,718462			
Toplam	76,6050489	22				

U _{tekrarlanabilirlik}	%16,67
U _{ara kesinlik}	%0,07

Sülfakuinoksalin için tekrarlanabilirlik / ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	21,63	21,73	22,28	19,80	21,36	21,06	22,02	21,71	20,39
2. gün	19,32			19,78	20,63		17,89	18,72	
3. gün	15,44	22,12	17,96		22,31	23,93		21,53	22,69
4. gün		22,09	20,98		20,34	20,20	23,70	20,84	21,52
5. gün	24,89	18,14			17,14	22,76		19,87	23,86

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	9	191,975353	21,33059	0,63357
Satır 2	5	96,34109091	19,26822	1,079026
Satır 3	7	145,9804572	20,85435	9,1284
Satır 4	7	149,6752038	21,38217	1,471307
Satır 5	6	126,6564581	21,10941	10,12787

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	16,88737224	4	4,221843	0,990383	0,428393	2,701399
Gruplar İçinde	123,6222705	29	4,262837			
Toplam	140,5096427	33				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%20,40
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,02

Sülfametoksipridazin için tekrarlanabilirlik/ara kesinlik verileri ve ANOVA sonuçları

	Kütle Kesri (ng/g)								
	1. tekrar	2. tekrar	3. tekrar	4. tekrar	5. tekrar	6. tekrar	7. tekrar	8. tekrar	9. tekrar
1. gün	21,49	17,20	19,45	17,31	19,22	20,46	18,07	20,16	17,11
2. gün	21,40	17,55	19,18	17,22		17,96	19,68	18,55	
3. gün		20,33	21,24	18,57	20,48			19,57	19,84
4. gün	18,58	18,49	21,21	17,46	17,58	19,92	19,56		
5. gün	20,53			21,21	16,51	19,93	18,49	17,54	21,46

Anova: Tek Etken

ÖZET

Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
Satır 1	9	170,4668105	18,94076	2,551996
Satır 2	7	131,5498617	18,79284	2,085068
Satır 3	6	120,0370884	20,00618	0,822442
Satır 4	7	132,7964331	18,97092	1,811085
Satır 5	7	135,6745514	19,38208	3,617575

ANOVA

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	6,251653727	4	1,562913	0,69602	0,600474	2,678667
Gruplar İçinde	69,61055353	31	2,245502			
Toplam	75,86220726	35				

$u_{\text{tekrarlanabilirlik}}$	%11,71
$u_{\text{ara kesinlik}}$	%0,40

EK-5**Ette 12 Adet Sülfonamid Bileşiklerinin Tayinine Yönelik Metodun Geri Kazanım Ölçüm Sonuçları**

Alt seviye standart (15 ppb) eklenen örnek için geri kazanım değerleri

	SMR	SDZ	SIX	SMX	STZ	SP	SMT	SDO	SCP	SMZ	SQX	SMP
1. Gün	82,98	88,01	90,49	86,38	89,20	108,92	87,88	96,89	94,37	112,79	96,52	86,45

Orta seviye standart (25 ppb) eklenen örnek için geri kazanım değerleri

	SMR	SDZ	SIX	SMX	STZ	SP	SMT	SDO	SCP	SMZ	SQX	SMP
1. Gün	79,11	84,73	91,24	93,30	90,35	100,62	91,13	110,44	100,07	100,22	93,13	88,25
2. Gün	81,75	90,60	93,13	91,79	93,14	94,68	96,49	96,45	93,48	113,67	90,60	105,29
3. Gün	88,07	88,57	97,64	105,59	98,91	99,01	104,30	99,12	98,97	112,71	101,72	94,42
4. Gün	81,93	87,61	93,76	90,05	97,11	108,48	95,55	98,68	103,06	108,48	99,35	100,71
5. Gün	83,82	87,46	90,36	90,42	92,78	103,85	91,93	99,99	89,43	94,33	96,15	94,58
Ortalama	82,93	87,80	93,22	94,23	94,46	101,33	95,88	100,94	97,00	105,88	96,19	96,65
SD	3,32	2,12	2,83	6,48	3,47	5,19	5,23	5,47	5,47	8,36	4,51	6,54

Üst seviye standart (40 ppb) eklenen örnek için geri kazanım değerleri

	SMR	SDZ	SIX	SMX	STZ	SP	SMT	SDO	SCP	SMZ	SQX	SMP
1. Gün	82,30	90,60	97,30	94,66	99,52	104,47	94,45	113,7	104,7	101,15	96,35	92,65

EK-6

Ette 12 Adet Sülfonamid Bileşiklerinin Tayinine Yönelik Metodun Sağlamlık Testi
Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfamerazin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	1,30	0,07	0,21
F_{kritik}	3,44	0,27	0,24
t_{deneyssel}	0,004	0,85	0,14
t_{kritik}	2,12	2,26	2,18

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfadiazin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	1,11	0,1620	1,79
F_{kritik}	3,44	0,1622	3,44
t_{deneyssel}	0,78	0,05	0,13
t_{kritik}	2,12	2,31	2,13

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfisoksazol miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	2,94	2,66	1,33
F_{kritik}	3,69	3,58	3,58
t_{deneyssel}	0,06	0,52	0,69
t_{kritik}	2,36	2,26	2,18

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfametoksazol miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	3,27	0,11	1,06
F_{kritik}	3,5	0,26	4,21
t_{deneyssel}	0,39	0,9	0,35
t_{kritik}	2,20	2,36	2,16

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfatiazol miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	6,5	0,18	1,75
F_{kritik}	3,5	0,29	3,44
t_{deneyssel}	0,53	0,23	0,6
t_{kritik}	2,20	0,23	2,13

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfapridin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	0,14	0,18	1,58
F_{kritik}	0,16	0,26	4,15
t_{deneyssel}	0,25	0,33	0,91
t_{kritik}	2,23	2,31	2,12

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfametizol miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	2,03	0,19	8,96
F_{kritik}	3,44	0,26	3,97
t_{deneyssel}	0,1	0,62	0,71
t_{kritik}	2,14	2,2	2,45

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfakloropridazin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	2,50	0,20	0,15
F_{kritik}	3,44	0,23	0,24
t_{deneyssel}	0,27	0,32	0,65
t_{kritik}	2,14	2,3	2,26

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfadoksin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	1,47	2,97	0,22
F_{kritik}	3,73	4,15	0,27
t_{deneyssel}	0,01	0,84	0,12
t_{kritik}	2,13	2,16	2,18

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfametazin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	3,09	1,29	1,36
F_{kritik}	3,44	4,15	3,50
t_{deneyssel}	0,58	0,16	0,42
t_{kritik}	2,16	2,14	2,14

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfakuinoksalin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	3,20	0,23	2,92
F_{kritik}	3,58	0,26	4,21
t_{deneyssel}	0,88	0,85	0,8
t_{kritik}	2,26	2,31	2,20

Çözücü veya matriks miktarında değişiklik uygulanması ile elde edilen et örneğinin analizi sonucunda tayin edilen sülfametokspiridazin miktarlarının istatistiksel değerlendirilme sonuçları

	Çözücü veya matriks miktarında değişiklikler		
	ACN miktar değişimi	Et miktar değişimi	Hekzan miktar değişimi
F_{deneyssel}	3,39	2,62	1,36
F_{kritik}	3,58	4,15	3,50
t_{deneyssel}	0,15	0,66	0,42
t_{kritik}	2,26	2,16	2,14

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında, Üsküdar/İstanbul’da doğdu. 2006 yılında, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nden mezun oldu. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisansını tamamladı. 2011-2014 yılları arası Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nde Gıda Mühendisi olarak çalıştı. Halen Gebze İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü’nde çalışmaktadır.

