

**EGE ÜNİVERSİTESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BALIK ETİNDE MALAŞİT YEŞİLİ (MY) VE
LÖKOMALAŞİT YEŞİLİ (LMY) KALINTILARININ
BELİRLENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Rıdvan UYSALER

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 504.05.01

Sunuş Tarihi : 17.06.2010

Bornova-İZMİR

2010

III

Rıdvan UYSALER tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “ Balık Etinde Malaşit Yeşili (MY) ve Lökomaşit Yeşili (LMY) Kalıntılarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 17.06.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı :Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

.....

Raportör Üye:Prof. Dr. Yaşar HIŞIL

.....

Üye :Prof. Dr. H. Baha BÜYÜKİŞİK

.....

V
ÖZET

**BALIK ETİNDE MALAŞİT YEŞİLİ (MY) VE LÖKOMALAŞİT YEŞİLİ
(LMY) KALINTILARININ BELİRLENMESİ ÜZERİNE BİR
ARAŞTIRMA**

Rıdvan UYSALER

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

Mayıs 2010, sayfa

Bu araştırma gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) etinde malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır. Kalıntıların tespitinde Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı olan AFFSA'nın (Fougères, Fransa) kullandığı Likit kromatografi Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) analiz metodu kullanılmıştır. Metodun validasyonu 2002 tarihli 657 sayılı Avrupa Birliği direktiflerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Tespit limiti sırasıyla malaşit yeşili için tespit limiti 0,21 µg/kg, lökomalaşit yeşili için 0,10 µg/kg olarak, ölçüm limitleri ise sırasıyla malaşit yeşili için 0,43 µg/kg, lökomalaşit yeşili için 0,21 µg/kg olarak hesaplanmıştır.

Anahtar sözcükler: Malaşit yeşili, lökomalaşit yeşili, balık eti, kalıntı

VII
ABSTRACT

**A STUDY ON DETECTION OF MALACHITE GREEN (MY) AND
LEUCOMALACHITE GREEN (LMY) IN FISH MUSCLE**

UYSALER, Rıdvan

M.Sc. Thesis, Department of Aquaculture

Director of Thesis: Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

May 2010, pages

The research was carried out in order to determine malachite green and leucomalachite green residues in cultured , rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) meat. Determination of the residues were performed by Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS) technique which used by AFFSA (Fougères, France) which is the European Community Reference Laboratory for detection of malachite green and leucomalachite green residue. Metod validation study was made in according to European Community Commission decision 2002/657/EC. The limit of detection were found for malachite green 0,21 µg/kg, for leucomalachite green 0,10 µg/kg respectively and limit of quantification were found for malachite green 0,43 µg/kg , for leucomalachite green is 0,21 µg/kg respectively.

Key Words: Malachite green, leucomalachite green, fish muscle, residue

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince en büyük destekçim olan ve hiçbir konuda ilgi ve yardımını eksik etmeyen değerli hocam Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN'a, teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısı analizlerinin yapılmasında laboratuvar imkanlarından faydalanmamıza izin veren Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve Toksikoloji Laboratuvarı'na, özellikle bilgilerini ve analizler esnasında desteğini esirgemeyen Kimyager Güven Özdemir'e, teşekkürlerimi sunarım.

XI
İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
TABLolar DİZİNİ.....	XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XVII
1 GİRİŞ.....	1
2 LİTERATÜR BİLDİRİSİ.....	3
2.1 Malaşit Yeşili.....	3
2.2 Malaşit Yeşili Tuzları ve İyonizasyon.....	3
2.3 Malaşit Yeşilinin Çevresel Ortamdaki Davranışı.....	4
2.4 Malaşit Yeşilinin Akuakültürde Kullanım Alanları	5
2.5 Malaşit Yeşilinin Balıklar Üzerindeki Toksikolojik Etkileri.....	6
2.6 Malaşit Yeşilinin Farmokolojik Özellikleri.....	8
2.6.1 Absorpsiyon, dağılım, atılım ve metabolizma.....	8
2.7 Toksikolojik çalışmalar	11
2.7.1 Akut toksisite	11
2.7.2 Karsinojenite.....	16
2.7.3 Genotoksisite ve Mutajenite	19
2.7.4 Üreme toksisitesi	25
2.7.5 Spesifik Çalışmalar.....	25

XII

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.7.6 İnsanlar üzerindeki gözlenen etkiler	28
2.8 Yasal Düzenlemeler	29
2.9 Su Ürünlerinde Malaşit Yeşili Kalıntısının Tespitine Yönelik Analiz Çalışmaları	29
2.9.1 Numune hazırlama (Ekstraksiyon).....	29
2.9.2 HPLC Cihazı ve analiz sistemi	31
2.9.3 Post kolon oksidasyon reaktörleri	36
2.9.4 Kütle spektrometrisi	37
3 MATERYAL VE METOT	40
3.1 Numunelerin Alınması	40
3.2 Standart ve Kimyasallar	40
3.3 Cihaz ve Ekipmanlar	41
3.3.1 Tartım ve ekstraksiyon	41
3.3.2 Likit kromatografi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS).....	41
3.4 Standart ve Solüsyonların Hazırlanması	41
3.5 Blank ve Numunelerin Ekstraksiyonu	44
3.6 Standart Yüklenmiş Numunelerin Hazırlanması ve Ekstraksiyonu.....	45
3.7 LC-MS/MS’de Analiz.....	45
3.8 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	46
4. SONUÇLAR	47
4.1 Seçicilik ve Spesifiklik	47
4.2 Lineer Aralık	48
4.3 Doğruluk	49
4.4 Kesinlik	50

XIII

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4.1 Tekrarlanabilirlik	50
4.4.2 Tekrar üretilebilirlik	52
4.5 Tayin Limiti (LOD-Limit of Detection)	52
4.6 Ölçüm Limiti (LOQ- Limit of Quantification)	52
4.7 Tespit Kapasitesi (CC_{β})	53
4.8 Stabilite	53
5 TARTIŞMA	55
KAYNAKLAR DİZİNİ	62
5 ÖNERİLER	68
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Malaşit yeşili, karbinol formu ve lökomalaşit yeşili formunun kimyasal yapısı (Sudova <i>et al.</i> , 2007).	4
2.2 Malaşit yeşili veya lökomalaşit yeşili uygulanmış ratların karaciğerlerindeki demetilasyon metabolitleri (Culp <i>et al.</i> , 1999).....	10
2.3 Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin metabolik mekanizması (Culp <i>et al.</i> , 1999)	11
2.4 Solid Faz Ekstraksiyon (www.biogate.com).....	30
2.5 HPLC ünitesi Temel Diagramı (1) Solvent Şişesi (2)Fritli transfer hattı (3) Pompa (4) Enjektör (5) Kolon (Termostatlı) (6) Dedektör (7) Atık (8) Veri Değerlendirme (Meyer, 2004)	31
2.6 Ayırma işleminin grafiksel ifadesi (Meyer, 2004).....	33
2.7 Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili arasındaki oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonu (Long <i>et al.</i> , 2008)	36
2.8 Post Kolon Derivatizasyon HPLC Sisteminin Şeması (Long <i>et al.</i> , 2008)	36
4.1 Blank numunenin analizi sonucunda elde edilen kromatogram	48
4.2 Malaşit yeşiline ait kalibrasyon eğrisi.....	49
4.3 Lökomalaşit yeşiline ait kalibrasyon eğrisi.....	49
4.4 2 µg/kg konsantrasyonunda yüklenmiş numunenin kromatogramı	51

XVI
TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Malaşit yeşilinin farklı türler üzerindeki LD ₅₀ değerleri (Srivastava <i>et al.</i> , 2004).....	7
2.2 Malaşit yeşilinin akut toksisitesine ilişkin yapılan çalışmaların sonuçları (WHO, 2009).	12
2.3 Malaşit Yeşilinin Genotoksisite ve Mutajenitesine İlişkin Test Sonuçları (WHO, 2009).....	21
2.4 Lökomaşit Yeşilinin Genotoksisitesi ve Mutajenitesine İlişkin Test Sonuçları (WHO, 2009).....	23
2.5 Malaşit yeşili ve lökomaşit yeşilinin yüksek basınçlı likit kromatografi (HPLC) Tespit Metotları.....	32
2.6 Malaşit yeşili ve lökomaşit yeşilinin likit kromatografi tandem kütle spektrometrisinde (LC-MS/MS) Tespit Metotları.....	38
4.5 Malaşit yeşili ve löko malaşit yeşilinin numunede stabilitesi	54
3.1 Mobil fazların sistemdeki akış hızı ve zaman bağlı değişen karışım yüzdeleri	46
3.2 Malaşit yeşili, lökomaşit yeşili, kristal viole, lökomaşit yeşili D ₆ için tespit edilen ana iyon, parçalanma iyonları ve kütle spektrometrisi parametreleri	46
4.1 Malaşit yeşili ve lökomaşit yeşili için geri kazanım değerleri	50
4.2 Malaşit yeşili ve lökomaşit yeşili için gün içi tekrarlanabilirlik değerleri.....	51
4.3 Malaşit yeşili ve lökomaşit yeşili için günler arası tekrarlanabilirlik değerleri	51
4.4 Malaşit yeşili ve lökomaşit yeşili için gün içi tekrarlanabilirlik değerleri	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AB	:Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APCI	: Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APPI	: Atmospheric Pressure Photo Ionization
c.a	: Canlı ağırlık
DAD	: Diode Array Dedector
ESI	: Electro Spray Ionization
FLD	: Fluoresans Ligth Dedector
HAH	: Hidroksil Amin Hidroklorit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IDMS	: Isotope Diluting Mass Spectrometry
İLU	: İyi Laboratuvar Uygulamaları

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
LC-MS/MS	:Likit Kromatografi Tandem Kütle Spektrometrisi
LMY	:Lökomalaşit yeşili
LOD	: Limit of Detection (Teşhis Limiti)
LOQ	: Limit of Quantification (Tespit Limiti)
MDP	: Moleküler Damgalı Polimer
MF	: Mobil Faz
MRM	: Multiple Reaction Mode
MS	: Mass Spectrometry
MY	: Malaşit Yeşili
OECD	: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
PDA	: Photodiode Array Detection

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
pK_a	: Asitlik sabiti
ppb	: $\mu\text{g}/\text{kg}$ veya $\mu\text{g}/\text{L}$ veya ng/mL veya ng/g
ppm	: mg/kg veya mg/L veya $\mu\text{g}/\text{mL}$ veya $\mu\text{g}/\text{g}$
RSD	: Relatif Standart Sapma
SCGE	: Tek Hücre Jel Elektroforezi
TSH	: Tiroid Stimulating Hormone
UV	: Ultra Viole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1 GİRİŞ

Günümüzde artan nüfusun protein ihtiyacını karşılamakta doğal su ürünleri stoklarının yetersiz kalması su ürünleri yetiştiriciliğine verilen önemin artmasına neden olmuştur. Su ürünleri yetiştiriciliği birkaç yoğun gelişimin yaşandığı endüstriden biridir. Yoğun yetiştiricilikle beraber, ortaya çıkan enfeksiyonlar verim düşüklüklerine ve ölümlere neden olmaktadır. Hastalıkların sağaltımı, önlenmesi ve kontrolü amacıyla veteriner ilaçları yaygın olarak uygulanmaktadır.

Malaşit yeşili 1900'lü yılların ortalarından itibaren su ürünlerinde antiparaziter ve antifungal amaçlı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak malaşit yeşili ile onun metaboliti olan lökomalaşit yeşili su ürünlerinde uzun süre kalıntı bırakabilmektedir. Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin canlılar üzerindeki toksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda başta Avrupa Birliği (AB) ülkeleri olmak üzere, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kanada, Japonya ve Türkiye ile birlikte diğer pek çok ülkede tüketime sunulan su ürünlerinde malaşit yeşili ve metaboliti olan lökomalaşit yeşilinin bulunmasına müsaade edilmemektedir (Anonim,1990,2005, 2006,2007a,b).

Bütün bu yasal düzenlemeler su ürünlerinde malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespitine yönelik analiz tekniklerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Su ürünlerindeki malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespiti başlangıçta Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilmiştir (Wendy *et al*, 2005; Halme *et al*, 2004; Long *et al*, 2008; Bergwerff *et al*, 2003; Mitrowska *et al*, 2005; Rushing *et al*, 1997). Avrupa Birliği' nin 2004 tarih ve 25 sayılı komisyon kararı ile malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespitinde kullanılan analiz metotlarının minimum gerekli performans limitini 2 µg/kg olarak belirlemesi ile artık analizlerde Likit kromatografi Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (Hall *et al*,2008; Valle *et al*, 2005; Ding *et al*, 2008; Wendy *et al*, 2006; Arroyo *et al*, 2008; Lee *et al*, 2006; Scherpenisse *et al*, 2005). LC-MS/MS sistemleri HPLC sistemlere göre daha düşük tespit limitlerinde ölçüm yapılabilmektedir. HPLC sistemlerde kullanılan karmaşık, zaman alıcı ve fazla miktarda çözücü, kimyasal

madde harcanan ekstraksiyon prosedürleri yerine LC-MS/MS sistemlerinde basit, zaman ve malzeme tasarrufu sağlayan ekstraksiyon prosedürleri kullanılmaktadır.

Ülkemizde su ürünlerinde malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespiti HPLC ile gerçekleştirilmektedir. Ancak gerek ekstraksiyon prosedüründen kaynaklanan sıkıntılar gerekse de analiz tekniğinin Avrupa Birliği'nin ön gördüğü validasyonu kriterlerini karşılayamaması açısından geçmişte ülkemizde yapılması gereken malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntı analizlerinin yurtdışındaki laboratuvarlara yaptırılmasına neden olmuştur. Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespitine yönelik metotların araştırılması ve günümüz şartlarına uygun analiz metodunun tespit edilerek validasyonun gerçekleştirilmesi hem halk sağlığı açısından hem de ülkemizin su ürünleri ihracaatı açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu araştırmada su ürünlerinde malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespitinde kullanılan metotlar incelenecek ve uluslararası düzeyde geçerliliği kanıtlanmış bir metodun laboratuvarımızda uygulanabilir hale getirilmesi için 2002 tarih ve 657 sayılı Avrupa Birliği Komisyon kararına uygun olarak validasyonu gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR BİLDİRİSİ

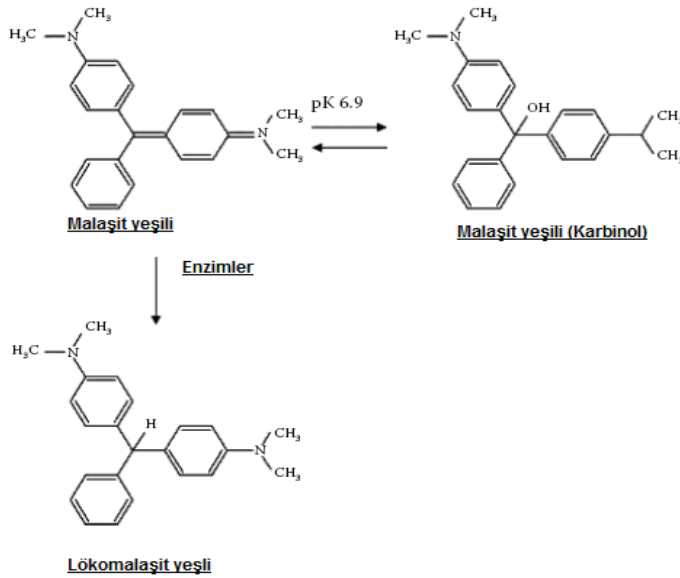
2.1 Malaşit Yeşili

Malaşit yeşili diğer pek çok boya türlerinde olduğu gibi farklı ticari isimlerle piyasaya sunulmaktadır. Victoria green B, yeni Victoria green ekstra, Diamond green B, BX katı green, light green ve astramalachite green bunlardan bazılarıdır. Malaşit yeşilinin Colour Index numarası Cl42000, Cl basic green 4' dür. Malaşit yeşili tekstil sanayinde deri ve akrilik elyaf boyanmasında ve kağıt sanayinde kullanılmaktadır. Malaşit yeşili ticari olarak sentezlenmesinde meydana gelen verim kayıplarından dolayı farklı saflıklarda partiler ortaya çıkabilmektedir. Bu sebeple boya üreticileri aynı standartlara sahip malaşit yeşili üretmek amacıyla sentez esnasında sodyum klorit veya sukroz gibi maddeler ilave ederek aynı saflıkta malaşit yeşili sentezlenmesini sağlarlar. Malaşit yeşilinin sulu çözeltileri etiketlerinde belirtilen saflıktan daha düşük olup, doymuş bir malaşit yeşili çözeltisinin sadece %6-7'si malaşit yeşili okzalattır. Malaşit yeşilinin sulu çözeltilerindeki malaşit yeşili oranını arttırmak amacıyla üretim esnasında asetik asit veya hidroklorik asit ilavesi gerekmektedir. Yüksek saflıkta malaşit yeşili sentezlenmesi, üretim sürecine çeşit saflaştırma aşamalarının ilavesi ile mümkün olmaktadır. Ticari amaçla boya sanayinde üretilen malaşit yeşili içeriğinin ve saflığının mikrobiyolojik çalışmalar için kullanılan malaşit yeşiline oranla daha değişken olmakla beraber bu amaç için üretilen malaşit yeşillerinin saflık derecelerinde de farklılıklar vardır. Yapılan bir çalışmada bu tür boyaların saflığının %98.5 ile %34 arasında değiştiği gösterilmiştir (Alderman, 1985).

2.2 Malaşit Yeşili Tuzları ve İyonizasyon

Malaşit yeşili sanayide kullanım amacıyla toz malaşit yeşili okzalat ve malaşit yeşili hidroklorit tuzu olarak, nominal %50'lik solüsyonu asetik ve hidroklorit tuzlarının karışımı şeklinde sunulmaktadır. Sıvı malaşit yeşili formik asit içerir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan malaşit yeşilinin çeşitlilik göstermesi malaşit yeşilinin farklı tuzlar şeklinde bulunmasındandır. Malaşit

yeşilin tuz ve karbinol formu olmak üzere iki iyonik formu bulunmaktadır (Şekil 2.1). Trifenilmetan boyaların löko formlarının yağda çözünürlükleri kationlarına oranla daha yüksektir. Bu durum pseudobaz formların hücre içerisine girmesini kolaylaştırır. Malaşit yeşilinin asitlik sabiti (pK_a) 6.9' dur. Malaşit yeşili pH 4.0 ortamda %100, pH 6.9'da %50, pH 7.4'de %25 ve pH 10.1'de %0 iyonize olur. Malaşit yeşilinin iyon formu ve karbinol formu arasındaki denge reaksiyonunun yavaş gerçekleşmesi, malaşit yeşilinin hem çevresel şartlardan etkilenmesini hem de ekosistemde birikim yapmasını etkileyen önemli bir faktördür. Malaşit yeşili alkali sularda aktif yapısını kaybederek renksiz ve daha az çözünen karbinol formuna dönüşür (Alderman, 1985).



Şekil 2.1 : Malaşit yeşili, karbinol formu ve lökomaşit yeşili formunun kimyasal yapısı (Sudova *et al.*, 2007).

2.3 Malaşit Yeşilinin Çevresel Ortamdaki Davranışı

Malaşit yeşilinin karbinol formunun sudaki çözünürlüğü düşüktür (0.5 ppm konsantrasyonda doyunluğa ulaşmaktadır). Doygunluk seviyesinin üzerindeki miktar yeşilimsi ve beyaz renkte tortular oluşturarak çökeltme meydana getirmektedir. Malaşit yeşili kireçli sularda dengeye ulaşmaya kadar ortamdaki mevcut hidroksil iyonlarıyla oldukça yavaş bir şekilde birleşir. Doğal su kaynaklarında ortama sürekli yeni su ve hidroksil iyonları girişi olması nedeniyle

malaşit yeşili doyumluğa ulaşamaz ve sürekli çözünmeye devam eder. Ayrıca sudaki kalsiyum iyonlarının humik maddelere bağlanması malaşit yeşiline daha az miktarda humik madde bağlanmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda sudaki humik madde ve kalsiyum iyonlarının varlığı hem malaşit yeşilinin toksisitesini hem de tedavi dozunu etkilemektedir (Meinelt *et al.*,2003). Trifenilmetan boyaların organik bileşiklere karşı kuvvetli afiniteleri vardır. Malaşit yeşili hayvansal hücrelerin nükleus yapısına bağlanmaktadır. Malaşit yeşili ışık ile temas ettiğinde lökomalaşit yeşiline dönüşmektedir. Malaşit yeşilinin bu şekilde bozulması oldukça yavaş gerçekleşmektedir (Alderman, 1985).

2.4 Malaşit Yeşilinin Akuakültürde Kullanım Alanları

Geçmişte su ürünleri yetiştiriciliğinde teknik saflıkta malaşit yeşili kullanılmaktaydı. Kullanılacak malaşit yeşilinin saflığının bilinmemesi ilacın terapötik etkisi ile uygulama esnasında ve sonrasında ortaya çıkacak toksikolojik etkilerin tahmin edilememesine yol açar. Uygulama öncesi deneme yapılmadan ilacın tüm balıklara uygulanması bütün balıkların ölmesi ile sonuçlanabilir. Malaşit yeşili tedavi amacı ile tek başına kullanıldığı gibi farklı terapötiklerle birlikte de (formaldehit, metilen mavisi, vb.) kullanılabilir (Sudova *et al.*, 2007). Malaşit yeşili, 1930'ların başından itibaren bazı ülkelerde su ürünleri yetiştiriciliği faaliyetlerinde antifungal ve antiprotozoal tedavi amaçlı balık, balık yumurtası ve kabuklularda kullanılmıştır. Günümüzde de bazı ülkelerde akvaryum balıkçılığında kullanılmaktadır. İnsan gıdası olarak tüketilecek su ürünlerinde kullanılmasına müsaade edilmemektedir (WHO, 2009). 1930'ların ortasından itibaren malaşit yeşilinin fungist olarak 1950'lerden itibaren de antiseptik ve antiparaziter olarak kullanılmıştır. 1960'larda malaşit yeşilinin başta *Ichthyophthirius multifiliis* olmak üzere protozoon ekto parazitlere karşı oldukça etkin bir tedavi sağladığı ortaya konmuştur. Malaşit yeşili balık yumurtalarında *Saprolegnia* sp. karşı ve salmonidlerde proliferatif böbrek hastalığının tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin Çek Cumhuriyeti'nde *Ichthyobodo necator*, *Trichodina* sp., *Trichodinella* sp., *Chilodinella* sp., *Ichthyophthirius multifiliis* ile balıklardaki ve yumurtalardaki mantar enfeksiyonlarına karşı kullanılmıştır

(Sudova *et al.*, 2007). Malaşit yeşili *Cyprinus carpio*'da *Dactylogyrus vastator* ve *Cichliodogyriasis*'e karşı kullanılmıştır. Sazanlarda *Dermocystidium koi* balıkları ile yavru kalkan balıklarında bazı protozoanlar ve myxobakter enfeksiyonları da malaşit yeşili ile tedavi edilmiştir. Yılan balıkları, lahozlar ve kalkan balıklarındaki *Trichodina* enfeksiyonlarında, ot sazanlarındaki *Trichodinella epizootica*, akvaryum balıklarındaki dış parazitlere karşı ve bazı siliyalara karşı kullanılmıştır (Srivastava *et al.*, 2004).

2.5 Malaşit Yeşilinin Balıklar Üzerindeki Toksikolojik Etkileri

Malaşit yeşili ve diğer benzer terapötiklerin Letal Doz (LD₅₀) değerlerinin tespit edilmesinde hem canlı türüne bağlı biyotik faktörler hemde sıcaklık, pH, suyun sertliği ve çözülmüş oksijen gibi parametrelerin göz önüne alınması gerekmektedir. Malaşit yeşilinin farklı balık türlerinin erişkin ve yavru bireylerdeki LD₅₀ değerlerinin tespitine ilişkin çalışmalar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir. Çizelgede da görüldüğü gibi balıklar için uygulanan tedavi dozları ve lethal dozlar birbirine oldukça yakındır. Malaşit yeşilinin meydana getirdiği toksikasyonlar başlıca onun saflığına ve içerdiği diğer bileşiklere bağlı olarak değişmektedir. Yüksek saflıkta üretilen malaşit yeşilinin bile analiz edildiğinde sadece %82'sinin okzalat veya %95'inin hidroklorid kalan kısmının ise asit bileşiklerinden oluştuğu görülmektedir. 10 adet farklı malaşit yeşili ile yapılan bir çalışmada bazı malaşit yeşili tiplerinin tedavi dozları ile lethal dozların birbirine çok yakın olduğu bulunmuştur. Bazı durumlarda ise önerilen tedavi dozunun bulunan lethal dozdan daha yüksek olabilmektedir. Malaşit yeşilinin banyo yolu ile uygulamalarında oluşabilecek toksisite su kalitesi ile yakından ilişkilidir. Malaşit yeşilinin toksisitesi yumuşak sudaki humik maddelerle azalmaktadır. Humik maddeler aynı zamanda malaşit yeşilinin terapötik indeksini de değiştirmektedir. Yapılan çalışmalarda malaşit yeşilinin uygulanan türler için toksisitesinin sıcaklığa bağlı olarak artmakta olduğu gözlenmiştir. *Micropterus salmonides* üzerinde malaşit yeşili ile yapılan bir çalışmada uygulama dozunun iki katına çıkarılmasının yumurta ve yavru balıklardaki mortalite oranını 20 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Malaşit yeşilinin toksik dozları sazan ve alabalıklarda çok yakın değerlerdedir. Toksikasyon belirtisi olarak; balıkların düzensiz

hareketleri, su yüzeyine sıçramaları, sazan balıklarının yüzeyden hava yutması ve bunu takiben denge kaybı, agoni ve ölüm tipik klinik semptomlardır. Malaşit yeşili toksikasyonuna ilişkin patolojik çizelge ise balığın derisinin yeşil renge dönüşmesi ve mukus salgısının artmasıdır. Solungaçlarda ödem ve fazla miktarda mukus bulunmakta olup, doğal rengini kaybetmiştir. Cyprinidler üzerine yapılan bir çalışmada 0.1 mg/L konsantrasyonda malaşit yeşilinin kromozomların bölünmesini etkilediği tespit edilmiştir. Çeşitli çalışmalar malaşit yeşilinin tatlı su balıklarında hem akut hem de kronik toksik olabileceğini göstermiştir. Gökkuşuğu alabalığı için malaşit yeşilli uygulamasını takiben karsinojenosis, mutajenosis, kromozomal parçalanmalar, teratojenosis ve yumurta veriminde azalma gibi etkilerin meydana geldiği tespit edilmiştir (Srivastava *et al.*, 2004).

Çizelge 2.1: Malaşit yeşilinin farklı türler üzerindeki LD₅₀ değerleri (Srivastava *et al.*, 2004).

Balık	LD ₅₀ (mg/L)	pH	Sıcaklık(°C)	Süre (saat)
Kanal yayın balığı (<i>Ictarulus punctatus</i>)	0.238	7.5	22	6
	0.960	7.5	12	6
	0.4	7.5	22	6
	0.519	9.5	12	6
	1.72	8.0	12	6
	1.3	8.0	12	6
	0.286	8.0	12	24
Gökkuşuğu alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1.4	7.5	12	3
	2.35	8.0	12	3
	6.8	8.0	12	6
Küçük ağızlı levrek (<i>Micropterus dolomieu</i>)	0.154	7.5	12	24
	0.0453	7.5	12	96
Büyük ağızlı levrek (<i>Micropterus salmonides</i>)	0.282	7.5	12	24
	0.0728	7.5	12	96
Koho salmon (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	3.0	7.5	12	6
	0.569	7.5	12	24
	0.383	7.5	12	96
Atlantik salmon (<i>Salmo salar</i>)	3.560	7.5	12	3
	1.090	7.5	12	6
	0.497	7.5	12	24
	0.283	7.5	12	96
Kahverengi alabalık (<i>Salmo trutta</i>)	1.730	7.5	12	3
	1.270	7.5	12	6
	0.352	7.5	12	24
	0.237	7.5	12	96

Yapılan toksikolojik çalışmalarda gökkuşığı alabalığında uzun süreli toksikasyon durumunda yumurtalarda anormaliteler, kromozomlarda parçalanmaların meydana geldiği tespit edilmiştir. Yüksek dozlarda malaşit yeşili uygulamaları sonucunda 38 saatlik inkübasyon sonunda embriyoların yaşam oranında önemli derecede düşüş ve kuluçka süresinin uzaması ve bununla birlikte bu yumurtalardan elde edilen larvalarda omurga, baş, yüzgeç ve kuyrukta anomaliler tespit edilmiştir. Malaşit yeşili aynı zamanda solunum enzimlerine etki ederek, gökkuşığı alabalığı ve Nil tilapyasında solunum fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. Gökkuşığı alabalığında solungaç lamel hücrelerinde ve solungaç epitelinde nekroz ve lökosit infiltrasyonu ile sonuçlanan solungaçlarda tahribata neden olmaktadır. Malaşit yeşili yayın balıklarında (*Heteropneustes fossilis*) karaciğer, solungaç, böbrek, bağırsak, gonadlar ve hipofiz gonadotropik hücrelerde zararlı etkilere neden olmaktadır. Karaciğerde sinuzoidal konjesyon ve bölgesel nekroza ve nükleusta değişimlere neden olmaktadır (Srivastava *et al.*, 2004).

2.6 Malaşit Yeşilinin Farmokolojik Özellikleri

2.6.1 Absorpsiyon, dağılım, atılım ve metabolizma

2.6.1.1 Bakteriler

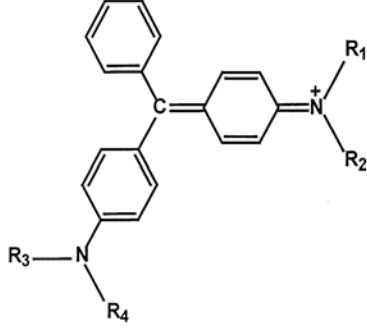
İnsan, rat, fare ve resus maymunlarındaki intestinal bakterilerin malaşit yeşilinin lökomalaşit yeşiline indirgenmesini incelenmiş ve insan sindirim kanalındaki bakteri florasını temsil etmesi için 14 saf anaerobik bakteri kültürü seçilerek kullanılmıştır. Bakteri kültürleri 300 µg malaşit yeşili içeren 5 ml brain-heart infüzyon broth besi yerinde anaerobik koşullarda 24-48 saat arasında inkübe edilmişlerdir. Malaşit yeşilinin neredeyse tamamı intestinal flora tarafından lökomalaşit yeşiline indirgenmiştir. Saf bakteri kültürleri malaşit yeşilini lökomalaşit yeşiline %7.3-99.3 oranında indirgemişlerdir. Bu sonuç sindirim kanalı mikroflorasının malaşit yeşilinin lökomalaşit yeşiline dönüşümündeki önemini göstermektedir (Henderson *et al.*, 1997).

2.6.1.2 Fareler ve ratlar

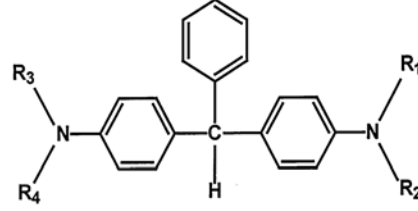
Ağırlıkları 300-325 gr arasında değişen 3 erkek ve 3 dişi rata sonda yardımıyla tek doz 2 mg/kg c.a.(canlı ağırlık) ^{14}C işaretli malaşit yeşili içeren su verilerek yapılan çalışmada ratların idrar ve dışkıları malaşit yeşili uygulandıktan sonra günlük olarak toplanmıştır. Malaşit yeşili uygulandıktan bir hafta sonra ratların karaciğer, böbrek, kas, deri ve kanları alınıp analiz edilene kadar -20°C 'de saklanmıştır. Oral yoldan uygulanmış malaşit yeşilinin yaklaşık $\%96.3 \pm 0.059$ ' unun idrar ve dışkı ile atıldığı ve bunun $\%80$ 'inin dışkı yolu ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Ratların dokularında düşük seviyede ^{14}C tespit edilmesinden ötürü dokularla ilgili ileriye dönük çalışmalar gerçekleştirilememiştir (WHO, 2009).

Ratlarda kısa dönemli yedirme yoluyla yapılan çalışmada (Culp *et al.*, 1999) malaşit yeşilinin sırasıyla birinci ve ikinci aromatik aminleri N-demetilasyon sonucunda lökomalaşit yeşiline indirgendiği tespit edilmiştir. Dişi fareler (her doz grubu için sekiz adet B6C3F1; Nctr BR C57/BL6Nx3H/HeN MTV-) ve erkek ratlar (her doz grubu için sekiz adet; F344: N Nctr BR) fareler için 0.15 ve 90 mg malaşit yeşili/kg c.a. ve ratlar için 0, 10 ve 60 mg malaşit yeşili/ kg c.a. ($\geq \%94$ saflıkta) veya fareler için 0, 13.7, 72 mg lökomalaşit yeşili/kg c.a. ve ratlar için 0, 9.6, 58 mg lökomalaşit yeşili/kg c.a.($\geq \%98$ saflıkta) yeme karıştırılarak 28 gün boyunca beslenmiştir. Fare ve ratlardan karaciğer örnekleri alınarak Likit Kromatografi Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) ile analiz edilmiştir. Malaşit yeşili uygulanan ratlardan alınan karaciğer örneklerinin analizinde malaşit yeşili, malaşit yeşilin di-, tri, ve tetradimetil türevleri ve malaşit yeşili N-oksit tespit edilmiştir. Malaşit yeşili veya lökomalaşit yeşili uygulanmış ratların karaciğerlerindeki demetilasyon metabolitleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Ayrıca az miktarda da lökomalaşit yeşili tespit edilmiştir. Fare ve ratlara uygulanan doz miktarının artması ile karaciğerdeki malaşit yeşili ve türevlerinin miktarının da arttığı görülmüştür. Lökomalaşit uygulanan ratların karaciğer örneklerinin analizinde öncelikle protonlanmış lökomalaşit yeşili, protonlanmış demetilasyon türevleri ve malaşit yeşili N-oksit ve demetilasyon türevleri bulunmuştur. Ayrıca az miktarda da malaşit yeşili tespit edilmiştir. Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin metabolik mekanizması Şekil 2.3'de

gösterilmiştir. Hem ratlarda hem de farelerde, doza bağlı olarak lökomalaşit yeşiline dönüşen miktarın arttığı belirlenmiştir (Culp *et al.*, 1999).



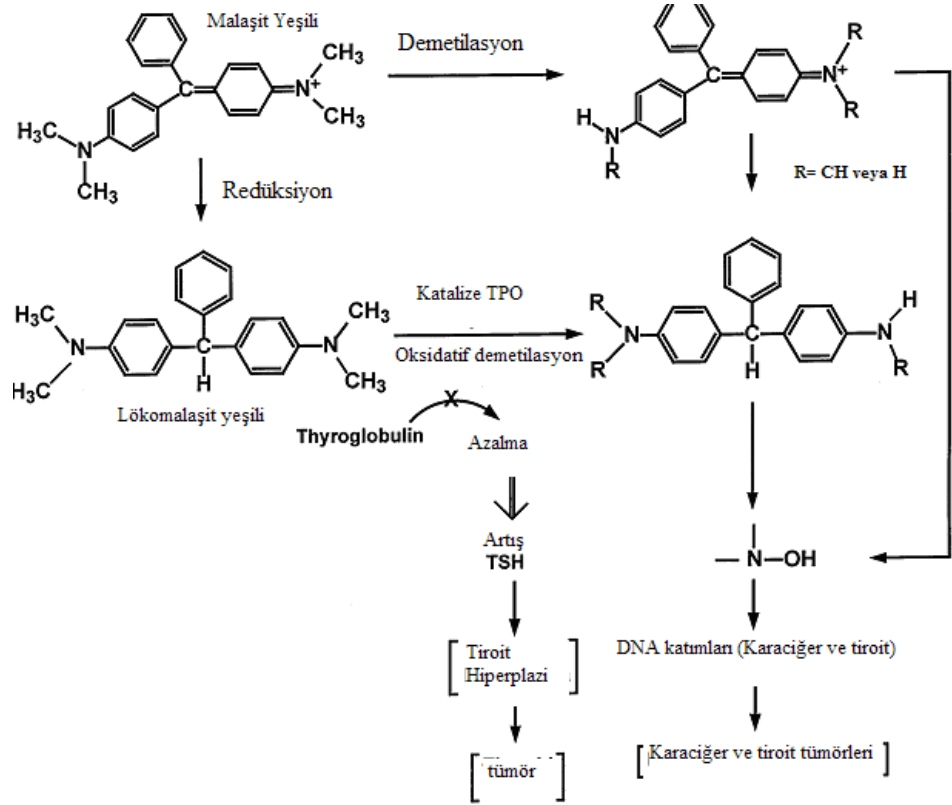
Malaşit Yeşili



Lökomalaşit yeşili

Malaşit yeşili, lökomalaşit yeşili ve demetilasyon türevlerinin yapısı	Malaşit yeşili				Lökomalaşit yeşili			
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ana molekül	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Desmetil-	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
Didesmetil- (simetrik)	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	H
Tridesmetil-	CH ₃	H	H	H	CH ₃	H	H	H
Tetradesmetil-	H	H	H	H	H	H	H	H

Şekil 2.2: Malaşit yeşili veya lökomalaşit yeşili uygulanmış ratların karaciğerlerindeki demetilasyon metabolitleri (Culp *et al.*, 1999).



Şekil 2.3: Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin metabolik mekanizması (Culp *et al.*, 1999).

2.6.1.3 İnsanlar

İnsanlarda malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımına ilişkin yapılmış bir çalışma henüz bulunmamaktadır (NTP, 2005).

2.7 Toksikolojik Çalışmalar

2.7.1 Akut toksisite

Malaşit yeşilinin akut toksisitesine ilişkin yapılan çalışmalar ve tespit edilen LD₅₀ değerleri Çizelge 2’de gösterilmiştir

Çizelge 2.2: Malaşit yeşilinin akut toksisitesine ilişkin yapılan çalışmaların sonuçları (WHO, 2009).

Tür(Cinsiyet)	Uygulama Şekli	LD ₅₀ (mg/kg c.a.)	Kaynak
Fare	Oral	50	Clemensen et al. (1984)
Wistar rat (Dişi ve erkek)	Oral	275	Clemensen et al. (1984)
Wistar rat (Dişi ve erkek)	Dermal	>2000	Clemensen et al. (1984)
SD rat	Oral	520	Meyer ve Jorgenson (1983)

Akut etkiler görülen ratlarda motor aktivitelerinde azalma, ishal görülmüştür. Hayvanların ölümüne kadar gözlenen bulgular genellikle gastrointestinal kanalın genişlemesi ile birlikte hiperemi ve intesnal duvarlarda atonidir. Hayatta kalan ratlar 2 gün içerisinde bu semptomlardan kurtulurlar (Clemensen *et al.*, 1984).

2.7.1.1 Malaşit yeşilinin kısa dönem toksisitesine ilişkin çalışmalar

İyi Laboratuvar Uygulamalarına (İLU) uyumlu bir şekilde yapılan bir çalışmada 6-7 haftalık 8 adet dişi ve 8 adet erkek fareden (B6C3F1; Nctr BR (C57BL/6NxC3H/HeN MTV-)) oluşan gruplar 0, 3.75, 15, 45, 90 ve 180 mg malaşit yeşili/kg c.a. denk gelecek şekilde 0, 25, 100, 300, 600, 1200 mg/kg malaşit yeşili (klorit tuzu, >%94 saflıkta) içeren yem ile 28 gün boyunca beslenmiştir. Lökosit sayısı, eritrosit sayısı, hemoglobin, hematokrit değerleri, ortalama eritrosit miktarı, eritrosit hemoglobin değerlerinin ortalaması, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, trombosit sayısı, segmentli nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil ve retikulosit sayısı içeren hematolojik analizler yapılmıştır. Total protein, safra asitleri, kan üre azotu, kreatin, alanin aminotransferaz ve alkalın fosfataz değerleri ölçülmüştür (Culp *et al.*, 1999). 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi farelerde kontrol grubuna oranla 3. haftada ($p < 0.02$) ve 4. haftada ($p < 0.03$) önemli ölçüde vücut ağırlığı kaybı tespit edilmiştir. Malaşit yeşili içeren yem ile beslenen hiçbir erkek faredede önemli ölçüde vücut ağırlığı kaybı tespit edilmemiştir. 600 ve 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile

beslenen dişi farelerde eritrosit sayısı ve hemoglobin ile hematokrit seviyeleri kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalmış erkek farelerde ise 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen grupta aynı durum tespit edilmiştir. 300, 600 ve 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi farelerin eritrosit miktarı kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde artmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca aynı gruplarda retikülosit miktarı önemli ölçüde 1.4 ile 1.9 kat artış göstermiştir ($p < 0.05$). 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen erkek farelerde retikülosit miktarı 1.6 kat artmıştır ($p < 0.05$). Malaşit yeşili ile beslenen farelerde önemli histopatolojik değişimler tespit edilmemiştir. Gözlenemeyen yan etki seviyesi 15 mg/kg c.a./gün olarak belirlenmiştir (Culp *et al.*, 1999).

İLU uygun olarak yapılmayan bir çalışmada, 8 adet dişi ve 8 adet erkek Wistar ratlarından oluşan gruplar 0, 1, 10 ve 100 mg malaşit yeşili/kg c.a. denk gelecek şekilde 0, 10, 100 ve 1000 mg/kg malaşit yeşili okzalit (>%90 saflıkta) içeren yem ile 28 gün boyunca beslenmiştir. Uygulamadan 3 hafta sonra kan örnekleri alınmış, alkalın fosfataz, aspartat aminotransferaz, üre, kreatin, glikoz ve methemoglobin değerleri ölçülmüştür. Eritrosit, lökosit ve retikülosit sayımı yapılmıştır. Hazırlanan frotilerde farklılaşmış kan hücresi sayıları belirlenmiş ve hematokrit değerleri tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm hayvanların karaciğer, böbrek, adrenal bezler ve testisler tartılmış ve bu organlardan hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenmiştir. En yüksek doz grubunda bulunan hayvanların hiper aktivitesi haricindeki hiçbir grupta klinik belirti gözlemlenmemiştir. Bu hayvanlarda ayrıca kilo artışında ve yem alımında gerileme tespit edilmiştir. 1000 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişilerde, lenfosit sayısında artışa karşın nötrofil sayısında azalma ve hematokrit değerinde belirgin azalma görülmüştür. 1000 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen erkeklerde kandaki üre miktarında önemli derecede artış göstermiştir. Gözlenemeyen yan etki seviyesi 10 mg/kg c.a./gün olarak tespit edilmiştir (Clemensen *et al.*, 1984).

İLU uyumlu bir şekilde yapılan bir çalışmada 6-7 haftalık 8 adet dişi ve 8 adet erkek ratten (F344/N Nctr BR) oluşan gruplar 0, 2.5, 10, 30, 60 ve 120 mg malaşit yeşili / kg c.a. denk gelecek şekilde 0, 25, 100, 300, 600, 1200 mg/kg malaşit yeşili (klorit tuzu, >%94 saflıkta) içeren yem ile 28 gün boyunca beslenmiştir. Lökosit sayısı, eritrosit sayısı, hemoglobin, hematokrit değerleri,

ortalama eritrosit miktarı, eritrosit hemoglobin değerlerinin ortalaması, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, trombosit sayısı, segmentli nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil ve retikulosit sayısı içeren hematolojik analizler yapılmıştır. Total protein, safra asitleri, kan üre azotu, kreatin, alanin aminotransferaz ve alkalın fosfataz, glikoz, kolestrol, trigliseritler, gama glutamil transferaz, albumin, sorbitol dehidrojenaz, kreatin kinaz, sodyum, potasyum, klorit, kalsiyum ve fosfor değerleri ölçülmüştür (Culp *et al.*, 1999). 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi ratların kontrol grubuna oranla 1-4 haftalar arasında önemli ölçüde vücut ağırlığı kaybı tespit edilmiştir. 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen erkek ratlar, kontrol grubunun vücut ağırlığının %82-87'sine ulaşmasına rağmen bu durum önemsiz bulunmuştur. 300, 600 ve 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi ratlarda ve 600 ve 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen erkek ratlarda karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranında önemli ölçüde artış tespit edilmiştir. Her iki cinsiyet grubunda da gama glutamil transferaz seviyelerinin uygulama dozuna bağlı olarak lineer bir artış gösterdiği bulunmuştur. 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi ratlarda hematolojik değerlerinin eritrosit sayısı, hemoglobin, hematokrit değerleri, eritrosit hemoglobin ortalamaları ve eritrosit hemoglobin konsantrasyonu ortalamalarında %3 'ün altında düşüş belirlenmiş, fark istatikselsel olarak anlamlı bulunmuştur. 300, 600 ve 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen erkek ratlarda ortalama eritrosit hemoglobin değerlerinde az fakat önemli düşüşler görülmüştür. 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi ratların sadece birisinde hafif derecede hepatosit vakuolizasyonu gözlenmiştir ($p < 0.01$). 600 ve 1200 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen erkek ratların sırasıyla 1 ve 4 erkek ratta orta şiddette benzer lezyonlar tespit edilmiştir (Culp *et al.*, 1999). Gözlenemeyen yan etki seviyesi 10 mg/kg c.a./gün olarak belirlenmiştir.

2.7.1.2 Lökomaşit yeşilinin kısa dönem toksisitesine ilişkin çalışmalar

İLU uyumlu bir şekilde yapılan bir çalışmada (Culp *et al.*, 1999) 6-7 haftalık 8 adet dişi ve 8 adet erkek fareden (B6C3F1; Nctr BR(C57BL/6Nx3H/HeN MTV-)) oluşan gruplar 0, 43.5, 87, 174 mg lökomaşit yeşili/kg c.a. denk gelecek şekilde 0, 290, 580 ve 1160 mg/kg lökomaşit yeşili (>%98 saflıkta) içeren yem ile 28 gün boyunca beslenmiştir. Lökosit sayısı, eritrosit sayısı, hemoglobin,

hematokrit değerleri, ortalama eritrosit miktarı, eritrosit hemoglobin değerlerinin ortalaması, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, trombosit sayısı, segmentli nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil ve retikulosit sayısı içeren hematolojik analizler yapılmıştır. Total protein, safra asitleri, kan üre azotu, kreatin, alanin aminotransferaz ve alkalın fosfataz değerleri ölçülmüştür. 1160 mg/kg lkomalaşıt yeşili içeren yem ile beslenen dişi farelerde kontrol grubuna oranla 4. haftada önemli ölçüde vücut ağırlığı kaybı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 580 mg/kg lkomalaşıt yeşili içeren yem ile beslenen dişi farelerde belirgin bir ($p<0.01$) vücut ağırlığı kaybı görülmüştür. 3. ve 4. haftalardaki kilo kaybı dozun artışı ile doğru orantılıdır. 1160 mg/kg lkomalaşıt yeşili içeren yem ile beslenen dişi farelerin tümü ya ölmüş ya da idrar kesesi epitel hücrelerinin geçirgenliğinde bozulma tespit edilmiştir ($p<0.001$). Hücrelerin pek çoğunun ekirdekiğini kaybettiği, çekirdekçiği kaybolmayan hücrelerin çekirdekçiklerinin ise yoğunlaşmış veya parçalara ayrılmış olduğu görülmüştür. Bu duruma apoptosisin neden olduğu düşünülmektedir. İdrar kesesinden hazırlanan kesitler incelendiğinde fagositik vakuoller taşıyan pek çok apoptotik hücrenin canlı epitel hücrelerle birlikte bulunduğu görülmüştür. Son yıllarda kullanılan DNA fragmentlerini işaretleme teknikleri vasıtasıyla apoptotik hücrelerin sitoplazmasında DNA fragmentlerinin var olduğu yoğunlaşmış çekirdekçiklerin boyanması ile belirlenmiştir. 0, 290, 580 mg/kg lkomalaşıt yeşili içeren yem ile beslenen dişi farelerde benzer apoptosis izelgesu şekillenmemiştir. Gözlenemeyen yan etki seviyesi 290 mg /kg lkomalaşıt yeşili içeren yem ile beslenen farelerdeki doz olan 10 mg/kg c.a./gün olarak tespit edilmiştir (Culp *et al.*, 1999).

İLU uyumlu bir şekilde yapılan bir çalışmada 6-7 haftalık 8 adet dişi ve 8 adet erkek rattan (F344/N Nctr BR) oluşan gruplar 0, 29, 58, 116 mg lkomalaşıt yeşili/kg c.a. denk gelecek şekilde 0, 290, 580, 1160, 600, 1200 mg/kg lkomalaşıt yeşili (klorit tuzu, >%94 saflıkta) içeren yem ile 28 gün boyunca beslenmiştir. Lökosit sayısı, eritrosit sayısı, hemoglobin, hematokrit değerleri, ortalama eritrosit miktarı, eritrosit hemoglobin değerlerinin ortalaması, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, trombosit sayısı, segmentli nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil ve retikulosit sayısı içeren hematolojik analizler yapılmıştır. Total protein, safra asitleri, kan üre azotu, kreatin, alanın aminotransferaz ile

alkalin fosfataz, glikoz, kolesterol, trigliseritler, gama glutamil transferaz, albumin, sorbitol dehidrojenaz, kreatin kinaz, sodyum, potasyum, klorit, kalsiyum ve fosfor değerleri ölçülmüştür. 1160 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen erkek ratlarda kontrol grubuna kontrol grubunun %91-92'sine oranla 2, 3 ve 4. haftada önemli ölçüde vücut ağırlığı kaybı tespit edilmiştir. 580 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen erkek ratlarda kontrol grubunun %94'üne oranla 3 ve 4. haftada önemli ölçüde vücut ağırlığı kaybı tespit edilmiştir. Karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm doz gruplarında önemli derecede artmıştır. 1160 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen grupta gama glutamil transferaz seviyesi kontrol grubuna oranla 2.2 kat yüksek olup ($p<0.05$), fosfor seviyesi %10 artmıştır ($p<0.05$). Kontrol grubuna oranla 1160 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen grupta eritrosit sayısı, hemoglobin ve hematokrit değerleri az (< %6) fakat önemli derecede azalmıştır. 1160 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen grubun yedisinde ($p<0.005$), 580 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen grubun beşinde ($p<0.04$), 290 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen grubun iki üyesinde ($p<0.0004$) midzonal ve sentrilobular hepatosit vakuolizasyonun doza bağlı olarak arttığı görülmüştür. 1160 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen gruptaki ratlardan ikisinde ve 580 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen gruptaki ratlardan ikisinde troid bezlerinde apoptotik foliküler epitel hücreler görülmüştür. Foliküllerin içersinde yer alan yoğunlaşmış çekirdekçiklerin bulunduğu kabuk görünümlü foliküler hücrelerde morfolojik değişimler meydana gelmiştir. İnflamatuvar reaksiyon tespit edilmemiştir. Tahribata uğrayan foliküllerin normal epitel dokuya bağlı bulunması, foliküler epitel rejenerasyonunu göstermektedir. Bu çalışmada gözlenemeyen yan etki seviyesi belirlenmemiştir (Culp *et al.*, 1999).

2.7.2 Karsinojenite

2.7.2.1 Malaşit yeşilinin karsinojenitesi

İLU uyumlu bir şekilde yapılan bir çalışmada 6 haftalık 48 adet dişi fareden (B6C3F1; Nctr BR(C57BL/6Nx3H/HeN MTV-)) oluşan gruplar 0, 15, 33 ve 67 mg malaşit yeşili/kg c.a. denk gelecek şekilde 0, 100, 225, 300 ve 450 mg/kg

malaşit yeşili (>%87 saflıkta klorit tuzu) içeren yem ile 104 hafta boyunca beslenmiştir. Çalışma süresince denekler yem ve filtre edilmiş musluk suyu ile ad-libitum beslenmiş ve gün süresince 12 saat ışıklandırma yapılmıştır. Çalışmada kullanılan yemlerin içerdiği malaşit yeşilinin homojenite ve stabilite testleri gerçekleştirilerek test sonuçlarıyla bütünlüğü sağlanmıştır. İlk 12 hafta boyunca deneklerin yem tüketimi ve vücut ağırlıkları haftalık olarak, sonrasında 4 haftada bir ölçülerek kayıt edilmiştir. Ölen ve ölmek üzere olan farelerde dahil olmak üzere tüm farelere nekropsi yapılmıştır. Alınan tüm dokular tespit edilerek, sonrasında %10'luk nötral tamponlu formaldehit içerisinde saklanmıştır. Dokular mikroskopik inceleme için hematoksilen ve eosin ile boyanmıştır. Çalışmada kullanılan farelerin yem tüketimi, vücut ağırlığı değişimi, yaşama oranı, dişi farelerde neoplazma varlığı ve sayısında malaşit yeşili uygulamasına bağlı herhangi bir etki tespit edilmemiştir. İLU uyumlu bir şekilde yapılan bir çalışmada 48 adet dişi rattan (F344/N Nctr BR) oluşan gruplar 0, 7, 21 ve 43 mg malaşit yeşili / kg c.a. denk gelecek şekilde 0, 100, 300, 600 mg/kg malaşit yeşili (>%87 saflıkta klorit tuzu) içeren yem ile 104 hafta boyunca beslenmiştir. Çalışma süresince denekler yem ve filtre edilmiş musluk suyu ile ad-libitum beslenmiş ve gün süresince 12 saat ışıklandırma yapılmıştır. Çalışmada kullanılan yemlerin içerdiği malaşit yeşilinin homojenite ve stabilite testleri gerçekleştirilerek test sonuçlarıyla bütünlüğü sağlanmıştır. İlk 12 hafta boyunca deneklerin yem tüketimi ve vücut ağırlıkları haftalık olarak, sonrasında 4 haftada bir ölçülerek kayıt edilmiştir. Ölen ve ölmek üzere olan tüm deneklere nekropsi yapılmıştır. Alınan tüm dokular tespit edilerek, sonrasında %10'luk nötral tamponlu formaldehit içerisinde saklanmıştır. Dokular mikroskopik inceleme için hematoksilen ve eosin ile boyanmıştır. Malaşit yeşili uygulamasına bağlı olarak yem tüketiminde değişiklik gözlenmemiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 600, 300 ve 100 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen gruplarda vücut ağırlıklarının ortalaması sırasıyla 16., 44. ve 76. haftalardan itibaren istatistiksel olarak önemli ölçüde düşmeye başlamıştır. Çalışma sonundaki vücut ağırlıkları kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla kontrol grubunun vücut ağırlığının %88, %90 ve %98'ine ulaşmıştır. Hayatta kalma oranını malaşit yeşili uygulaması etkilememiştir. Malaşit yeşili uygulanan dişi ratların tiroid bezi foliküllerindeki adenom veya karsinomların insidensi doza bağlı olarak artma eğiliminde olup, sadece 300 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen grupta bu artış önemli

bulunmuştur. Hepatoselüler adenomlardaki artışın az fakat özellikle en yüksek iki doz grubunda istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Meme bezlerindeki karsinomlarda önemli bir artış tespit edilmemiştir. Ayrıca doz gruplarında tek çekirdekli hücre lösemisinin azalma eğiliminde olduğu, 100 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen gruptaki denekler hariç tüm gruplarda bu azalmanın önemli olduğu bulunmuştur. Gözlenemeyen yan etki seviyesi 100 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen ratlardaki doz olan günlük 7 mg/kg c.a. olarak tespit edilmiştir (Culp *et al.*, 2006).

2.7.2.2 Lökomaşit yeşilinin karsinojenitesi

İLU uyumlu bir şekilde yapılan bir çalışmada 6 haftalık 48 adet dişi fareden (B6C3F1; Nctr BR(C57BL/6Nx3H/HeN MTV-)) oluşan gruplar 0, 15, 31 ve 63 mg malaşit yeşili/kg c.a. denk gelecek şekilde 0, 91, 204, 408 mg/kg lökomaşit yeşili (>%99 saflıkta) içeren yem ile 104 hafta boyunca beslenmiştir. Çalışma süresince denekler yem ve filtre edilmiş musluk suyu ile ad-libitum beslenmiş ve gün süresince 12 saat ışıklandırma yapılmıştır. Çalışmada kullanılan yemlerin içerdiği lökomaşit yeşilinin homojenite ve stabilite testleri gerçekleştirilerek test sonuçlarıyla bütünlüğü sağlanmıştır. İlk 12 hafta boyunca deneklerin yem tüketimi ve vücut ağırlıkları haftalık olarak sonrasında 4 haftada bir ölçülerek kayıt edilmiştir. Ölen ve ölmek üzere olan farelerde dahil olmak üzere bütün farelere nekropsi yapılmıştır. Lökomaşit yeşili uygulamasına bağlı olarak deneklerin hiç birisinde yem tüketimi, vücut ağırlığı değişimi ve yaşama oranında herhangi bir değişim tespit edilmemiştir. Dozun artışına bağlı olarak hepatoselüler adenom ve karsinomların insidensinin arttığı ve en yüksek doz grubunda insidensin önemli olduğu bulunmuştur. İLU uyumlu bir şekilde yapılan bir çalışmada 48 adet dişi ve 48 adet erkek rattan (F344/N Nctr BR) oluşan gruplar 0, 5, 15 ve 30 mg malaşit yeşili / kg c.a. denk gelecek şekilde 0, 91, 272, 543 mg/kg lökomaşit yeşili (>%99 saflıkta) içeren yem ile 104 hafta boyunca beslenmiştir. Çalışma süresince denekler yem ve filtre edilmiş musluk suyu ile ad-libitum beslenmiş ve gün süresince 12 saat ışıklandırma yapılmıştır. İlk 12 hafta boyunca deneklerin yem tüketimi ve vücut ağırlıkları haftalık olarak sonrasında 4 haftada bir ölçülerek sonuçlar kayıt edilmiştir. Ölen ve ölmek üzere olan farelerde dahil olmak üzere tüm farelere nekropsi yapılmıştır. 543 mg/kg lökomaşit yeşili ile

beslenen erkek ve dişi ratlarda ve 272 mg/kg lökomaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi ratlarda kontrol grubuna oranla yem tüketiminin azaldığı görülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 543, 272 ve 91 mg/kg lökomaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi rat gruplarında vücut ağırlıklarının ortalaması sırasıyla 8, 16 ve 52. haftalardan itibaren istatistiksel olarak önemli ölçüde düşmeye başlamıştır. Lökomaşit yeşilinin erkek ratlar üzerinde daha az etkisi olmuştur. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 543, 272 ve 91 mg/kg lökomaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi rat gruplarında vücut ağırlıklarının ortalaması sırasıyla 16, 20 ve 88. haftalardan itibaren düşmeye başlamıştır. Lökomaşit uygulaması dişi ratların hayatta kalma oranını etkilememiştir. 272 mg/kg lökomaşit yeşili ile beslenen erkek rat grubu hariç lökomaşit yeşili uygulaması erkek ratların hayatta kalma oranını etkilememiştir. 0, 91, 272, 543 mg/kg lökomaşit yeşili içeren yem ile beslenen erkek ve dişi rat gruplarında tiroid bezi folikül hücrelerinin adenom ve karsinom insidensinin düşük (%2-7) olduğu tespit edilmiştir. 0, 91, 272, 543 mg/kg lökomaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi rat gruplarında meme bezindeki karsinom veya adenom insidensi sırasıyla 0/48, 2/48, 3/48, 4/48 olarak bulunmuştur. Doz gruplarındaki dişi ve erkek ratlarda tek çekirdekli hücre lösemisinin azalma eğilimi gösterdiği ve tüm doz gruplarında bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sadece erkek ratlarda, hipofiz bezi adenomlarında azalma eğiliminde olduğu ve bunun tüm doz gruplarında istatistiksel olarak önem taşıdığı bulunmuştur. Gözlenemeyen yan etki seviyesi kanser etkilerinin görülmediği seviye için ratlarda günlük 91 mg/kg lökomaşit yeşili içeren yem ile beslenen ratlardaki doz olan günlük 5 mg/kg c.a. olarak belirlenmiştir (Culp *et al.*, 2006).

2.7.3 Genotoksisite ve Mutajenite

İLU uyumlu bir şekilde yapılan bir çalışmada, malaşit yeşili ve lökomaşit yeşilinin genotoksik ve mutajenik etkileri incelenmiştir. Malaşit yeşilinin bakteri ve memeli hücre kültürlerine karşı sitotoksik etkisinden dolayı yapılacak in vitro çalışmaları zorlaştırmaktadır. Yapılan bir çalışmada malaşit yeşili (okzalat tuzu) S9 karışımı içeren TA98 bulunan ortamlarda *Salmonella typhimurium* kültüründe mutasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Malaşit yeşili hamsterlerin ovaryum

hücrelerinde (CHO-K1) mutasyon meydana getirmemiş olup ovaryum hücrelerinin tek hücre elektroforezi yöntemi ile incelenmesi sonucunda sadece sitotoksik konsantrasyonlarda DNA da hasar meydana getirdiği görülmektedir. Bununla birlikte, malaşit yeşilinin kemik iliğine ulaşım ulaşımadığı bilinmemektedir. Farelerde 40 mg/kg c.a. doza kadar yapılan memeli spot testte çekinik spotlarda artış meydana getirmediği tespit edilmiştir. 67.5 mg/kg c.a. malaşit yeşili uygulanan B6C3F1 transgenetik dişi farelerin eritrositlerindeki mikronükleuslar üzerinde, lenfositlerde, karaciğer hücrelerinde mutajenik bir etkisi olmadığı görülmüştür. Malaşit yeşilinin artan konsantrasyonlarıyla birlikte DNA katımlarının arttığı tespit edilmiştir (Culp *et al.*, 1999).

Lökomalaşit yeşili malaşit yeşili ile kıyaslandığında bakteriler ve memeli hücrelerinde daha az sitotoksiktir ve yüksek konsantrasyonlardaki mutajenitesi incelenebilmektedir. Lökomalaşit yeşili *Salmonella typhimurium* kültüründe ve hamster ovaryum hücrelerinde (CHO-K1) mutasyona neden olmamıştır ve CHO-K1 hücrelerinde yapılan komet testte negatif sonuç bulunmuştur (Fessard *et al.*, 1998).

Günlük doz olarak 0, 0.9, 2.7, 9.1, 27.2 ve 54.3 mg/kg c.a. lökomalaşit yeşili uygulanan büyük mavi ratlarla yapılan bir çalışmada uygulanan lökomalaşit yeşili dozunun artması lac/mutasyon spektrum frekanslarında önemli bir artış meydana getirmemiştir. Ratların karaciğerindeki *cII* mutasyon frekansı, *Hprt* lenfosit mutant testi ve kemik iliği mikronükleus testi ile incelenmiş ve lökomalaşit yeşilinin bir etkisi bulunmadığı tespit edilmiştir (Culp *et al.*, 2002).

16 hafta süresince transgenetik dişi büyük mavi B6C3F1 farelerine 30.6 ve 61.2 mg/kg lökomalaşit yeşili uygulaması yapılmış ve lökomalaşit yeşili farelerin eritrositlerindeki mikronükleuslarda veya lenfositlerde mutasyonlar meydana getirmemiştir. Bununla birlikte, lökomalaşit yeşilinin dişi farelere yüksek dozda uygulanması sonucunda *cII* mutasyonlarıyla birlikte guaninin timine (G→T) ve adeninin timine (A→T) dönüşüm frekansında artış meydana getirmiştir (Mittelstaedt *et al.*, 2004).

Malaşit yeşilinin genotoksitesini ve mutajenitesine ilişkin test sonuçları Çizelge 2.3'de, lökomalaşit yeşilinin genotoksitesini ve mutajenitesine ilişkin test sonuçları Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.3: Malaşit Yeşilinin Genotoksisite ve Mutajenitesine İlişkin Test Sonuçları (WHO, 2009)

Test	Üzerinde Test Edilen	Konsantrasyon	Sonuç	Kaynak
<i>İn vitro</i>				
Ames test ^a	<i>S. typhimurium</i> TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537	0.05-160 ^b µg/plate	TA 98'li aktivasyon haricinde negatif ^c	Clemmensen et al.(1984)
Ames test ^d	<i>S. typhimurium</i> TA 97, TA 98, TA 100, TA 102	0.01-10 ^b µg/plate	Negatif ^e	Fessard et al. (1998)
Hprt test ^f	CHO-K1 hücreleri	0.001-1 µg/ml ve 1-20 µg/ml ^g	Negatif ^h	Fessard et al. (1998)
SCGE(komet) assay	CHO-K1 hücreleri	1-20 µg/ml ⁱ	3 µg yukarıdaki Sitetoksik dozlarda aktivasyon yok ^j ve 15 µg aktivasyon ^k olup DNA hasarı meydana gelmekte	Fessard et al. (1998)
<i>İn vivo</i>				
Mikronükleus assay	Fare kemik iliği hücreleri	37.5 mg/kg c.a.	Negatif	Clemmensen et al.(1984)
Memeli spot testi	Fare ^l	10,20 ve 40 mg/kg c.a.	Negatif	Mittelstaedt et al. (2004)
Mikronükleus	Büyük mavi B6C3F1 (D) Periferel fare ^m kanı	450 mg/kg c.a. 4-16 hafta süreyle	Negatif	Mittelstaedt et al. (2004)
Mikronükleus	Büyük mavi B6C3F1 (D) Periferel fare ^m kanı	450 mg/kg c.a. 4-16 hafta süreyle	Negatif	Mittelstaedt et al. (2004)

Çizelge 2.3 devamı

Test	Üzerinde Test Edilen	Konsantrasyon	Sonuç	Kaynak
<i>İn vivo</i>				
Lenfosit hprr mutant frekansı	Büyük mavi B6C3F1 (D) fare ^m dalağı	450 mg/kg c.a. 4-16 hafta süreyle	Negatif	Mittelstaedt et al. (2004)
<i>Cll</i> mutan frekansı	Büyük mavi B6C3F1 (D) fare ^m karaciğeri	450 mg/kg c.a. 16 hafta süreyle	Negatif	Mittelstaedt et al. (2004)
DNA katım formasyon	Fare ⁿ	28 gün süreyle 0, 100, 600 mg/kg doz uygulaması	Pozitif ^o , tekli DNA katım şekillenmiştir	Culp et al. (1999)
DNA katım formasyon	Rat ^p	28 gün süreyle 0, 100, 600 mg/kg doz uygulaması	Pozitif	Culp et al. (1999)

D. dişi; SCGE, Tek Hücre Jel Elektroforezi.

^a Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü' nün (OECD) metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz test prosedürü.

^b Her bir doz üçer kez ve her bir çalışma iki kez tekrarlanmıştır.

^c S9 ilavesi olmadığında 1.28 µg/plate dozu hücre toksisitesi meydana getirmiştir.

^d Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü' nün (OECD) metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz 471 nolu test prosedürü.

^e Hücre toksisitesi 0.5 µg/plate dozun üzerindedir.

^f OECD metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz 476 nolu test prosedürü.

^g 1-10 µg/plate dozu aktivasyonsuz, 1-20 µg/plate dozu aktivasyonlu.

^h Malaşit yeşili aşırı sitotoksik olup, sadece 0.05 µg/ml konsantrasyona kadar değerlendirilebildi.

ⁱ Her bir doz üç kez tekrarlandı ve en az birbirinden bağımsız iki test yapıldı.

^j Sitotoksosite ve DNA lezyonları arasında oldukça zayıf bir ilişki tespit edildi.

^k Hücre canlılığı < % 20' sinde düşmüştür.

^l Gebe C57B1/6J Han fareleri 8,9 ve 10. günlerde sonda vasıtasıyla 10, 20 ve 40 mg/kg c.a./gün malaşit yeşili uygulanmıştır.

^m Her grup 12 denekten oluşmaktadır.

ⁿ Her grup için 8 adet (B6C3F1; Nctr BR(C57BL/6Nx3H/HeN MTV-)) fareden oluşmaktadır.

^o Tekli katım veya co-eluting katımın doz bağılı olarak arttığı tespit edilmiştir. 600 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen farelerde katım seviyesi 580 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen farelerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

^p Her grup F344:N Nctr BR erkek ratlardan oluşmaktadır.

^r Tekli katım veya co-eluting katımın doz bağılı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Çizelge 2.4: Lökomalaşit Yeşilinin Genotoksitesitesi ve Mutajenitesine İlişkin Test Sonuçları (WHO, 2009)

Test	Üzerinde Test Edilen	Konsantrasyon	Sonuç	Kaynak
İn vitro				
Ames test ^a	<i>S. typhimurium</i> TA 97, TA 98, TA 100, TA 102	10-2000 ^b µg/plate	Negatif	Fessard et al. (1998)
<i>Hprt</i> assay ^c	CHO hücreleri	5-100 µg/ml	Negatif	Fessard et al. (1998)
SCGE(komet) assay	CHO	5-500 µg/ml ^d 25-300 ^e µg/ml	Negatif	Fessard et al. (1998)
İn vivo				
DNA katım formasyon	Fare ^f	28 gün süreyle 0, 96, 580 mg/kg doz uygulaması	Pozitif ^g	Culp et al. (1998)
İn vivo				
Mikronükleus	Büyük mavi B6C3F1 (D) Periferel fare ^h kanı	0,204, 408mg/kg c.a. 4-16 hafta süreyle	Negatif	Mittelstaedt et al. (2004)
Lenfosit <i>hprt</i> mutant frekansı	Büyük mavi B6C3F1 (D) Fare ^h dalağı	0,204, 408mg/kg c.a. 4-16 hafta süreyle	Negatif	Mittelstaedt et al. (2004)
<i>Cll</i> mutant frekansı	Büyük mavi B6C3F1 (D) fare ^h karaciğeri	450 mg/kg c.a. 16 hafta süreyle	Pozitif	Mittelstaedt et al. (2004)
DNA katım formasyon	Rat(E) ^f	28 gün süreyle 0, 96, 580 mg/kg lökomalaşit içeren yem	Positif ^g	Culp et al. (1999)
<i>LacI</i> mutant testi ^l	Büyük Mavi Rat (D) ^k	0, 9, 27, 91, 272 ve 543 mg/kg lökomalaşit içeren yem ^l	Mutatnt frekansı 543 mg/kg doz uygulanan grupta ^m ve 16. haftada yükselmiştir.	Culp et al. (2002)
DNA katım formasyonu	Büyük Mavi rat(D) ⁿ	28 gün süreyle 0, 9, 27, 91, 272 ve 543 mg/kg lökomalaşit içeren yem	≥91mg/kg lökomalaşit içeren yem ^g ile beslenenlerde pozitif	Culp et al. (2002)
Lenfosit <i>hprt</i> mutant frekansı testi ^o	Büyük mavi rat (D) ^k	0, 9, 27, 91, 272 ve 543 mg/kg lökomalaşit içeren yem ^l	Negatif ^p	Manjanatha et al. (2004)

Çizelge 2.4 (devamı)

Test	Deney Hayvanı	Konsantrasyon	Sonuç	Kaynak
<i>İn vivo</i>				
Kemik iliği mikronükleus testi	Büyük mavi rat (D) ^k	0, 9, 27, 91, 272 ve 543 mg/kg lökomalaşit içeren yem ^l	Negatif ^t	Manjanatha et al. (2004)
<i>Cll</i> mutan frekansı	Büyük mavi rat (D) ^f	0 ve 543 mg/kg lökomalaşit içeren yem 16 hafta süreyle	Negatif ^s	Manjanatha et al. (2004)

D, dişi; E, erkek; SCGE, Tek Hücre Jel Elektroforezi.

^a OECD'nin metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz 471 nolu test prosedürü.

^b 500 µg/plate ve daha yüksek konsantrasyonlarda presipitasyon gerçekleşmiştir.

^c OECD'nin metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz 476 nolu test prosedürü.

^d Aktivasyon yok. Her bir doz üç kez tekrarlandı ve en az birbirinden bağımsız iki test yapıldı.

^e Aktivasyon.

^f Her bir grup 8 adet fareden oluşmaktadır.

^g Tekli katım veya co-eluting katımın doz bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. 580 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen farelerde katım seviyesi 600 mg/kg malaşit yeşili içeren yem ile beslenen farelerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

^h Her bir grup 12 fareden oluşmaktadır.

^l Lökomalaşit uygulanmış farelerde Guanin→ Timin ve Adenin→ Timin dönüşümlerinde, arilamin karsinojenler tarafından meydana getirilen mutasyonlara benzeyen mutasyonlarda artış meydana gelmiştir.

^j Bu test baz çifti yer değiştirmelerini, çerçeve kayması mutasyonu (frameshift), dizindeki küçük silinmeler gibi mutasyonları tespit etmektedir.

^k Her grup sekiz adet rattan oluşmaktadır.

^l 4, 16 ve 32 hafta boyunca süren uygulamada 6 aylık ratlar kullanılmıştır.

^m Kontrol grubu ile kıyaslandığında 16 haftalık deneklerdeki *lacI* mutasyonunun frekansının önemli olmadığı tespit edilmiştir.

ⁿ Her grup için 4 adet rat kullanılmıştır.

^o Çalışmada kullanılan lenfositler uygulama yapılmış hayvanların dalaklarından alınmıştır.

^p Kontrol grubundaki ratların lenfositlerin frekansı 3×10^{-6} ile 12×10^{-6} arasında değişirken lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen ratların lenfositlerinde mutasyonun frekansı 2×10^{-6} ile 11×10^{-6} arasında değişmektedir.

^t Kontrol grubu ile kıyaslandığında lökomalaşit uygulama dozlarının veya uygulama sürelerinin hiç birisinde istatistiksel olarak önemli olabilecek bir artış tespit edilmemiştir.

^r Her grup 6 rattan oluşmaktadır.

^s 543 mg/kg lökomalaşit yeşili içeren yem ile beslenen dişi büyük mavi ratlarda hücre mutasyonu ve mutasyon frekansında artış tespit edilmemiştir.

2.7.4 Üreme toksisitesi

Meyer ve Jorgenson (1983) tarafından yapılan bir çalışmada her doz grubu 20 adet gebe Yeni Zelanda beyaz tavşanlarından oluşan doz gruplarına her gün 0, 5, 10 ve 20 mg/kg c.a. malaşit yeşili (okzalat tuzu, teknik saflıkta) ve talidomitin pozitif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada pozitif kontrol grubuna da uygulamanın 6. gününden 18. gününe kadar 150 mg/kg talidomit sonda vasıtasıyla uygulanmıştır. Tüm tavşanlar günlük olarak gözlenmiş ve vücut ağırlıkları 0, 6, 9, 12, 15, 18 ve 29. güne kadar kayıt edilmiştir. Daha sonra gebe dişiler öldürülerek sezeryan ile yavruları alınmıştır. Tüm genç bireyler incelenmiş, tartılmış ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Yavruların hayat belirtileri inkübasyon boyunca ilk dört saatlik süreçte ve 24. saatte kontrol edilmiştir. 24 saatin sonunda tüm yavrular öldürülerek gelişimleri sırasında meydana gelen anomaliler incelenmiştir. Malaşit yeşili uygulanan tavşanlar kontrol grubuna oranla daha az yem tüketmiş ve daha düşük vücut ağırlıklarına ulaşmışlardır. Malaşit yeşili uygulanan üç grupta yavru atıkları, ölü atık yapma oranında artış ve canlı fetüs oranında azalma meydana gelmiştir. Kontrol grubuna kıyasla malaşit yeşili uygulanmış gruplarda fetüslerin vücut ağırlıklarının ortalaması daha düşüktür. Malaşit yeşili uygulaması, 24 saatin sonunda fetüslerin hayatta kalma oranlarını önemli derecede azaltmaktadır. Doza bağlı olarak artış meydana gelmese de malaşit yeşili uygulanmış deneklerde kontrol grubuna göre iki kat fazla anomali görülmüştür. Gözlenemeyen yan etki seviyesi belirtilmemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan talidomit uygulanan grupta vücut ağırlığı kazanımında, canlı fetüs sayısında, fetüslerin vücut ağırlığı ve hareketliliğinde azalma ve gelişim anomalilerinde artış tespit edilmiştir.

2.7.5 Spesifik çalışmalar

2.7.5.1 Tiroid bezinin durumuna ilişkin çalışmalar

İLU uygun bir çalışmada, 6-7 haftalık 8 dişi ve 8 erkek rattan oluşan gruplar (F344/N Nctr BR) malaşit yeşili içermeyen ve 120 mg/kg c.a. denk gelecek şekilde yem ile beslenmiştir. Triiodotrin (T₃), tiroksin (T₄) ve tiroid stimulating hormone (TSH) seviyelerinin ölçümü için kan örneği alınmıştır. 21. günde kontrol

grubu ile kıyaslandığında malaşit yeşili uygulanmış gruptaki dişi ratlarda T₃ seviyesi önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. T₄ seviyesi ise 4. ve 21. günlerde malaşit yeşili uygulanmış dişi ratlarda önemli ölçüde düşük olduğu tespit edilmiştir. Malaşit yeşili uygulanan erkek ratların kanlarındaki T₃ ve T₄ seviyelerinde ve her iki cinsiyetteki ratların kanlarındaki TSH seviyelerinde önemli bir değişim tespit edilmemiştir (Culp *et al.*, 1999).

Lökomaşit yeşilinin tiroit hormonun sentezinde iyot ilave edilmesi ile görevli tiroit peroksidazı (TPO) inhibe edip etmediğine ilişkin yapılan bir çalışmada lökomaşit yeşilinin tirozin iyodinasyonunu ile katalize edilen TPO enzimini inhibisyonu, lökomaşit yeşilinin guatr tiroglobulinin iyodinasyonunu inhibisyonu, lökomaşit yeşilinin preiyodine guatr tiroglobulinini inhibisyonu incelenmiştir. Araştırmacılar kronik olarak lökomaşit yeşiline maruz kalınması durumunda TPO inhibisyonun tiroit foliküler hücrelerdeki tümörlere ve hormonal mekanizma üzerinde etkisi olduğunu düşünmektedirler(WHO, 2009).

İLU uygun bir çalışmada, , 6–7 haftalık 8 dişi ve 8 erkek rattan oluşan gruplar (F344/N Nctr BR) lökomaşit yeşili içermeyen ve 160 mg/kg c.a. denk gelecek şekilde, 1160 mg/kg lökomaşit yeşili içeren yem ile beslenmiştir. Triiodotrin (T₃), tiroksin (T₄) ve TSH seviyelerinin ölçümü için kan örneği alınmıştır. T₃ seviyesinde önemli bir değişiklik tespit edilmemiş olup, T₄ seviyesinde önemli bir düşüş ve TSH seviyesinde önemli bir artış tespit edilmiştir (Culp *et al.*, 1999).

2.7.5.2 Sitotoksisite

Stammati ve arkadaşları (2005) malaşit yeşilinin sitotoksisitesini iki tümör hücre hattı (Caco-2 ve Hep-2) üzerinde araştırmışlardır. Hep-2 canlılığı, Nötral red uptake assay ve total protein miktarı tespit edilmiştir. Proliferasyon yeteneği colony-forming test ile ölçülmüştür. Hep-2 üzerindeki doz-cevap sonuçları her iki test metodu ile ölçülmüş ve %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) Nötral red uptake testi için 2.03 µmol/l ve total protein content testi için 2.19 µmol/l olarak bulunmuştur. Colony forming test için inhibisyon konsantrasyonu 2.06 µmol/l olarak tespit edilmiştir. Caco-2 hücrelerinin sitotoksisitesinin belirlenmesinde sarı tetrazolyum tuzunun renkli formazan dönüşümü (MTT assay) ve sitoplazmik

laktat dehidrojenaz salgılanması (LDH salgısı) ve nötral red uptake assay kullanılmıştır. Uygulanan bu testler sonucunda %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) sırasıyla 16.2 µmol/l, 18.4 µmol/l ve 13.8 µmol/l olarak bulunmuştur.

Stammati ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan çalışmada, lökomalaşit yeşilinin sitotoksitesi iki tümör hücre hattı (Caco-2 ve Hep-2) üzerinde incelemiştir. Hep-2 canlılığı Nötral red uptake assay ve total protein content test ile tespit edilmiştir. Proliferasyon yeteneği colony-forming test ile ölçülmüştür. Sadece en yüksek doz olan 610 µmol/l konsantrasyonunda inhibisyon tespit edilmiştir. Tüm doz denemelerinde colony-forming test negatif sonuç vermiştir. Caco-2 hücrelerinin sitotoksitesinin belirlenmesinde sarı tetrazolyum tuzunun renkli formazan dönüşümü (MTT assay) ve sitoplazmik laktat dehidrojenaz salgılanması (LDH salgısı) ve nötral red uptake assay kullanılmıştır. Testler sonucunda hiçbir sitotoksik bulguya rastlanmamıştır.

2.7.5.3 Hücre transformasyonu

Suriye hamster embriyo hücreleri üzerinde malaşit yeşilinin sitotoksik etkileri ve meydana getirdiği değişimleri araştırmışlardır. Sitotoksite, malaşit yeşili uygulanan gruplar ve kontrol grubunun embriyo hücrelerinin logaritmik büyüme eğrileri kullanılarak koloni oluşturma verimliliğinin incelenmesi ile tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi testleri için embriyo hücreleri kültüre alınmış ve 24 saat süresince 0.025–0.1 µg/ml konsantrasyonunda malaşit yeşili uygulanmıştır. Uygulama sonrasında embriyo hücreleri toplanmış, süspansiyon haline getirilmiş, sonikasyon sonrasında santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant enzim aktivitelerinin tespitinde kullanılmıştır. Hücrelere malaşit yeşili uygulanması doza bağlı bir şekilde mono oksijenaz enzim sisteminin (aril hidrokarbon hidroksilaz ve aminopiren-N-demetilaz aktiviteleri), lipit peroksidasyonun (süperoksit dismütaz aktivitesi) ve katalaz aktivitesinin artışına neden olmuştur. Bu sonuçlar malaşit yeşilinin sitotoksik aktivitesinin oluşan serbest radikallere bağlı olduğunu göstermiştir (WHO, 2009).

Suriye hamster embriyo hücrelerinin malaşit yeşilini metabolize etmesi esnasında ortaya çıkan reaktif serbest radikaller elektron spin rezonans analizi ile tespit edilmiştir (WHO, 2009).

Suriye hamster embriyo hücrelerinde malaşit yeşilinin serbest radikal formasyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Embriyo hücreleri üç farklı konsantrasyonda malaşit yeşili içeren ortamda kültüre alınmış ve artan dozlara bağlı olarak etkilerin arttığı belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre meydana gelen bağlı serbest radikaller malaşit yeşilinin embriyo hücreleri üzerindeki genotoksitesini açıklamaktadır (WHO, 2009).

Malaşit yeşilinin senkronize ve senkronize olmayan hücre popülasyonlarında normal ve malaşit yeşili uygulamış Suriye hamster embriyo hücrelerinde hücre siklus fazlarının dağılımını incelemişlerdir. Normal hücrelerdeki G2/M fazına kıyasla malaşit yeşili uygulanmış hücrelerde G2/M fazında hücre bulunmadığı görülmüştür. Kontrol grubundaki hücrelerle kıyaslandığında malaşit yeşiline maruz kalmış Suriye hamster embriyo hücrelerinin apoptos hassasiyetinin azaldığını tespit etmişlerdir (WHO, 2009).

2.7.6 İnsanlar üzerindeki gözlenen etkiler

17.3 kg ağırlığında 3 yaşında bir kız çocuğu akvaryum balıkları için kullanılan ve içerisinde 45 mg malaşit içeren bir ürünü içmesi sonucu babası tarafından mavileşmiş dudakları ve tırnak kökleri fark edilerek hastaneye kaldırılmıştır. Çocuk hastaneye getirildiğinde genel bir siyanosis çizelgesu şekillenmiş olup baş, eller, kollar, ayak ve bacaklar mor renk almıştır. Nabız 115, solunum dakikada 30 ve vücut sıcaklığı 36.8 °C ve kandaki methemoglobin oranı %50.6 olarak tespit edilmiştir. 2 mg/kg c.a. metilen mavisi infüzyonu ile hasta tekrar eski vücut rengine dönmüş ve uygulamadan 2.5 saat sonra kandaki methemoglobin oranı %6.5' a düşmüştür (WHO, 2009).

2.8 Yasal Düzenlemeler

Malaşit yeşili, 2377/90 sayılı Avrupa Birliği kararıyla Avrupa Birliği ülkelerinde gıda amaçlı yetiştiriciliği yapılan canlılarda kullanımı yasaklanmıştır.

1991’de Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından, 1992’de Kanada Gıda Denetim Ajansı tarafından malaşit yeşilinin gıda amaçlı yetiştiriciliği yapılan canlılarda kullanımı yasaklanmıştır. 2005’de Japonya’da malaşit yeşilinin gıda amaçlı yetiştiriciliği yapılan canlılarda kullanımı yasaklanmıştır (Anonim, 2005). Ülkemizde ise malaşit yeşilinin gıda amaçlı yetiştiriciliği yapılan hayvanlarda kullanımı yasaklanmıştır(Anonim, 2006, 2007a,b).

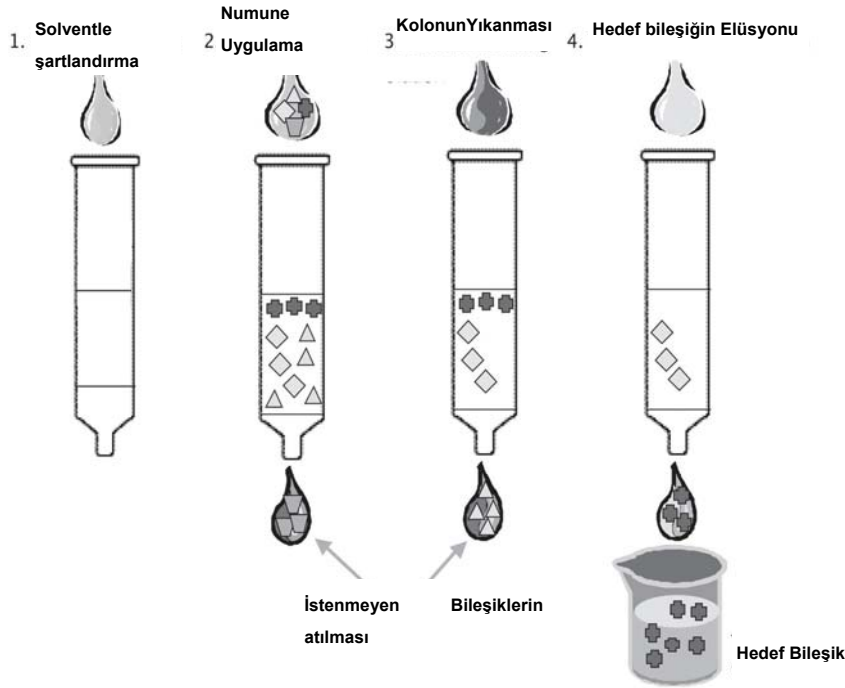
2.9 Su Ürünlerinde Malaşit Yeşili Kalıntısının Tespitine Yönelik Analiz Çalışmaları

2.9.1 Numune hazırlama (Ekstraksiyon)

Kalıntı analizlerinde hedeflenen bileşiğin analizin yapılacağı cihaz ve sistemde tespiti için numunenin analiz öncesinde fiziksel ve kimyasal yöntemlerle saflaştırılması ve analizi etkileyecek organik ve inorganik yapıların uzaklaştırılması gerekmektedir. Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin tespiti için numunenin analize hazırlanması oldukça karmaşık ve zaman alan bir süreçtir (Oğuzhan *et al.*,2006). Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının HPLC ile tespitine yönelik analiz tekniklerinin çoğunluğunda ilk ekstraksiyon aşamasında numuneye hidroksilamin hidroklorid (HAH), p-Toluen sülfonik asit ilavesi gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte tetrametil fenil diamin di hidroklorit (TMFD),Dietilen glikol gibi farklı kimyasal maddeler de kullanılabilir (Wendy *et al*, 2005, Halme *et al*, 2004, Long *et al*, 2008, Bergwerff *et al*, 2003, Mitrowska *et al*, 2005, Rushing *et al*, 1997). Bu kimyasal maddelerin ilavesi ile lökomalaşit yeşilinin malaşit yeşiline dönüşmesi önlenmesi amaçlanmaktadır.

Ekstraksiyon esnasında meydana gelebilecek pH değişimlerinin önüne geçilmesi amacıyla ekstrata genellikle amonyum asetat tampon, Mc Ilvaine tampon gibi tampon çözeltiler ilave edilmekte ve ekstrakt ultra torax, vorteks, ultrasonik banyo, otomatik çalkalayıcılar kullanılarak homojen bir şekilde karışım elde edilmesi gerekmektedir. Ekstraksiyonun devamında ekstrakta asetonitril, diklormetan çözücülerinin ilave edilerek karıştırılır. İlave edilen çözücüye malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının geçmesi için sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılır. Oluşan fazların ayrımı için ayırma hunisi kullanılabileceği gibi yüksek devirli

santrifüjleride kullanılabilir. Ekstraksiyondan ayrılan faz, katı faz ekstraksiyon ile istenmeyen maddelerden arındırılarak saflaştırılır. Katı faz ekstraksiyonda, kartuş içerisinde bulunan sorbentin molekülleri uygun koşullarda aktive edilir. Sorbentin içerisinden ekstraksiyon sıvısı geçerken tespit edilecek bileşik sorbente geçici olarak bağlanır ve diğer yabancı bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılır. Sorbentten uygun çözücü geçirilerek istenilen bileşik ekstrakte edilmiş olur. Şekil 2.4’de katı faza ekstraksiyonun aşamaları gösterilmiştir. Katı faz ekstraksiyonda farklı sorbent içeren kolonlar kullanılmaktadır (Alumina kolonlar, Propil sülfonik asit gibi, Kuvvetli kation değiştirici, vb.). Katı faz ekstraksiyonda elde edilen ekstrakt genellikle azot gazı altında uçurularak istenilen çözücüde çözülerek analiz edilir (Wendy *et al*, 2005, Halme *et al*, 2004, Long *et al*, 2008, Bergwerff *et al*, 2003, Mitrowska *et al*, 2005, Rushing *et al*, 1997).

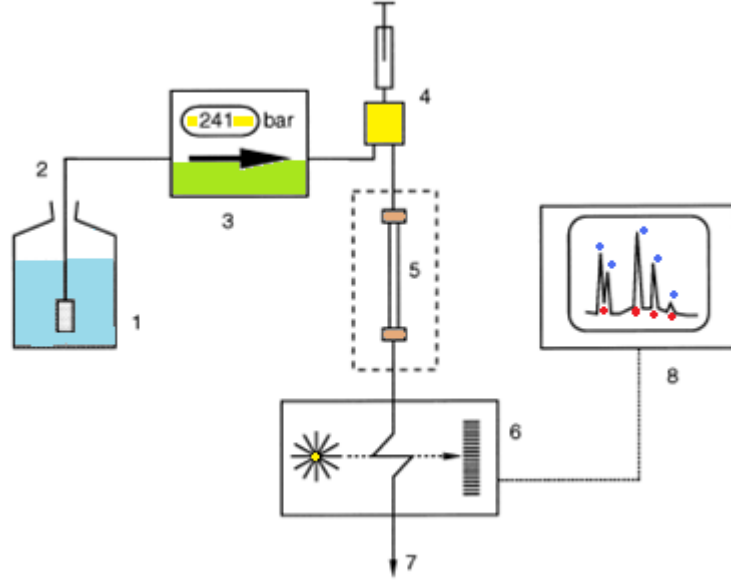


Şekil 2.4: Katı Faz Ekstraksiyon (www.biogate.com)

2.9.2 HPLC cihazı ve analiz sistemi

Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin tespitinde öncelikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisine (HPLC) dayalı yöntemler çalışılmıştır (Wendy *et al*, 2005,

Halme *et al*, 2004, Long *et al*, 2008, Bergwerff *et al*, 2003, Mitrowska *et al*, 2005, Rushing *et al*, 1997). Bu metotlar malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin, farklı dedektör türleri doğrudan veya kolon sonrası oksidasyon reaktörleri ile birlikte tespitine yönelik metotlardır Çizelge 2.5' de gösterilmiştir. HPLC ünitesini oluşturan temel parçalar şekil 2.5' de gösterilmiştir.



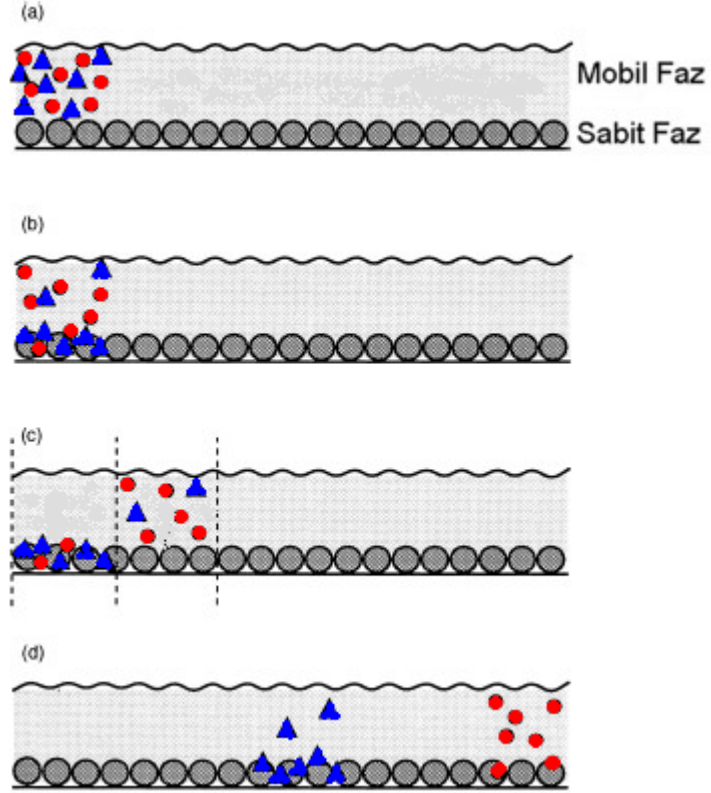
Şekil 2.5: HPLC ünitesi Temel Diagramı (1) Çözücü Şişesi (2) Filtreli (frit) transfer hattı (3) Pompa (4) Enjektör (5) Kolon (Termostatlı) (6) Dedektör (7) Atık (8) Veri Değerlendirme (Meyer, 2004).

Çizelge 2.5: Malaşit yeşili ve lökomaşit yeşilinin yüksek basınçlı likit kromatografi (HPLC) Tespit Metotları

Ekstraksiyon	Katı Faz Ekstraksiyon	Kromatografik Ayrım Kolonu ve Mobil Faz (MF)	Dedektör	Tespit Limiti	Referans
Hidroksil Amin Hidroklorid (HAH), Amonyum asetat, Asetonitril, p-TSA	Nötral Alumina Kolon, Bond Elut PRS Kolon	SCD-100 C18 Klon (150 x 4,6 mm, 5 µm) MF : Asetonitril, Amonyum Asetat	PDA, Floresan dedektör Kolon sonrası Oksidasyon Reak.	MY: 10 µg/kg	Rushing et al, 1997
Asetonitril, Asetat Tampon, Diklormetan, p-TSA	Strata SCX Kuvvetli Katyon değiştirici SFE kolon	Luna Phenil Hexil C 18 kolon (150 x 4,6 mm, 5 µm) MF : Asetonitril, Amonyum Asetat	Diod Array dedektör (DAD), Floresan dedektör (FLD)	MY: 0,37 µg/kg LMY: 0,32 µg/kg	Mitrowska et al, 2005
Mc Ilvaine ph3 tampon, p-TSA, TMPD(Tetra metil Fenil Diamin di hidroklorid), Asetonitril, Diklormetan	Sülfonik Asit Bağlı SFE kartuj	İntersil ODS-2 (100 x 3.0 mm, 8 µm) MF : Sodyum asetat, asetonitril	Light Absorbance dedektör, Pre Kolon Oksidasyon reak.	MY: 0,21 µg/kg LMY: 0,21 µg/kg	Long et al, 2009
Hidroksil Amin Hidroklorid (HAH), Amonyum Asetat, p-TSA, Asetonitril, Diklormetan, Dietilen glikol	LC Alumina-N SFE	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm) MF: Asetonitril, pH 2,5 fosfat tampon	Diod Array Dedektör, Kolon sonrası oksidasyon Reak.	MY: 0,17 µg/kg LMY: 0,23 µg/kg	Long et al, 2008
Hidroksil Amin Hidroklorid (HAH), Amonyum asetat, Asetonitril, p-TSA, Diklor metan	Baker Bond Alumina, Bond Elute Propil Sülfonik Asit SFE	Chromspher 5B Kolon (100 x 3.0 mm, 5 µm) MF: Amonyum asetat+Trietilamin, Asetonitril	Diod Array dedektör, Kolon sonrası Oksidasyon Rek.	MY: 1,6 µg/kg LMY: 1,2 µg/kg	Halme et al, 2004
Hidroksil Amin Hidroklorid (HAH), Amonyum Asetat, p-TSA, Asetonitril, Diklormetan	ALN-SPE Alumina kolon, Propil Sülfonik Asit Kolon Bond Elut	Alltech Altima C 18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) Asetonitril, Amonyum Asetat	Diod Array dedektör	MY: 1 µg/kg	Wendy et al, 2005

2.9.2.1 Kromatografik süreç

Kromatografi, örnek karışımının kromatografik yatak (kolon veya düzlem) içindeki iki faz arasındaki ayrılma sürecidir. Fazın biri sabit iken diğeri bu kromatografik yatak içersinde ilerler. Sabit faz gerek katı, porlu, küçük partiküllerden oluşmuş aktif yüzeyli materyal gerekse de sıvı kaplı ince bir film tabakasından oluşabilir. Mobil (hareketli) faz ise sıvı veya gaz olabilir ki gaz kullanılan sistemlere Gaz Kromatografi, sıvı kullanılan sistemlere ise Likit Kromatografi denmektedir. Likit Kromatografik sistemlerde ayırma işlemi aşağıdaki basamaklarda belirtildiği gibi gerçekleşir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Ayırma işleminin grafiksel ifadesi (Meyer, 2004)

- a- ● ve ▲ gibi iki bileşik karışımı kromatografik sisteme verilir (a).
- b- ▲ bileşiği sabit fazda kalma eğiliminde olmasına rağmen ● bileşiği daha çok hareketli fazı tercih eder (b).
- c- Karışım ilavesi devam ederken yeni bir denge oluşmaya başlayacaktır. Mobil faz içindeki örnek molekülleri dağılma katsayılarına göre sabit fazdaki açık uçlara bağlanma eğilim göstereceklerdir. Yeni moleküllerin dağılma katsayıları yüksek olduğu için sabit faza tutunmuş olan moleküllerin tekrar mobil faz içersine geçmesine sebep olacaktır. Ve bu süreç yeni ve eski moleküller arasında işlem boyunca devam edecektir (c).
- d- İşlem defalarca tekrarlandığında iki bileşik sonunda birbirinden ayrılır. ● bileşiği mobil fazı tercih ettiği için hızla kolon içersinden geçecektir. ▲ bileşiği ise sabit faza daha fazla eğilim içinde olduğundan kolonu geç terk edecektir (d).

2.9.2.1 Pompalar

Bir HPLC pompası iki farklı özelliği birleştirebilmelidir; bir tanesi, 350 hatta 500 bara kadar yüksek bir basınca dayanıklı sağlam bir yapıda olması; diğeri ise, buna ilaveten kullanıcı tarafından seçilen yüksek akış doğruluğu ve istenilen bir akış hızı hassasiyetini sağlamasıdır. Akış hızı genellikle 0,1 ml/dk dan 5 hatta 10 ml/dk kadar değişmektedir. Akış hızı gerektiğinde dereceli uygulanarak istenilen zamanda uygun hıza getirilebilir. Akış stabil ve dalgasız olmalıdır (Meyer, 2004).

2.9.2.3 Dedektörler

Bir dedektör, aranılan madde kolondan geçerken onu fark edebilecek yetenekte olmalıdır. Bu nedenle, her ne sebeple olursa olsun mobil faz kompozisyonundaki değişimi hemen fark etmeli, bunu bir elektrik sinyaline dönüştürmeli ve daha sonra temel hat çizgisinden farklı bu sapmayı hesaplamalı ve gösterebilmelidir.

2.9.2.3.1 Ultraviole / görünür bölge dedektör (Ultraviolet / Visible detector - UV/VIS)

Absorbans ölçülür. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür.

2.9.2.3.2 Fotodiyot array dedektör (Photodiode array dedector-DAD)

UV/VIS dedektörden farkı, çok geniş bir skalada, her dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır (Meyer, 2004).

2.9.2.3 Fluoresans dedektörler(Fluorescence Ligth Dedector-FLD)

Fluoresans yeteneğine sahip veya türevleriyle fluoresans yapabilen bileşikler bu dedektörle çok rahat tespit edilebilir. Bu yüksek seçicilik bazen UV dedektörlere oranla 1000 kat fazla olabilir. Uygun dalga boyundaki ışın hücreden geçer ve daha yüksek dalga boylu ışın (emisyon) doğru konuma yerleştirilmiş dedektörce tespit edilir. Işık yoğunluğu ve seçicilik hassasiyeti daha büyük bir hücre kullanılarak arttırılabilir. Gelişmiş sistemlerde ekstinksyon dalga boyu ayarlanabilmekle ve böylece spesifitesi arttırılmaktadır. Ancak bu durum hassasiyeti düşürmektedir. Sistemde fluoresans bozunmaya yol açan bileşikler veya oksijenin bulunmamasına dikkat edilmelidir (Meyer, 2004).

2.9.2.4 Kolonlar

HPLC kolonlarının çoğu içinden geçen mobil faza karşı korozyona dayanıklı, HPLC basıncına dayanabilen krom-nikel-molibdenim karışımı paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Kolon içyapısı pürüzsüz, granülsüz ve mikroporsuz bir yapıda olmalıdır. Genellikle 2-5 mm'lik iç çaplı kolonlar kullanılmakla birlikte özel amaçlar için 10 mm hatta 25 mm'lik kolonlar da kullanılmaktadır. Kolon boyları olarak 5, 10, 15 ve 25 cm'lik olanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolon dolgu maddesi porlu bir yapıda olup madde geçişini zorlaştırıcı bir yapıya sahiptir. Kolondan geçen maddeler kolon dolgu materyalinin özelliğine bağlı olarak tutulma ve alıkonmalara maruz kalarak istenilen ayırma gerçekleştirilmiş olur.

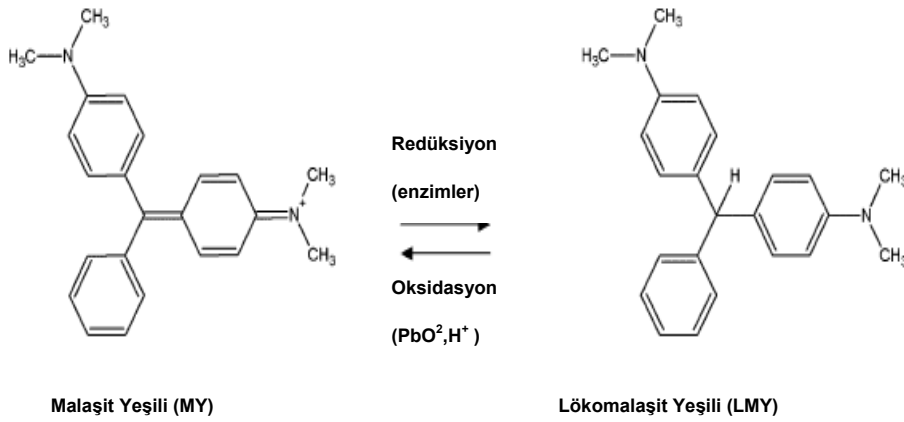
2.9.2.5 Zıt faz kromatografisi

Zıt faz kromatografisi hareketli fazın sabit fazdan daha polar olduğu durumları açıklamak için kullanılan bir terimdir. 18 karbonlu (C18) bir n-alkan olan kimyasal bağlı oktadesilsilan (ODS) en yaygın olarak kullanılan sabit fazdır. Bunun yanı sıra C8 ve kısa alkil zincirleri ve aynı zamanda sikloheksil ve fenil grupları alternatif olarak kullanılmaktadır. Mobil faz genellikle su karışımları veya suda çözülebilir çeşitli sulu tamponlardan oluşmaktadır. Başlıca tercih edilen

çözücüler: metanol, acetonitril, etanol, propan-1-ol, tetrahidrofuran' dır (Meyer, 2004).

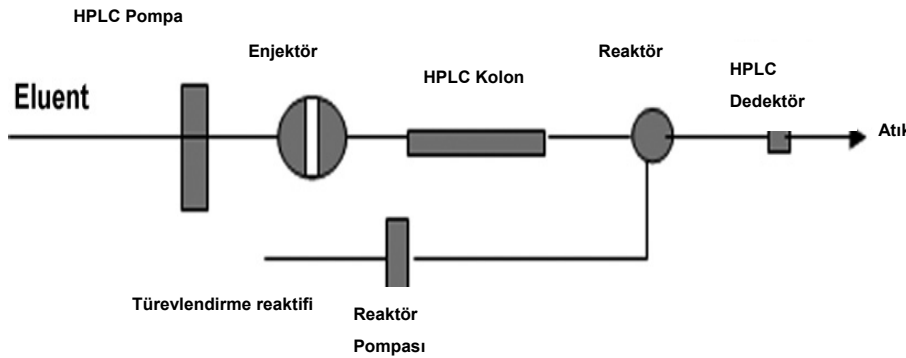
2.9.3 Kolon sonrası oksidasyon reaktörleri

Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin birlikte tespit edilmesi için PbO_2 içeren kolon sonrası oksidasyon üniteleri kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu sistem vasıtasıyla lökomalaşit yeşili oksidasyon ile malaşit yeşiline dönüştürülerek tespit edilmesi amaçlanmaktadır (Şekil 2.7)



Şekil 2.7: Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili arasındaki oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonu (Long *et al*, 2008)

Oksidasyonun gerçekleşmesi için PbO_2 , PbO_2 -selit karışımı, iodin gibi oksidantlardan hazırlanan çözeltiler bir pompa vasıtasıyla kolon çıkışına yönlendirilerek kolondan ayrımı gerçekleşen lökomalaşit yeşilin oksidasyon sonucu malaşit yeşiline dönüşmesi ve dedektöre girmesi sağlanır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Kolon sonrası Derivatizasyon HPLC Sisteminin Şeması (Long *et al*, 2008)

2.9.4 KütLe spektrometrisi

KütLe spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütLe/yük (m/z) oranlarına göre diğEr yüklü partiküllerden ayırt ederek analiz etme esasına göre çalışmaktadır. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütLe spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil değildir ve diğEr moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır ve yüklerini kaybederler. Oluşan her bir iyon spesifik bir moleküler kütleye ve yüke sahiptir ve m/z değerlerinin yoğunluğA (intensite) karşı gösterildiğİ bir spektrum ile bileşik tanımlanmaktadır. Her bir iyonun yoğunluğU dedektöre ulasan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğın spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğın analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanır. KütLe spektrometrisi son yıllarda özellikle kalıntı analizlerinde UV-VIS, DAD, FLD gibi dedektörlerin yerine tercih edilmeye başlanmıştır. UV-VIS, DAD, FLD gibi dedektörlerde analiz edilecek analitle aynı dalga boyunda absorban veren maddeler nedeniyle hatalı sonuçlar elde edilebilmektedir. KütLe spektrometrisi ile yapılan ölçümlerde ise her bir maddenin meydana getirdiğİ spektrumun kendine has olması hatalı sonuçların önüne geçmektedir. Bununla birlikte artan dedektör hassasiyeti özellikle $\mu\text{g}/\text{kg}$ düzeyinde tespit limitlerine inilebilmesini sağlamıştır. Kullanımı yasaklanmış maddeler için ng/kg seviyesinde ölçüm yapabilen sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. KütLe spektrometrisi ile ng/kg seviyesinde analiz yapmak mümkündür. Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin likit kromatografi tandem kütLe spektrometrisinde (LC-MS/MS) tespitine yönelik metotlar çizelge 2.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6: Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin likit kromatografi tandem kütle spektrometrisinde (LC-MS/MS) Tespit Metotları

Ekstraksiyon	Katı Faz Ekstraksiyon	Kromatografik Ayrım Kolonu ve Mobil Faz (MF)	İyonizasyon Tekniği ve MS Dedektör	Tespit Limiti	Referans
Amonyum asetat, Asetonitril		Symetry C18 (75 x 4,6mm, 3,5 µm) MF: Asetonitril(%0,1Formik asit), Amonyum Asetat	Elektro Sprey İyonizasyon MY: 329,2-313, LMY: 331,2-,239	MY+LMY: 1µg/kg	Hall <i>et al.</i> , 2008
Mc Ilvaine tampon, p-TSA, Tetra metil fenil diamin diklorit, diklor metan, Pentan sülfonik asit,asetonitril	Aromatik Sülfonik Asit SFE	Symetry (250 x 4,6 mm, 5 µm) MF : Asetonitril, amonyum asetat	Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon MY: 329-313	MY: 0,15µg/kg	Valle <i>et al.</i> , 2005
Amonyum asetat, Diklor metan	Oasis MCX SFE	Hypersil Gold CN (50 x 2,1 mm, 5 µm) MF: Metanol, %0,1 Formik asit	Elektro Sprey İyonizasyon, MY: 329(313,208) LMY: 331 (239,316)	MY+LMY: 0,5 µg/kg	Ding <i>et al.</i> , 2008
Hidroksil Amin Hidroklorid (HAH), Amonyum Asetat, p-TSA, Asetonitril, Diklorometan, Dietilen glikol	ALN-SPE Alumina kolon, Propil Sülfonik Asit Kolon Bond Elut	Alltech Altima C 18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) Asetonitril, Amonyum Asetat	Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon, MY: 329(313,285,251)	MY: 1 µg/kg LMY: 1 µg/kg	Wendy <i>et al.</i> , 2006

Çizelge 2.6: (devamı)

Ekstraksiyon	Katı Faz Ekstraksiyon	Kromatografik Ayrım Kolonu ve Mobil Faz (MF)	İyonizasyon Tekniği ve MS Dedektör	Tespit Limiti	Referans
Hidroksil Amin Hidroklorid (HAH), Asetonitril		Synergy Max RP 80 A (150 x 2mm, 4 µm) MF : Asetonitril, Amonyum Asetat	Elektro Sprey İyonizasyon MY: 329(313,208) LMY: 331(239,316)	MY: 0,51 µg/kg LMY: 0,50 µg/kg	Arroyo et al, 2008
Asetonitril(askorbik asit, perklorik asit), Diklorometan	Strata X SFE	Beta Basic C 18 (50 x 2.0 mm, 5 µm) MF : Sodyum asetat, asetonitril (%0,1 Formik asit)	Elektro Sprey İyonizasyon MY: 329 (208,313) LMY: 331(239-316)	MY: 0,13 µg/kg LMY: 0,06 µg/kg	Lee et al, 2006
Mc Ilvaine tampon, p-TSA, Tetrametil fenil diammin diklorit	Aromatik Sülfonik Asit SFE	Phenomenex Luna C18 (150 x 2,0 mm, 3 µm) MF: Asetonitril, asetat tampon	Atmosferik Basınç Foto İyonizasyon MY: 329 (208,313) LMY: 331(239-316)	MY: 0,19 µg/kg LMY: 0,18 µg/kg	Scherpenisse et al, 2005

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada gıda amaçlı tüketilen su ürünlerinde kullanımı yasaklanmış olan malaşit yeşili ve metaboliti olan lökomalaşit yeşili kalıntısının balıklarda yüksek basınçlı sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile tespitine yönelik, Avrupa Birliği referans laboratuvarı olan AFSSA (Fougères, Fransa) tarafından kullanılan confirmasyon analiz metodu (Sanders *et al.*, 2005) ile çalışılarak laboratuvar şartlarında validasyonu hedeflenmiştir.

3.1 Numunelerin Alınması

Avcılık yoluyla veya yetiştiricilik yapan işletmelerden malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili içermediği bilinen gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarından elde edilen numuneler analiz için kullanılmıştır. Balıkların sol operkulumun hemen arkasından, dorsal yüzgeç ile yanal çizgi arasında kalan dorso-lateral bölgeden makas ve bıçak yardımı ile fletosu alınarak laboratuvar tipi blender (Waring, ABD) ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen numuneler naylon poşetlere konularak üzerine gerekli bilgiler yazılıp etiketlendikten sonra analiz edilene kadar -20 °C’de derin dondurucuda stoklanmıştır.

3.2 Standart ve Kimyasallar

Analiz için kromatografik saflıkta kimyasal maddeler kullanılmıştır. Malaşit yeşili (Riedel De Haen, 46396, Almanya) %97,2 saflıkta, lökomalaşit yeşili (Sigma Aldrich, 12-566-0, Almanya) %99,6 saflıkta, kristal viole (Riedel De Haen, 46364, Almanya) %89,9 saflıkta, lökomalaşit yeşili D₆ (Dr. Ehrenstorfer GmbH, C 14629510, Almanya) %98,5 saflıkta sertifikalı referans standartlar kullanılmıştır.

Kimyasal madde olarak; ultra saf su (ELGA Purelab, İngiltere) ile elde edilen yüksek saflıkta su (18.2 MΩ), asetonitril (Sigma Aldrich, 34851,

Steinheim, Almanya) ve metanol (Sigma Aldrich,34885, Steinheim, Almanya), amonyum asetat (Merck, 1-01115.1000, Darmstadt, Almanya), hidroksilamin hidroklorit (Merck, 1-04616.0100, Darmstadt, Almanya), asetik asit(Merck, 1-00063.1000, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır.

3.3 Cihaz ve Ekipmanlar

3.3.1 Tartım ve ekstraksiyon

Standartlar ve kimyasal maddelerin tartımı için ± 0.0001 hassasiyete sahip terazi (Sartorius, Almanya), numunelerin tartımı için ± 0.001 hassasiyete sahip terazi (Sartorius, Almanya) kullanılmıştır. Ekstraksiyon esnasında soğutmalı santrifüj (Rotina 35R, Hettich, Almanya), çoklu vorteks (Multireax, Heidolph, Almanya), vorteks (Scientifica, Almanya), pH metre (Mettler Toledo, İngiltere), dispenser (İsolab, Almanya), 0.45 μm rejenere selülöz filtre (Sartorius, Almanya), 50 ml hacimli PP santrifüj tüpleri (Jet Biofil, Japonya) kullanılmıştır.

3.3.2 Likit kromatografi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS)

Enstrümental analiz için LC-MS/MS triple quadropole sistem (Model 6460, Agilent, ABD), kromatografik kolon olarak Symetry C18 (4.6x150 mm, 5.0 μm partikül büyüklüğü, Waters, ABD) kullanılmıştır.

3.4 Standart ve Solüsyonların Hazırlanması

0,1 M Amonyum Asetat Solüsyonun Hazırlanması

7, 708 gr amonyum asetat hassas terazide tartılarak 1000 ml'lik balon jøjeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar su ilave edilerek çözülür. Solüsyonun üzerine asetik asit ilave edilerek pH' sı pH metre yardımıyla 4,5'a ayarlanmıştır.

Amonyum Asetat-Asetonitril Karışımı (30:70) Hazırlanması

30 ml 0,1 M amonyum asetat) 100 ml'lik bir balon jojeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar asetonitril ilave edilerek çözülmüştür.

Hidroksilamin solüsyonu(5gr/L) Hazırlanması

5 gr hidroksilamin hassas terazide tartılarak 1000 ml'lik balon jojeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar su ilave edilerek çözülmüştür.

Hidroksilamin-Asetonitril Karışımı (20:80, v/v) Hazırlanması

20 ml hidroksilamin solüsyonu (5gr/L) 100 ml'lik bir balon jojeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar asetonitril ilave edilerek çözülmüştür.

Stok Malaşit Yeşili Standart Solüsyonu (1000 ppm) Hazırlanması

14,06 mg malaşit yeşili standardı saflık oranı hesaplanıp, hassas terazide tartılarak 10 ml'lik balon jojeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar metanol ilave edilerek çözülmüştür. -20 °C'de karanlık ortamda 6 ay süreyle saklanır.

Stok Lökomaşit Yeşili Standart Solüsyonu (1000ppm) Hazırlanması

10 mg lökomaşit yeşili standardı hassas terazide tartılarak 10 ml'lik balon jojeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar metanol ilave edilerek çözülmüştür. -20 °C'de karanlık ortamda 6 ay süreyle saklanır.

Stok Kristal Viole Standart Solüsyonu (1000 ppm) Hazırlanması

10 mg kristal viole standardı hassas terazide tartılarak 10 ml'lik balon jojeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar metanol ilave edilerek çözülmüştür. -20°C'de karanlık ortamda 6 ay süreyle saklanır.

**Stok Lökomaşıit Yeşili D₆ Standardı Solüsyonu (1000 ppm)
Hazırlanması**

10 mg lökomaşıit yeşili D₆ standardı hassas terazide tartılarak 10 ml'lik balon jøjeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar metanol ilave edilerek çözülmüştür. -20 °C'de karanlık ortamda 6 ay süreyle saklanır.

Ara Stok Malaşıit Yeşili Standart Solüsyonu (20 ppm) Hazırlanması

200 µl stok malaşıit yeşili standart solüsyonu mikro pipet ile 10 ml'lik balon jøjeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar Amonyum Asetat-Asetonitril Karışımı ilave edilerek çözüdür. +4°C'de karanlık ortamda 3ay süreyle saklanır.

**Ara Stok Lökomaşıit Yeşili Standart Solüsyonu (20 ppm)
Hazırlanması**

200 µl stok lökomaşıit yeşili standart solüsyonu mikro pipet ile 10 ml'lik balon jøjeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar asetonitril ilave edilerek çözülmüştür. +4 °C'de karanlık ortamda 3ay süreyle saklanır.

Ara Stok Kristal Viole Standart Solüsyonu (20 ppm) Hazırlanması

200 µl stok kristal viole standart solüsyonu mikro pipet ile 10 ml'lik balon jøjeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar Asetonitril ilave edilerek çözüdür. +4 °C'de karanlık ortamda 3ay süreyle saklanır.

**Ara Stok Lökomaşıit Yeşili D₆ Standart Solüsyonu (20 ppm)
Hazırlanması**

200 µl stok lökomaşıit yeşili D₆ standart solüsyonu mikro pipet ile 10 ml'lik balon jøjeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar asetonitril ilave edilerek çözüdür. +4 °C'de karanlık ortamda 3ay süreyle saklanır.

Malaşit Yeşili ve Lökomalaşit Yeşili Çalışma Standart Solüsyonu (2ppm) Hazırlanması

1ml ara stok malaşit yeşili standart solüsyonu ve 1 ml ara stok lökomalaşit yeşili standart solüsyonu mikro pipet ile 10 ml'lik balon jøjeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar hidroksilamin-Asetonitril Karışımı ilave edilerek çözülür. Günlük hazırlanır.

Kristal Viole ve Lökomalaşit Yeşili D₆ Çalışma Standart Solüsyonu (2ppm) Hazırlanması

1ml ara stok Kristal viole standart solüsyonu ve 1 ml ara stok lökomalaşit yeşili D₆ standart solüsyonu mikro pipet ile 10 ml'lik balon jøjeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar hidroksilamin-Asetonitril Karışımı ilave edilerek çözülür. Günlük hazırlanır.

Malaşit Yeşili ve Lökomalaşit Yeşili Yükleme Standart Solüsyonu (20 ppb) Hazırlanması

100 µl malaşit yeşili ve 100 µl lökomalaşit yeşili çalışma standart solüsyonu mikro pipet ile 10 ml'lik balon jøjeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar hidroksilamin-asetonitril karışımı ilave edilerek çözülür. Günlük hazırlanır.

Yükleme İnternal Standart Solüsyonu (20 ppb) Hazırlanması

100 µl kristal viole ve 100 µl lökomalaşit yeşili D₆ çalışma standart solüsyonu mikro pipet ile 10 ml'lik balon jøjeye alınarak üzerine hacim çizgisine kadar hidroksilamin-asetonitril karışımı ilave edilerek çözülür. Günlük hazırlanır.

3.5 Blank ve Numunelerin Ekstraksiyonu

Numuneden 50 ml'lik santrifüj tüpüne 2 ± 0.05 g tartıldı. Tartılan numunenin üzerine 200 µl yükleme internal standart solüsyonu, 2 ml hidroksilamin solüsyonu ve 800 µl saf su ilave edildi. Numune vorteks yardımı ile

5 dakika karıştırıldı. 8ml asetonitril eklenerek tekrar 10 dakika vortekslendi. 4000 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Sıvı üst fazdan enjektör yardımı ile 1,5 ml alınıp, 0,45µm'lik rejenere selüloz filtreden geçirilerek viale alındı.

3.6 Standart Yüklenmiş Numunelerin Hazırlanması ve Ekstraksiyonu

Numuneden 50 ml'lik santrifüj tüpüne 2 ± 0.05 g tartım yapılır. Tartılan numunenin üzerine 200 µl yükleme internal standart solüsyonu, 200µl malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili yükleme standart solüsyonu ilave edilerek 1 dakika karıştırıldı ve 2 ml hidrosilamin solüsyonu ve 600 µl saf su ilave edildi. Ekstraksiyon işlemleri numuneye uygulandığı gibi aynen tekrarlandı.

3.7 LC-MS/MS'de Analiz

Mobil faz olarak 0.1 M amonyum asetat (pH 4.5) ve asetonitril kullanıldı. Analiz esnasında kullanılan mobil fazların sistemdeki akış hızı ve zamana bağlı değişen karışım yüzdeleri tespit edildi (Çizelge3.1). Kolon fırın sıcaklığı 35 °C, otomatik örnekleyici bölmesinin sıcaklığı ise 4°C olarak belirlendi. Enjeksiyon hacmi 20 µl olarak uygulandı. Toplam analiz 12 dakikalık periyotta gerçekleştirildi. İyonizasyon tekniği multiple reaction mod (MRM) ile birlikte Elektro Sprey İyonizasyon (ESI) (+) mod, kapılar voltaj 4000 V, Nebulizer basıncı 45 psi, gaz akış hızı 11 L/dakika, gaz sıcaklığı 350 °C olarak uygulandı. Kristal viole ve lökomalaşit yeşili D₆ internal standart olarak kullanıldı. Malaşit yeşili, lökomalaşit yeşili, kristal viole, lökomalaşit yeşili D₆ için ana iyon, parçalanma iyonları ve kütle spektrometrisi parametreleri tespit edildi. Malaşit yeşili, lökomalaşit yeşili, kristal viole, lökomalaşit yeşili D₆ için tespit edilen ana iyon, parçalanma iyonları ve kütle spektrometrisi parametreleri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Analiz çalışmaları Mass Hunter programı ile gerçekleştirilmiştir. Her bir örneğe ait malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili µg/kg konsantrasyon değerleri kalibrasyon kurvesinden hesaplanmıştır.

Sistem otomatik olarak, numunelerin ekstraksiyonlarından yapılan 20 µl 'lik enjeksiyonları kalibrasyon eğrisi için daha önceden belirlenen kalibrasyon çalışma

solüsyonlarına ait kromatogramların pik alan değerleri ile karşılaştırma yaparak ppb düzeyinde sonuçları verir.

3.8 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisi hazırlanması için, blank doku örneğinden 5 adet 50 ml santrifüj tüpüne 5 ± 0.05 g tartıldı. 0 – 50 – 100 – 200 – 400 µl malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili yükleme standart solüsyonu ilave edilerek 1 dakika karıştırıldı (Blank, 500 ppt, 1ppb, 2ppb, 4ppb). Ekstraksiyon işlemleri numuneye uygulandığı gibi aynen tekrarlandı. Kalibrasyon eğrisi, ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstraktlar LC-MS/MS ile analiz edilerek içerdikleri konsantrasyona bağlı elde edilen pik alanlarının grafik üzerindeki noktalarının meydana getirdiği doğrusal doğrunun oluşturulması ile bulundu.

Çizelge 3.1: Mobil fazların sistemdeki akış hızı ve zaman bağlı değişen karışım yüzdeleri

Süre (dakika)	Akış Hızı (ml/dakika)	% 0.1M Amonyum asetat	% Asetonitril
0	0.8	50	50
3	0.8	0	100
7	0.8	0	100
7.5	0.8	50	50

Çizelge 3.2: Malaşit yeşili, lökomalaşit yeşili, kristal viole, lökomalaşit yeşili D₆ için tespit edilen ana iyon, parçalanma iyonları ve kütle spektrometrisi parametreleri

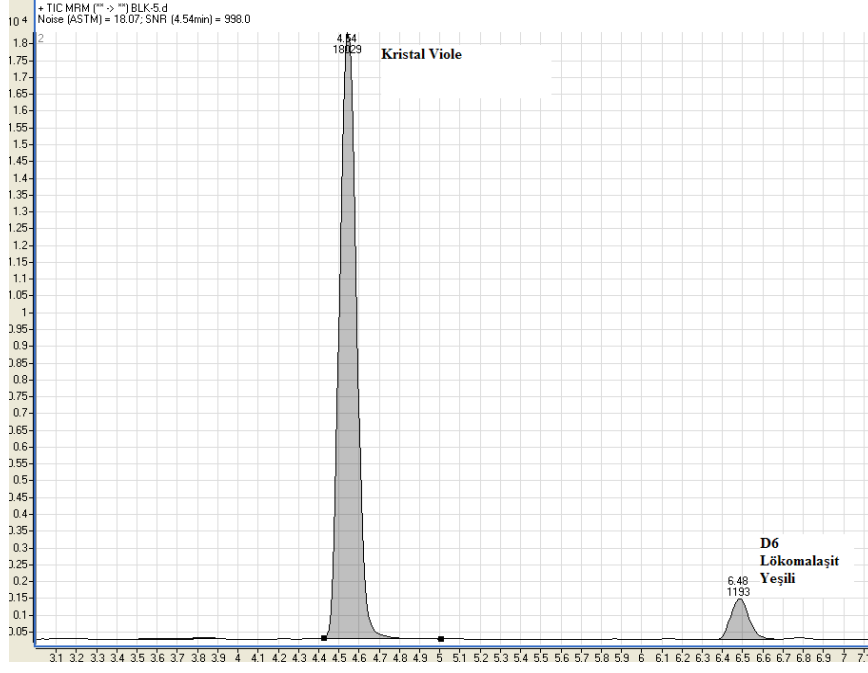
Bileşik	Ana İyon	MS1 Rezolüsyon	Product İyon	MS2 Rezolüsyon	Dwell Time	Fragmet Voltaj	Collision Enerji
Malaşit yeşili	329.2	Wide	313	Wide	100	180	40
		Wide	208	Wide	100	100	20
Lökomalaşit yeşili	331.2	Wide	316	Wide	100	100	20
		Wide	239	Wide	100	100	30
Kristal Viole	372.2	Wide	356.1	Wide	100	160	40
Lökomalaşit yeşili D ₆	337.2	Wide	322.1	Wide	100	160	35

4. SONUÇLAR

Validasyon, bir cihazın, ekipmanın, metodun veya ölçüm sisteminin hedeflenen amaca uygunluğunu ortaya koyan performans kriterlerinin objektif olarak test edilmesi ve yazılı kayıtlarla istatistiksel olarak kanıtlanmasıdır. Bir metodun karakteristik performansını belirleyen kriterler (doğruluk, kesinlik, tayin ve ölçüm limiti, doğrusalık, doğrusal aralık, gerçeklik, geri kazanım, spesifiklik, seçicilik, duyarlılık)'dir. Validasyon çalışması 2002 tarihli 657 sayılı Avrupa Birliği direktiflerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2002). Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kullanımı yasaklanmış maddeler arasında yer alması nedeniyle maksimum kalıntı limitleri bulunmamaktadır. Avrupa Birliği malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespitinde kullanılan test metotları için minimum gerekli performans limiti (MRPL) 2 µg/kg olarak belirlenmiştir (Anonim, 2004).

4.1 Seçicilik ve Spesifiklik

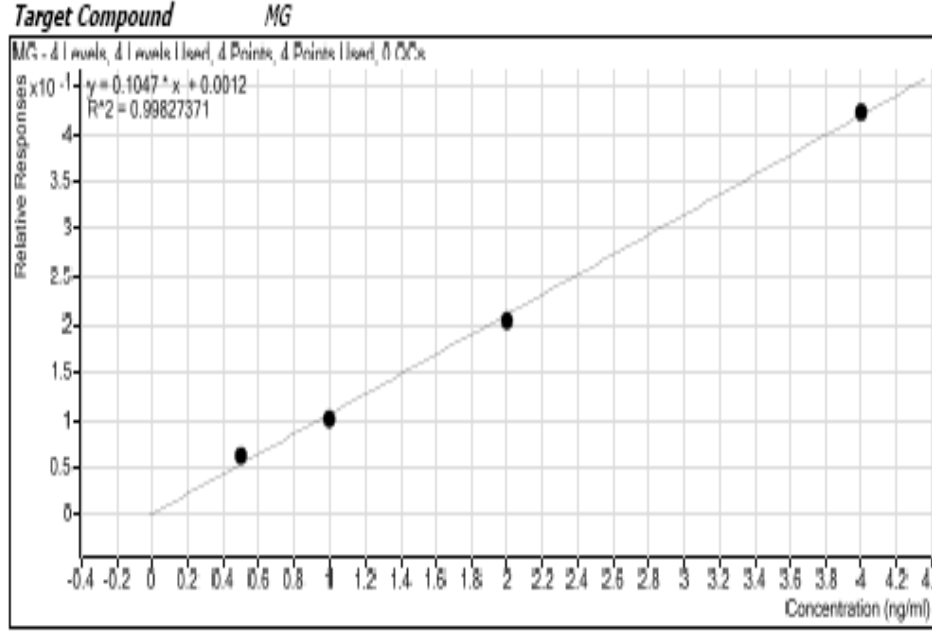
LC-MS/MS tekniğinin yüksek hassasiyette seçicilik ve spesifiklik özelliği µg/kg ve ng/kg kalıntı düzeylerinin çalışılmasında büyük avantaj sağlamaktadır. Seçicilik ve spesifiklik parametreleri malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili içermeyen avcılık yoluyla elde edilen 20 farklı balık numunesi ve malaşit yeşili, lökomalaşit yeşili standart ve internal standart ile yüklenen numunelerin LC-MS/MS ile analizinden elde edilen kromatogramlar incelendi, kristal violenin malaşit yeşiline yapısal olarak benzer özellikler göstermesi ve referans alınan analiz metodunda da malaşit yeşili için kristal violenin internal standart olarak kullanılmış olması nedeniyle, malaşit yeşili için kristal violenin internal standart olarak kullanılabileceği görüldü. Malaşit yeşili, lökomalaşit yeşili ve internal standartların çıkış sürelerinde ve yükleme yapılmayan boş numunelerde analizi engelleyecek girişim yapan pikler tespit edilmedi (Şekil 4.1).



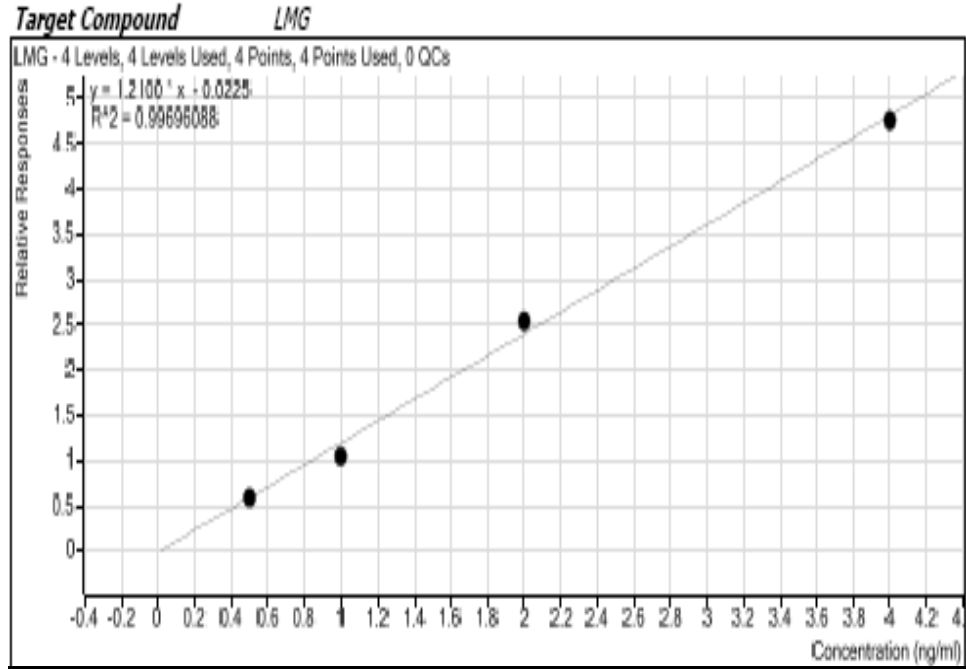
Şekil 4.1: Blank numunenin analizi sonucunda elde edilen kromatogram.

4.2 Doğrusal Aralık

Metodun koşullarında belirlenecek olan kesinlik, doğruluk ve doğrusallık kriterlerinin test edildiği, malaşıit yeşili ve lökomaşıit yeşili için beş kalibrasyon noktası (0, 0.5, 1, 2, 4 ppb) konsantrasyonunda yapılan numune yüklemeleri ile bu numunelerin analizi sonucunda elde edildi. Malaşıit yeşili ve lökomaşıit yeşili için hazırlanan kalibrasyon eğrilerinin regresyon katsayıları (R^2) 0.990'dan büyüktür (Şekil 4.2 ve 4.3).



Şekil 4.2: Malaşit yeşiline ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.3: Lökomaşit yeşiline ait kalibrasyon eğrisi

4.3 Doğruluk

Laboratuvar içi validasyonda malaşit yeşili ve lökomaşit yeşili için geri kazanım çalışması iki kişi tarafından farklı günlerde üç farklı konsantrasyonda (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) konsantrasyonunda yapılan 6 tekrarlı yüklemelerin

analizi sonucunda elde edildi (Çizelge 4.1). Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili için 2 µg/kg konsantrasyonunda yüklenmiş numunenin analizinden elde edilen örnek kromatogram için şekil 4.4 de gösterildi.

Çizelge 4.1: Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili için geri kazanım değerleri

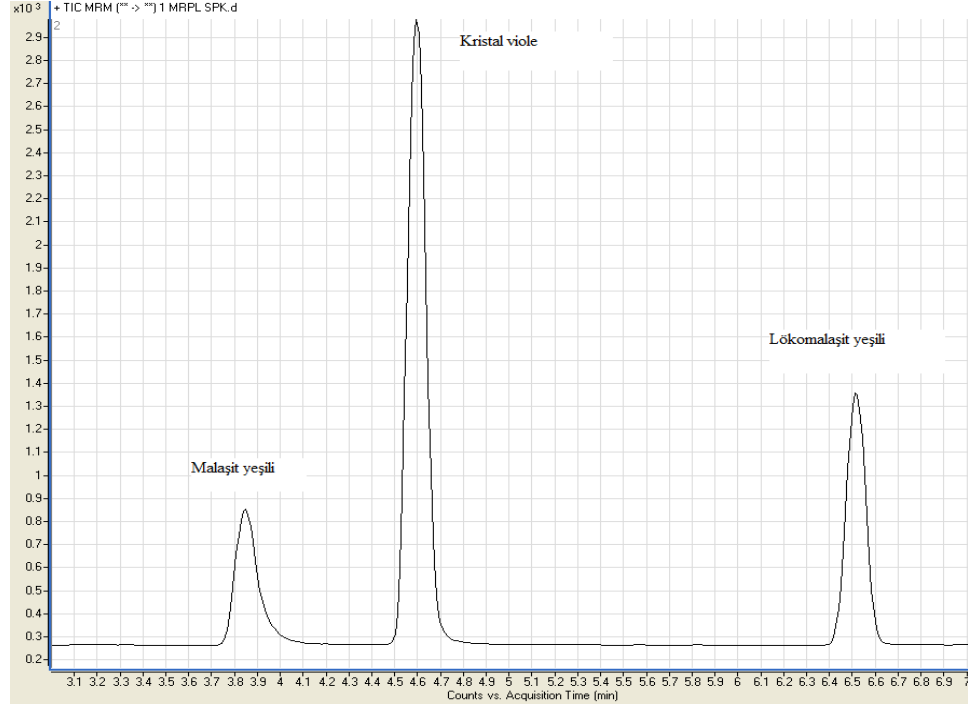
Konsantrasyon (µg/kg)	Malaşit Yeşili Geri Kazanım (%)	Lökomalaşit Yeşili Geri kazanım (%)
1	99.4	100.4
2	100	108.4
3	104.3	108.4

4.4 Kesinlik

Belirli analiz koşulları altında tutulan aynı ya da benzer objelerin tekerrür ölçüm değerlerinin birbirine yakınlığının ifadesidir. Homojen bir test örneğinin, metotta tanımlanan durumlar altında tekrarlanan testlerinden elde edilen ölçüm sonuçları arasındaki dağılımın derecesini ifade eder. Bir metodun kesinliği; tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik değerleri ile ifade edilir.

4.4.1 Tekrarlanabilirlik

Bu tez kapsamında gün içi tekrarlanabilirliğin hesaplanması için aynı gün içerisinde aynı kişi tarafından üç farklı konsantrasyonda (1,2,3 µg/kg) malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili yüklenmiş numuneler 6'şar tekrarlı çalışıldı ve relatif standart sapmaları (RSD) hesaplandı (Çizelge 4.2). Elde edilen değerler kabul sınırları içerisinde bulunmuştur. Günler arası tekrarlanabilirliğin hesaplanması için aynı kişi tarafından ayrı iki günde üç farklı konsantrasyonda (1,2,3 µg/kg) malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili yüklenmiş numuneler 6'şar tekrarlı çalışıldı ve relatif standart sapmaları hesaplandı (Çizelge 4.3). Elde edilen değerler 2002/657 sayılı Avrupa Birliği kararlarına göre kabul sınırları içerisinde bulundu.



Şekil 4.4: 2 µg/kg konsantrasyonunda yüklenmiş numunenin kromatogramı

Çizelge 4.2: Malaşit yeşili ve lökomaşit yeşili için gün içi tekrarlanabilirlik değerleri

	1 µg/kg Yükleme		2 µg/kg Yükleme		3 µg/kg Yükleme	
	Malaşit Yeşili	Lökomaşit Yeşili	Malaşit Yeşili	Lökomaşit Yeşili	Malaşit Yeşili	Lökomaşit Yeşili
Ortalama (µg/kg)	1.015	0.861	1.979	2.224	3.120	3.382
Standart Sapma	0.087	0.035	0.144	0.247	0.214	0.541
RSD (%)	8.592	4.045	7.252	11.89	6.292	16.004

Çizelge 4.3: Malaşit yeşili ve lökomaşit yeşili için günler arası tekrarlanabilirlik değerleri

	1 µg/kg Yükleme		2 µg/kg Yükleme		3 µg/kg Yükleme	
	Malaşit Yeşili	Lökomaşit Yeşili	Malaşit Yeşili	Lökomaşit Yeşili	Malaşit Yeşili	Lökomaşit Yeşili
Ortalama RSD (%)	7.258	4.746	5.976	13.585	7.938	12.290

4.4.2 Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirliğin tespiti için iki farklı kişi tarafından iki farklı günde üç farklı konsantrasyonda yükleme yapılmış (1, 2, 3 µg/kg) malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili yüklenmiş numuneler 6'şar tekrarlı çalışıldı ve relatif standart sapmaları hesaplandı (Çizelge 4.4). Elde edilen değerler 2002/657 sayılı Avrupa Birliği kararlarına göre kabul sınırları içerisinde bulundu.

Çizelge 4.4: Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili için gün içi tekrarlanabilirlik değerleri

	1 µg/kg Yükleme		2 µg/kg Yükleme		3 µg/kg Yükleme	
	Malaşit Yeşili	Lökomalaşit Yeşili	Malaşit Yeşili	Lökomalaşit Yeşili	Malaşit Yeşili	Lökomalaşit Yeşili
Ortalama RSD (%)	6.149	7.684	7.151	11.800	7.172	11.253

4.5 Tayin Limiti (LOD-Limit of Detection)

Bir örnekte herhangi bir analiz edilecek maddenin, temel seviye üzerinde, belirlenebildiği en düşük konsantrasyondur. Bir ölçüm sistemi ile ölçülebilen (kör örnekten istatistiksel olarak farklılık gösteren) fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük konsantrasyonu ifade eder. Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili için tayin limiti 20 adet 2 µg/kg konsantrasyonunda yükleme yapılmış numuneler analiz edildi ve ölçüm sonuçlarının standart sapmalarının 3 katı alındı. Malaşit yeşili için tespit limiti 0.21 µg/kg, lökomalaşit yeşili için 0,10 µg/kg olarak hesaplanmıştır.

4.6 Ölçüm Limiti (LOQ- Limit of Quantification)

Ölçüm limiti kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlikte ölçülebilen en düşük konsantrasyonu ifade etmektedir. Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili için ölçüm limiti 20 adet 2 µg/kg konsantrasyonunda yükleme yapılmış numuneler analiz edildi ve ölçüm sonuçlarının standart sapmalarının 6 katı alındı. Malaşit

yeşili için ölçüm limiti 0.43 µg/kg, lökomalaşit yeşili için 0,21 µg/kg olarak hesaplandı.

4.7 Tespit Kapasitesi (CC_β)

Tespit kapasitesi (CC_β) β=%5 hata oranıyla bir numunede bulunan analitin tespit edilebilecek, tanımlanabilecek ve miktarının ölçülebileceği en düşük konsantrasyonu belirten değerdir. CC_β değeri farklı günlerde (n=7) boş numuneler farklı 4 konsantrasyonda (1, 2, 4, 8 µg/kg) yapılan yüklemeler sonucunda konsantrasyonlara karşılık gelen değerlerin ortalamaları, kalibrasyon kurvesinin eğim ve kesme noktaları kullanılarak hesaplandı. CC_β malaşit yeşili için 0.122 µg/kg, lökomalaşit yeşili için 0.182 µg/kg olarak hesaplandı.

4.8 Stabilite

0.5, 1,2, 4 µg/kg konsantrasyonunda malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili ile yüklenmiş numuneler, -20°C'de karanlık ortamda saklanmış farklı sürelerde analiz edilmiş ve analitlerin uğradığı kayıplar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5: Malaşit yeşili ve löko malaşit yeşilinin numunede stabilitesi

Süre (saat)	0,5 µg/kg		1 µg/kg		2 µg/kg		4 µg/kg	
	Malaşit yeşili (%)	Löko malaşit yeşili(%)	Malaşit yeşili (%)	Löko malaşit yeşili(%)	Malaşit yeşili (%)	Löko malaşit yeşili(%)	Malaşit yeşili (%)	Löko malaşit yeşili(%)
2	2,57	-0,12	0,72	1,68	0,74	-0,83	1,33	-2,07
5	0,23	-2,02	0,89	2,44	1,93	1,56	2,15	0,32
20	-3,58	5,24	-2,90	6,50	-1,69	6,97	-2,31	6,39
94	4,36	4,23	0,83	6,59	2,83	5,14	2,96	3,92

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada balık etinde malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının LC-MS/MS ile tespiti için yapılan validasyon çalışması sonucunda malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili için tespit limiti sırasıyla 0,21 µg/kg, 0,10 µg/kg ve ölçüm limiti sırasıyla 0,43 µg/kg, 0,21 µg/kg olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerleri 2 µg/kg konsantrasyonunda yapılan yüklemeler için malaşit yeşilinde %100, lökomalaşit yeşilinde %108'dir. Geri kazanım değerlerinin yüksek bulunması internal standart kullanıma bağlı olarak ekstraksiyon sürecindeki kayıpların internal standartlarda meydana gelen kayıplarla orantılı olarak düzeltilmesi sonucunda elde edilmiştir. Hall *et al.* (2008) Su ürünlerinde malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının LC-MS/MS ile tespitine yönelik yaptığı çalışmada malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili için tespit limitini 1 µg/kg olarak bulmuştur. Wendy *et al.* (2006) tarafından yapılan bir çalışmada ise malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili için tespit limit 1 µg/kg olarak tespit etmiştir. Arroyo *et al.* (2008) ise malaşit yeşili için 0,51 µg/kg ve lökomalaşit yeşili için 0,50 µg/kg tespit limiti elde etmiştir. Lee *et al.* (2006) tarafından yapılan çalışmada malaşit yeşili için 0,13 µg/kg ve lökomalaşit yeşili için 0,06 µg/kg tespit limiti elde etmiştir.

Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin su ürünlerinde tespitinde numune genellikle asidik bir tampon çözeltisi veya tampon-organik çözücü birleşimi ile katı-sıvı ekstraksiyonu ile katı faz ekstraksiyonu yapılarak gerçekleştirilmektedir. Rushing *et al.* (1997) yaptığı çalışmada ekstraksiyonda amonyum asetat, asetonitril kullanmıştır. Geri kazanım oranlarını artırmak amacıyla ekstraksiyon aşamalarını iki kez tekrar etmesine rağmen malaşit yeşili için 10 µg/kg tespit limitine ulaşabilmiştir. Malaşit yeşilinin kas dokuya kuvvetli bağlarla bağlanması sebebiyle, ekstraksiyon çözücünün asidifikasyonu ekstraksiyon için gereklidir. Long *et al.* (2008) yaptığı çalışmada ekstraksiyonda Mc Ilvaine tampon tampon, p-TSA ve TMPD kullanarak malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili için 0.21 µg/kg tespit limiti elde etmiştir. Bergwerff *et al.* (2003) malaşit yeşili kalıntısının tespitinde ekstraksiyonda ultratoraks veya parçalayıcı kullanılması sonucunda ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyondan elde edilen geri kazanım daha yüksek geri kazanım elde ettiğini bildirmiştir. Numunelerin saflaştırma ve

temizleme aşamaları sırasında, sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon kullanılmaktadır. Ekstraksiyon prosedürüne alümina ilavesi ile malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili tespitinde geri kazanım ve hassasiyet artmaktadır (Long *et al.*, 2008). Numunenin analize hazırlanması sırasında malaşit yeşilinin lökomalaşit yeşiline dönüşmesi devam etmektedir. Bu duruma muhtemelen balık dokusundaki enzimatik aktivite neden olmaktadır. Bu sorun numuneye hidroksilamin hidroklorit ilave edilerek giderilmektedir (Halme *et al.* 2004). HPLC ile yapılacak analizlerin ekstraksiyon metotları genellikle yüksek miktarlardaki numunelerin çeşitli ekstraksiyon teknikleri ile minimum hacimde toplanarak konsantre edilmesini amaçlamaktadır. Bu nedenle yüksek hacimlerde çözücü ve çözelti kullanılmaktadır bu ise yüksek analiz maliyetlerine neden olmaktadır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında ekstraksiyon esnasında kullanılan çözücü ve kimyasal miktarı, diğer ekstraksiyon prosedürleri ile kıyaslandığında daha az olduğu ve çözücü tasarrufu sağlandığı görülmüştür. Böylece ortaya çıkan organik çözücü ve kimyasal atıklar azaltılarak çevreye verilen zarar minimize edilmiş olmaktadır.

Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespiti için numune hazırlama aşamalarında tercih edilen katı faz ekstraksiyon kolonları çeşitlilik göstermektedir. Kuvvetli katyon değiştirici, C18, alümina gibi analit ile sorbent arasında iyon değiştirebilen ve hidrofobik katı faz ekstraksiyon kolonları kullanılmaktadır. Polarite ve iki bileşiğin kolonlardan çıkış sürelerinin farklılığından ötürü katı faz ekstraksiyon kolonlarıyla yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen geri kazanım değerleri düşük kalmaktadır (Long *et al.*,2008). Bununla birlikte katı faz ekstraksiyonlarının maliyetleri gözönüne alındığında analizin ekonomikliği ortadan kalkmaktadır. HPLC ile yapılacak analizlerde tespit edilecek bileşiğin saflaştırılması ve konsantre edilmesi önem taşıdığından katı faz ekstraksiyon kolonlarının ekstraksiyon aşamasında kullanımı gerekmektedir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında LC-MS/MS cihazının tespit limitinin HPLC sistemlere göre daha düşük olması ve gürültü pikleri olarak isimlendirilen ve analitin tespitini engelleyecek unsurların azaltılması ile katı faz ekstraksiyon kolonlarının malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntılarının tespitinde kullanımına gerek duyulmamıştır. Katı faz ekstraksiyon kolonlarına ihtiyaç duyulmaması analiz maliyetini düşürerek ekonomik katkı sağlamaktadır.

Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin HPLC ile tespitinde genellikle UV ve diyod array dedektörler (DAD) kullanılmaktadır (Wendy *et al*, 2005, Halme *et al*, 2004, Long *et al*, 2008, Bergwerff *et al*, 2003). Lökomalaşit yeşilinin bu dedektörlerde tespit edilebilmesi için oksidasyon reaktifi ile malaşit yeşiline dönüştürülmesi gerekmektedir. Mitrowska *et al*.(2005) yaptıkları bir çalışmada lökomalaşit yeşilinin okside edilmeden tespit edilebilmesi için DAD dedektör ve flouresans dedektörü (FLD) birlikte kullanmıştır. Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin tespitinde ilk olarak kullanılan metotlar HPLC ve kolon sonrası ünitesi ile lökomalaşit yeşilinin oksidasyonu ve UV dedektör ile ölçümüne dayanmaktadır. Kolon sonrası oksidasyon ünitelerinin boyutları 10x2 mm den 32x4 mm'ye kadar değişmekle birlikte oksidasyon için sadece PbO₂ kullanıldığı gibi PbO₂ ile selit karışımı da kullanılmaktadır (Rushing *et al*.,1997).

Kolon sonrası oksidasyon ünitelerinde oksidasyon reaktifi olarak PbO₂ ve selit kullanımı bazı sorunlara neden olmaktadır. Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşiline ait diğer oksidasyon bileşikleri ortaya çıkmakta ve kromatogram üzerinde istenmeyen pikler oluşmaktadır. PbO₂ ile doldurulmuş kolonun kullanım ömrü uzun olmayıp, rutin analizler için kullanışsızdır. Dedektör hücreleri kolaylıkla PbO₂ kalıntıları nedeniyle kirlenmekte ve dedektör hassasiyetini kaybetmektedir. Ayrıca kurşunun laboratuvar içinde kontaminasyona yol açarak özellikle aynı ortamda çalışılan ağır metal analizlerinde sorun oluşturmaktadır (Mitrowska *et al*.,2005). Oksidasyon amacı ile PbO₂ yerine iyodin alternatif oksidant olarak kullanılabilir. Long ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada oksidasyon amacı ile 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokuinon (DDQ) alternatif bir oksidant olarak kullanılmıştır. Bergwerff *et al*.(2003) tarafından yapılan çalışmada malaşit yeşili kalıntısının tespitinde demetilasyon sonucu malaşit yeşilinin lökomalaşit yeşiline dönüşmesi sonucunda malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili piklerinin görüldüğü alanda piklerin tespit edilmesine engel olan gürültü pikleri görülmüştür. Demetilasyona engel olmak amacıyla ekstraksiyon sürecinde numuneye TMPD(*N,N,N',N'*-tetrametil-fenilendiamin dihidroklorit) ve askorbik asit ilave edilmiş ve gürültü piklerinin azalması sağlanmıştır. Bununla birlikte Scherpenisse *et al*. (2005) malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin tespitinde kütle spektrometrisi ile yaptıkları çalışmada Elektro Sprey İyonizasyon (ESI) iyonizasyon tekniği ile içerisinde PbO₂ bulunan kolon sonrası oksidasyon

reaktörünü bir arada kullanmış ve çok tekrarlı çalışmalarda herhangi bir sorunla karşılaşmadıklarını bildirmişlerdir.

Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilin HPLC ile tespitinde kromatografik ayırım için farklı kolonlar kullanılmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki organik çözücülerle birlikte kullanılan zıt faz kolonlar, malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kromatografik ayırımı ve tespitini kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte yüksek konsantrasyondaki organik çözücülerin oksidasyonu engelleyici bir etkisi bulunmaktadır. Malaşit yeşilin pK_a değeri 6.9 olup kendisi ve tuzları pH 4'de tamamen iyonize olmaktadır. Düşük pH değerine sahip mobil fazlar malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilin mobil faz içerisinde çözünürlüğü açısından daha elverişlidir. Amonyum asetat tampon solüsyonu malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilin tespitinde en fazla kullanılan mobil fazlardan birisidir (Long *et al.*, 2008). Bu yüksek lisans tez çalışmasında mobil faz amonyum asetat tampon tampon ve asetonitril kullanılmıştır.

Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespitinde HPLC sistemlerinin kullanılması kolon sonrası oksidasyon zorunlu kılmaktadır. Bunun yanı sıra HPLC sistemlerinin malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilin tespitinde yasal düzenlemelere göre minimum gerekli performans limit olan 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tespit limitinde ölçüm yapmak zorunda olması özellikle ekstraksiyon aşamalarının zaman alıcı ve karmaşık hale getirmektedir. Bu nedenlerle hayvansal ve bitkisel gıdalarda ilaç kalıntılarının tespitinde likit kromatografik tandem kütle spektromesi (LC-MS/MS) ile yapılan analizler yaygınlaşmaktadır. LC-MS/MS sistemleri özellikle malaşit ve lökomalaşit yeşili gibi gıdalarda bulunmasına müsaade edilmeyen maddelerin tespitinde HPLC sistemlerine kıyasla avantaj sağlamaktadırlar. LC-MS/MS sistemleri ile ng/kg tespit düzeyinde analizler gerçekleştirilebilmektedir. HPLC sistemlerinde ise ng/kg düzeyinde tespit limitlerinde analiz yapılması son derece zor olup ekstraksiyon aşamasında numunenin konsantre edilmesi ile bir dereceye kadar mümkün olabilmektedir. Konsantrasyon işlemi ile ekstraksiyon esnasında matriksden gelen ve uzaklaştırılmayan maddeler analiz esnasında özellikle dedektör ve HPLC sistemin kapiller hattı üzerinde kirliliğe neden olmaktadır. LC-MS/MS sistemlerinde ise numunenin konsantre edilmesine gerek duyulmamaktadır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında LC-MS/MS kullanılması sonucunda numune

ekstraksiyon esnasında konsantre edilmeyip dedektör hassasiyeti göz önüne alınarak numunenin seyreltilerek sistemde analizi gerçekleştirilmiştir. Günümüzde Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının likit kromatografi/kütle spektromesi ile tespitinde Elektro Sprey İyonizasyon (ESI) en fazla kullanılan iyonizasyon tekniklerinden birisidir (Hall *et al.*, 2008, Ding *et al.*, 2008, Arroyo *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2006,). Malaşit yeşili iyonik karakterinden ötürü kütle spektrometrisinde tespit edilmesi oldukça kolaydır. Lökomalaşit yeşiline kıyasla malaşit yeşilinin daha kolay iyonize olması, malaşit yeşilinin tespitinde Elektro Sprey İyonizasyon (ESI) tekniğinin kullanılmasına imkân sağlar. Bununla birlikte malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin Likit kromatografi Tandem Kütle Spektrometrisi ile tespitinde Atmosferik Basınç Foto İyonizasyon (APPI) tekniği de kullanılmaktadır (Valle *et al.*,2005, Wendy *et al.*, 2006, Scherpenisse *et al.*,2005). Scherpenisse *et al.*(2005) yaptıkları çalışmada Atmosferik Basınç Foto İyonizasyon (APPI) tekniğinin lökomalaşit yeşilinin tespit edilmesinde Elektro Sprey İyonizasyon (ESI) tekniğine göre daha uygun olduğu tespit etmişlerdir. Scherpenisse *et al.* (2005) yaptıkları çalışmada malaşit yeşili kalıntısının tespitinde APPI iyonizasyon tekniğinin ESI iyonizasyon tekniğine göre iki kat daha hassas olduğunu tespit etmişlerdir. Malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntılarının tespitinde izotop dilüsyon kütle spektrometrisi (IDMS) kullanılmasında tespit edilecek bileşiğin ve internal standardın ekstraksiyon esnasında kaybını önlemek için birçok basamaktan oluşan ekstraksiyon teknikleri kullanılmak durumundadır. Bu amaçla malaşit yeşili kalıntısının tespitinde sokslet ekstraksiyon, hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu gibi teknikler kullanılmıştır (Hall *et al.*,2008)

Hall *et al.* (2008) yaptıkları çalışmada malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşilinin IDMS ile tespitinde kromatografik ayrımında yüksek akış hızı ve yavaş artan kolon sıcaklığı gibi değişiklikler yaparak düzgün ve keskin pikler elde edilmiştir. 2 µg/kg konsantrasyonunda hazırlanan yüklü numunelerde malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili için sinyal/gürültü oranı 800'den büyük, 7 µg/kg konsantrasyonunda hazırlanan yüklü numuneler için ise 2000'den büyük tespit edilmiştir. İnternal standart tespit etmek istediğimiz analit ile benzer fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan referans maddelerdir. Günümüzde kütle spektrometrisi ile yapılan analizlerde internal standart kullanımı analizin

validasyonu sürecinde geri kazanım, tekrarlanabilirlik gibi pek çok validasyonu kriterinin kabul edilebilir limitler arasında kalmasını sağlamaktadır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında da malaşit yeşili için internal standart olarak kullandığımız kristal viole analiz sürecinde malaşit yeşiline benzer bir yapı göstermektedir. Lökomalaşit yeşili D₆ ise kütlesi dışında tamamıyla lökomalaşit yeşiliyle aynı özellikleri taşımaktadır. Bu nedenle analiz esnasında lökomalaşit yeşilinin miktarındaki değişimlerin aynısına Lökomalaşit yeşili D₆ uğramaktadır. Bu çalışmada internal standart olarak kristal viole ve döteryum ile işaretlenmiş lökomalaşit yeşili D₆ kullanılmıştır. 2 µg/kg konsantrasyonunda hazırlanan yüklü numunelerde malaşit yeşili için sinyal/gürültü oranı 900'den büyük ve lökomalaşit yeşili için 1500'den büyük olduğu tespit edilmiştir. Sanders *et al.*, (2005) yaptıkları çalışmada internal standart olarak kristal viole ve lökomalaşit yeşili D₆ kullanmışlardır.

Validasyon çalışması 2002 tarihli 657 sayılı Avrupa Birliği direktiflerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Avrupa Birliği'nin 2004 tarih ve 25 sayılı komisyon kararı uyarınca malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespitinde kullanılan test metotları için minimum gerekli performans limiti (MRPL) 2 µg/kg olarak belirlenmiştir. Ancak bu durum ABD, Avrupa Birliği ve aday ülkelerde geçerli olup diğer ülkelerde farklı uygulamalar görülebilmektedir. Örneğin; Japonya Gıda Güvenliği Komisyonu malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespitinde kullanılacak analiz metotları için gerekli minimum performans limitini 5 µg/kg olarak belirlemiştir. Bu durumda Japonya' da yapılan analizde malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili yönünden negative bulunan bir numune Avrupa Birliği ve aday ülke laboratuvarları tarafından malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısı yönünden pozitif bulunabilir. Bu durum ülkeler arasındaki ihracatı ve laboratuvarlar arasındaki uyumu olumsuz yönde etkilemektedir.

LC-MS/MS cihazı ile Avrupa Birliği referans laboratuvarı AFSSA tarafından kullanılan analiz metoduna uygun yapılan bu yüksek lisans tez çalışmasından elde edilen tespit limitleri Avrupa Birliği limitlerine uygun olduğu ve bu yöntemin ülkemiz şartlarında balık etlerinde malaşit yeşili ve lökomalaşit yeşili kalıntısının tespitinde konfirmasyon yöntemi olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. FAPAS tarafından düzenlenen balık etinde malaşit yeşili ve

lökomaşıit yeşili kalıntısının miktarsal tespitine yönelik yeterlilik testine girilmiş ve başarılı sonuç alınmıştır.

Bu araştırma sonuçlarına göre malaşıit yeşili ve lökomaşıit yeşili analizinde örnek hazırlamasından sonuçların hesaplanmasına kadar geçen süre 45 dakika olarak belirlenmiş olup bu sürenin tarama testlerinde kullanılan ELISA yönteminden daha kısa olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında uygulanan ve validasyonu gerçekleştirilen metod ile tarama testlerine gerek duyulmadan sahadan gelecek örneklerin analiz edilebileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alderman J.D.**, 1985, Malachite green: a review, *Journal of Fish Diseases*, 8,189-298
- Anonim**, 1990, Council Regulation (EEC) No 2377/90, Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.
- Anonim**, 2002, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Comm.* 2002, L221, 8-36.
- Anonim**, 2004, Commission Decision 2004/25/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin, (2004) *Off. J. Euro. Union*, L6,38-39.
- Anonim**, 2005, Food Safety Commission of Japan, Veterinary Drugs Evaluation Report: Health Risk Assessment of Malachite Green and Leucomalachite Green.
- Anon**, 2006, 2006 tarih 05 sayılı Su Ürünleri, Kanatlı Hayvan ve Etleri, Bal ve Çiğ Sütte Kalıntı İzleme Genelgesi
- Anon**, 2007a, Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliği (TEBLİĞNO: 2007/17)
- Anon**, 2007b, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ruhsatsız İlaç Kullanımı ve Yasak Maddeler Tebliği, 2007-18 sayılı
- Arroyo D., M. Cruz Ortiz, Luis A. Sarabia, Francisco Palacios**, 2008, Advantages of PARAFAC calibration in the determination of malachite green and its metabolite in fish by liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1187 1–10
- Bergwerff Aldert A., Peter Scherpenisse**, 2003, Determination of residues of malachite green in aquatic animals, *Journal of Chromatography B*, 788, 351–359

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Clemmensen, S., Jensen, J.C., Jensen, N.J., Meyer, O., Olsen, P. & Würtzen, G.**, 1984, Toxicological studies on malachite green: A triphenylmethane dye. *Arch. Toxicol.*, 56,43–45.
- Culp, S.J., Blankenship, L.R., Kusewitt, D.F., Doerge, D.R., Mulligan, L.T. & Beland, F.A.** 1999, Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during shortterm feeding to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *Chem. Biol. Interact.*, 122, 153–170.
- Culp, S.J., Beland, F.A., Heflich, R.H., Benson, R.H., Blankenship, L.R., Webb, P.J., Mellick, P.W., Trotter, R.W., Shelton, S.D., Greenlees, K.J. & Manjanatha, M.G.**, 2002, Mutagenicity and carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed leucomalachite green. *Mutat. Res.*, 506–507, 55–63.
- Culp, S.J., Mellick, P.W., Trotter, R.W., Greenlees, K.J., Kodell, R.L. & Beland, F.A.**, 2006, Carcinogenicity of malachite green chloride and leucomalachite green in B6C3F1 mice and F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 44, 1204–1212.
- Ding T., Jingzhong Xu, Bin Wu, Huilan Chen, Chongyu Shen, Fei Liu, Kefei Wang**, 2008, LC-MS-MS Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green in Fish Products. *Current Trends In Mass Spectrometry*, 23,232-235.
- Fessard V., Godard T., Huet S., Maurot A., Paul J. M.**, 1998, Mutagenicity of malachite and leucomalachite green invitro tests. *Journal of Applied Toxicology*, 19, 421-430.
- Hall Z., Chris Hopley, Gavin O'Connor**, 2008, High accuracy determination of malachite green and leucomalachite green in salmon tissue by exact matching isotope dilution mass spectrometry *Journal of Chromatography B*, 874,95–100.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Halme K., E. Lindfors and K. Peltonen**, 2004, Determination of malachite green residues in rainbow trout muscle with liquid Chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 21, No.7 641 648
- Henderson, A.L., Schmitt, T.C., Heinze, T.M. & Cerniglia, C.E.**, 1997, Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63,4099–4101.
- Lee Kim C., Jian-Lin Wu, Zongwei Cai**, 2006, Determination of malachite green and leucomalachite green in edible goldfish muscle by liquid chromatography–ion rap mass spectrometry *Journal of Chromatography B*, 843, 247-251.
- Long C., Zhibin Mai, Yingfen Yang, Binghui Zhu, Xiumin Xu, Lin Lu, Xiaoyong Zou**, 2008, New oxidant used for the post-column derivatizationdetermination of Malachite Green and Leucomalachite Green residues in cultured aquatic products by high-performance liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1203, 21–26
- Manjanatha, M.G., Shelton, S.D., Bishop, M., Shaddock, J.G., Dorbrovolsky, V.N., Heflich, R.H., Webb, P.J., Blankenship, L.R., Beland, F.A., Greenlees, K.J. & Culp, S.J.**, 2004, Analysis of mutations of bone marrow micronuclei in Big Blue® rats fed leucomalachite green. *Mutat. Res.*, 547, 5–18.
- Meyer, F.P. ve Jorgenson T.A.**, 1983, Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112, 818–824.
- Meyer V.R.**, 2004. *Practical High-Performance Liquid Chromatography* FOURTH EDITION Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research (EMPA), St. Gallen, Switzerland

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Meinelt T., Pietrock M., Wienke A., Volker F.**, 2003, Humic substance and water content change the toxicity of malachite green. *Journal of Applied Ichthyology*, 19, 380-382.
- Mitrowska K., Andrzej Posyniak, Jan Zmudzki**, 2005, Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1089, 187–192.
- Mittelstaedt, R.A., Mei, N., Webb, P.J., Shaddock, J.G., Dobrovolsky, V.N., McGarrity, L.J., Morris, S.M., Chen, T., Beland, F.A., Greenlees, K.J. & Heflich, R.H.**, 2004, Genotoxicity of malachite green and leucomalachite green in female Big Blue B6C3F1 mice. *Mutat. Res.*, 561, 127–138.
- NTP**, 2005, Toxicology and carcinogenesis studies of malachite green chloride and leucomalachite green in F344/N rats and B6C3F1 mice. Research Triangle Park, NC, USA, Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute of Environmental Health Sciences, National Toxicology Program, 312 pp. (Technical Report Series 527).
- Oğuzhan Y., Aksoy A.**, 2006, Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyon Metodu. *F.Ü. sağlık Bil. Dergisi*, 20(3), 259-269.
- Roybal, J. E., Pfenning, A. P., Munns, R. K., Holland, D. C., Hurlbut, J. A., and Long, A. R.**, 1995, Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in catfish (*Ictalurus punctatus*) tissue by liquid chromatography with visible detection. *Journal of AOAC International*, 78, 453–457.
- Rushing Larry G., Eugene B. Hansen Jr.** 1997, Confirmation of malachite green, gentian violet and their leuco analogs in catfish and trout tissue by high-performance liquid chromatography utilizing electrochemistry with ultraviolet-visible diode array detection and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 700 223-231.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sanders P., B. Delépine, B. Roudaut**, 3rd AOAC Europe-EurachemSymposium “Legal limitson the road to food safety: establishing sound criteria for compliance decisions”, Brüksel, 3-4 Mart 2005. http://crl.fougeres.afssa.fr/publicdoc/POSTER_AFSSAP%20Sanders-2005.pdf (Son erişim tarihi: Mayıs 2009).
- Scherpenisse P., Aldert A. Bergwerff**, 2005, Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry *Analytica Chimica Acta* 529 173–177.
- Srivastava S., Sinha R., Roy D.**, 2004, Toxicological effects of malachite green (Review). *Aquatic Toxicology*, 66, 319-329.
- Stammati, A., Nebbia, C., Angelis, I.D., Albo, A.G., Carletti, M., Rebecchi, C., Zampaglioni, F.& Dacasto, M.**, 2005, Effects of malachite green (MG) and its major metabolite, leucomalachite green (LMG), in two human cell lines. *Toxicol. In Vitro*, 19, 853–858.
- Sudova E., Machova J., Svoboda Z., Vesely T.**, 2007, Negative effects of malachite gren and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish : a review. *Veterinarni Medicina*, 52,527-539.
- Valle L., Cecilia D’iaz, Antonio L. Zanooco**, 2005, Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry Pablo Richter, *Journal of Chromatography A*, 1067, 101–105.
- WHO**, 2009, Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organization, Cenova-İtalya.
- Wendy C. Andersen,, Roybal G., SHERRI B. Turnipseed**, 2005, Liquid Chromatographic Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green (LMG) Residues in Salmon with in situ LMG Oxidation.*Journal of AOAC International*, vol. 88, no. 5, 1292-1297.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wendy C. Andersen, Sherri B. Turnipseed, and José E. Roybal, 2006,
Quantitative and Confirmatory Analyses of Malachite Green and
Leucomalachite Green Residues in Fish and Shrimp. *J. Agric. Food Chem.*,
54, 4517-4523. <http://www.biotage.com/graphics/9223.jpg> (Son Erişim
tarihi : 10 Mayıs 2009)

5. ÖNERİLER

Kalıntı analizlerinin zor ve pahalı analizler olduğu düşünülecek olursa, günümüz şartlarında küresel pazarda ülkemizde su ürünleri üretimi ve ihracatı yapan firmaların yurtdışındaki firmalarla rekabet edebilmesi açısından bürokratik sürecin daha kolay işler hale getirilmesi önem kazanmıştır. Bu bağlamda ülkemizden ihraç edilecek gıda maddelerinin ihracat işlemlerinin süratli gerçekleştirilebilmesi bu konuda faaliyet gösteren denetim laboratuvarlarının süratli ve güvenilir analizleriyle desteklenmelidir. Gıdalardaki kalıntıların güvenli ve süratli bir şekilde gerçekleştirilmesi bu konuda çalışan laboratuvarları analiz tekniklerini geliştirmeye yönelik çalışmalar yapmaya sevk etmektedir. Bu yüksek lisans tez çalışması ile LC-MS/MS teknolojisinin sağladığı üstün performansı, ülkemize ithal edilen ve ülkemizden ihraç edilen balıklardaki malaşit yeşili kalıntısının tespitinde, elde edilen verilerden yola çıkılarak bir sonraki aşamada ülkemizdeki laboratuvarlarda rutin analiz olarak kullanılmasını arzulamaktayım.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Eskişehir’ de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Eskişehir’de tamamladıktan sonra lise öğrenimine Ankara’da Ankara Laborant Meslek Lisesi’nde devam etti. Yüksek öğrenimini 2002-2007 yılları arasında Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi’nde tamamladı. 1998 yılından itibaren Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’na bağlı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde çalışmakta olup yabancı dili İngilizcedir.