

Atf İçin: Oymak T. (2024). Sütteki Sülfonamidlerin Tayini için Yeni bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Geliştirilmesi ve Valide Edilmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 14(4), 1615-1625.

To Cite: Oymak T. (2024). Development and Validation of a New High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Sulfonamides in Milk. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 14(4), 1615-1625.

Sütteki Sülfonamidlerin Tayini için Yeni bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Geliştirilmesi ve Valide Edilmesi

Tülay OYMAK

Öne Çıkanlar:

- Kromatografik analiz
- Sülfonamidlerin eş zamanlı tayini
- Farmasötik kirlilik

Anahtar Kelimeler:

- Sülfonamidler
- HPLC
- Yöntem validasyonu

ÖZET:

Bu çalışmada sülfonamidler (SAs) grubunda bulunan sülfadiazin (SDZ), sülfamerazin (SMR) ve sülfometaksazol'un (SMX) süt numunelerinde analizi için hızlı, hassas ve basit bir yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. SDZ, SMR ve SMX'in süttten ekstraksiyonunda protein çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Protein çöktürme yönteminde çöktürücü reaktif türü ve miktarı optimize edilmiştir. Çalışma matris etkisinin analizlere olan etkisinin gözlemlenmesi amacıyla tüm validasyon parametreleri süt numuneleri kullanılarak çalışılmıştır. Yöntemin validasyonunda ICH klavuzu uyarınca doğruluk, sağlamlık, doğruluk ve kesinlik testleri gerçekleştirilmiştir. Süt numunelerinde sülfonamidlerin tayini için geliştirilen yöntemin gözlenebilirlik sınırları (LOD) SDZ, SMR ve SMX için sırasıyla 0.11, 0.10 ve 0.14 µg/mL ve tayin sınırları (LOQ) 0.34, 0.30 ve 0.43 µg/mL'dir. SAs'lerin sütteki ortalama geri kazanımları $\geq 93.0 \pm 4.4\%$ 'tür. Yöntemin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğini % bağıl standart sapma cinsinden sırasıyla ≤ 6.0 ve ≤ 5.4 'dir. Geliştirilen yöntem doğru ve güvenilir olup gıda kontrol ve toksikolojik analiz laboratuvarlarında süt numunelerinin içeriğindeki SAs'lerin rutin analizi için kullanılabilir.

Development and Validation of a New High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Sulfonamides in Milk

Highlights:

- Chromatographic analysis
- Simultaneous determination of sulfonamides
- Pharmaceutical Contamination

Keywords:

- Sulfonamides
- HPLC
- Method validation

ABSTRACT:

In this study, a rapid, sensitive and simple high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed and validated for the analysis of sulfadiazine (SDZ), sulfamerazine (SMR) and sulfamethoxol (SMX) in milk samples which are in the group of sulfonamides (SAs). Protein precipitation method was used in the extraction of SDZ, SMR and SMX from milk. The precipitant reagent type and its amount were optimized in the protein precipitation method. All validation parameters were studied using milk samples in order to observe the effect of the study matrix effect on the analyses. Validation of the method was carried out with linearity, robustness, accuracy and precision in accordance with the ICH guideline. The limits of detection (LOD) of the method developed for the determination of sulfonamides in milk samples were 0.11, 0.10 and 0.14 µg/mL and the limits of quantification (LOQ) were 0.34, 0.30 and 0.43 µg/mL for SDZ, SMR and SMX, respectively. The average recoveries of SAs in milk are $\geq 93.0 \pm 4.4\%$. The intra-day and inter-day reproducibility of the method in terms of % relative standard deviation are $\leq 6\%$ and $\leq 5.4\%$, respectively. The developed method is accurate and reliable and can be used in routine analysis of SAs in milk samples in food control and toxicological analysis laboratories.

GİRİŞ

Antibiyotikler insan ve hayvan sağlığında bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte antibiyotiklerin aşırı kullanımı sonucu, belediye, tarım, hastane ve ilaç üretim tesislerinden çevre ortamına salınırlar. Bunun insan sağlığı ve sucul ortam üzerinde ciddi olumsuz etkileri olabilir (Mthiyane et al., 2023; Sarakatsanou, Karastogianni, & Girousi, 2023). Günümüzde antibiyotikler, yüzey suları, yeraltı suları, atık sular ve atık su arıtma tesislerinin girişleri ve hayvansal gıdalarda tespit edilmiştir (Watkinson, Murby, & Costanzo, 2007). Ayrıca, çoğu antibiyotik zayıf bir şekilde metabolize edilir ve tüketilen ilaçların önemli bir yüzdesi değişmeden atılır. Sonuç olarak, çeşitli ilaçların sürekli olarak çevreye salınması, ilaca dirençli mikropların ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenle, gıda üretimi ve sağlık hizmetlerinde antibiyotiklerin yaygın kullanımı, bu bileşiklerin çevrede birikmesi konusunda ciddi endişelere yol açmıştır. Antibiyotik kalıntılarının çevre ve gıda örneklerindeki miktarını belirlemek insan ve hayvan sağlığı için hayati önem taşımaktadır (Zhao et al., 2019).

Sülfonamidler (SAs), insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonların tedavisi ve ayrıca büyümenin desteklenmesi için yaygın olarak kullanılan bir grup sentetik geniş spektrumlu antibiyotiktir (Shaaban et al., 2023; Yang, Yang, & Liao, 2004). Sülfonamidlerin özellikle besi hayvanlarında aşırı kullanımı ve çevresel ortamlara deşarjı, bazı türlere karşı mikrobiyal direnç ve olumsuz sağlık risklerine yol açabilir. SAs kalıntıları içeren gıdaların uzun süreli tüketimi, düşük derişim seviyelerinde bile, ilaca direnç gelişimi, aşırı duyarlı bireylerde alerjik reaksiyonlar ve hatta karsinojenite ve mutajenite dahil olmak üzere insan sağlığına doğrudan zarar vermesi kaçınılmazdır (Kechagia & Samanidou, 2017; Shen, Huang, Liu, & Shuai, 2021).

Bunları göz önünde bulundurarak bazı ülkeler, tüketici güvenliği açısından gıda ürünlerindeki sülfonamidler için belirli maksimum kalıntı limitleri belirlemiştir. Örneğin, Belçika ve Birleşik Krallık, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa Birliği, süt ve süt ürünlerinde tüm sülfonamid kalıntılarının maksimum kalıntı seviyesini 100 µg/L olarak belirlemiştir (Avrupa Komisyonu, 2009).

Hayvan dokularında, yumurtalarda, sütte ve balda sülfonamid kalıntılarının tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir. Mevcut yöntemler arasında farklı dedektörlere sahip yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gaz kromatografisi ve kapiler elektroforez (CE) yer almaktadır. (Assassi, Tazerouti, & Canselier, 2005; Ji et al., 2017; Kim, Jeong, Park, Kim, & Kim, 2016; Patyra, Przeniosło-Siwczynska, & Kwiatek, 2019).

Gıda numunesindeki SAs'lerin nispeten düşük derişimi ve karmaşık matris göz önüne alındığında, geleneksel analitik yöntemin sınırlı hassasiyeti nedeniyle doğrudan ölçüm çok zordur. Bu nedenle, gıda numunelerindeki ilaç kalıntılarının doğru analizi için basit, güvenilir, uygun maliyetli ve çevre dostu bir yöntemin geliştirilmesi önemlidir (Feng, Hu, Zhao, & Zeng, 2019; Moga, Vergara-Barberán, Lerma-García, Herrero-Martínez, & Simó-Alfonso, 2020). Numune hazırlama, numune alma veya ölçüm gibi diğer iki adımla karşılaştırıldığında analizin en zorlu adımıdır. Bu kritik adımda analitlerin başarıyla izole edilmesi ve numunenin analiz için uygun bir forma ulaşması gerekir. Doğru sonuçlar elde etmek için numune hazırlama çok önemlidir. Dolayısıyla bu adım özel dikkat gerektirir ve aynı zamanda zaman alıcı bir işlemdir. Literatürde pek çok klasik örnek hazırlama tekniği mevcuttur (Maciel, de Toffoli, Neto, Nazario, & Lanças, 2019).

Bu çalışmada sülfadiazin, sülfamerazin ve sülfametaksazol süt örneklerinde eş zamanlı tayini için hızlı, hassas ve valide edilmiş bir protein çöktürme sonrası yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Çalışma matris etkisinin analizlere olan etkisinin gözlemlenmesi amacıyla validasyon testlerinin tümünde süt numunesi kullanılmıştır. Sülfadiazin, sülfamerazin ve

sülfametaksazol ekstraksiyonunda protein çöktürme yönteminde kullanılan reaktif cinsi ve hacmi optimize edilmiştir. Ayrıca yöntemde kolon sıcaklığı, mobil fazın bileşenlerin oranı, akış hızı ve mobil fazın pH'sının ayırma verimliliği üzerindeki etkisi optimize edilmiştir. Yöntemin validasyon çalışması doğrusallık, tespit ve tayin sınırını, doğruluk, kesinlik, geri kazanım ve sağlamlık çalışmalarını içermektedir.

MATERYAL VE METOT

Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan sülfadiyazin, sülfametaksazol ve sülfamerazin Merck firmasından temin edilmiştir. Hareketli fazın hazırlanmasında kullanılan asetonitril, metanol Sigma-Aldrich, formik asit Merck firmasından sağlanmıştır. Sütteki proteinleri çöktürmede kullanılan perklorik asit Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Deneyler sırasında kullanılan su MP Minipure Dest Up ultra saf su sisteminden sağlanmıştır.

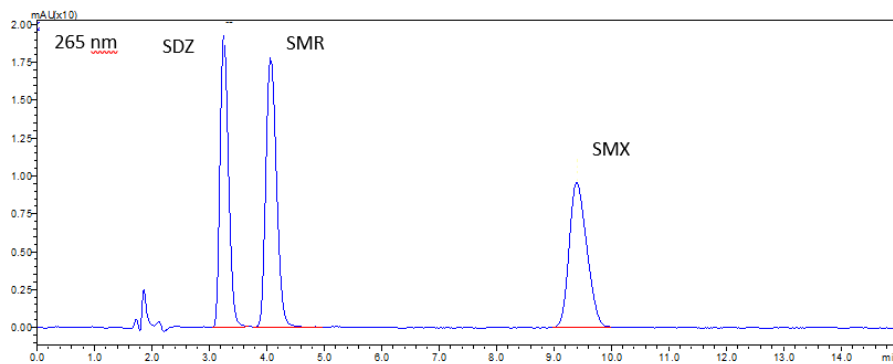
Süt örneklerinin hazırlanması

Süt örnekleri protein çöktürme tekniği ile hazırlanmıştır 2.5 mL süt falkon tüpe ilave edilmiş, üzerine 1.0 mL %10'luk HClO₄ ve 1.5 mL ultra saf su eklenmiştir. Hazırlanan örnekler yarım saat bekledikten sonra 60 dk 5000 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Proteinler tüpün alt tabakasında pelet oluşturarak çökmüştür. Süpernatant alınıp viyallere aktarılmış ve analiz için cihaza verilmiştir.

Kromatografik koşullar

Kromatografik analizler, dörtlü bir pompa (LC 20AD), otomatik örnekleyici (SIL-20AC) ve DAD dedektörü (SPD-M20A), ile donatılmış bir Shimadzu marka yüksek sıvı kromatografi sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Veri toplama ve analiz için LabSolution v1.25 yazılımı kullanılmıştır.

Tüm ayırmalar SilUR/USil marka C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm, ve 150 x 4.6 mm, 5 µm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, %0.1 formik asit çözeltisi ve asetonitril (70:30, v/v) ile hazırlanmıştır. 1.0 mL/dk'lık bir akış hızı ve 30 °C'lik kolon sıcaklığı kullanılmıştır. Dedektörün ölçüm dalga boyu 265 nm enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. SDZ, SMR ve SMX'in alıkonma zamanları sırasıyla 3.27, 4.08, ve 9.38 dakikadır. Örnek kromatogram Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. 10 µg/mL SDZ, SMR ve SMX'e Ait Kromatogram

BULGULAR VE TARTIŞMA

HPLC Sistem Uygunluk Parametreleri

Kapasite faktörü (k')

Analiz edilen maddenin kromatografik kolon üzerindeki kalıcılığını ölçmek için kullanılan bir parametredir. İdeal kapasite faktörü 1 ile 10 arasında olmalıdır (Korashy, Gawad, Hassan, & Abdelkawy, 2022). Kapasite faktör hesabı aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

t_R : Analitin alıkonma zamanı

t_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı

Teorik plaka sayısı (N)

Teorik plaka sayısı yüksek olan kolonlar daha dar ve keskin pikler oluşturmaktadır. Teorik plaka sayısı arttıkça kromatografik kolonun etkinliği artar. Pik genişliğinden yararlanılarak ifade edilmektedir (Chromatography, 2014).

Teorik plaka sayısı hesabı:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2)$$

formülü ile hesaplanır.

Seçicilik faktörü (α)

Seçicilik faktörü iki farklı analit pikinin birbirinden ayrımını ifade eder. Seçicilik değerlerinin daima 1' den büyük olması beklenmektedir (Korashy, Gawad, Hassan, & Abdelkawy, 2022).

Seçicilik faktör hesabı aşağıda verilen formül ile hesaplanır.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (3)$$

k'_1 : birinci pikin kapasite faktörü

k'_2 : ikinci pikin kapasite faktörü

Rezolüsyon (Rs)

Rezolüsyon kromatografik sistemin karışımdaki belirli bileşikleri ayırma gücünü gösterir. R birden fazla veya eşitse bileşenlerin ayrıldığını, birden küçükse, bileşenlerin piklerinin çakıştığını ve ayrılmadığını ifade eder (Ioannis N.Papadoyannis and Victoria F.Samanidou, 2004; Joe P, 1991). Kantitatif analizlerde pikler arasındaki rezolüsyonun değerinin 1.5'dan büyük olması önerilmektedir (Sabir, Moloy, & Bhasin, 2016).

Rezolüsyon hesabı aşağıdaki formül ile hesaplanır

$$R_s = \frac{2(t_{r1} - t_{r2})}{W_1 + W_2} \quad (4)$$

t_r : alıkonma zamanı

W:pik genişliği

HPLC yönteminin validasyonu

Yöntem validasyonu için doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı ve geri kazanım parametreleri incelendi (Korashy et al., 2022; Sabir, Moloy, & Bhasin, 2016).

Mobil faz bileşen oranlarının belirlenmesi

Mobil faz bileşiminin etkisini gözlemlemek için yapılan çalışmada alıkonma zamanı, pik yapısı ve pik alanı açısından en iyi oran % 0.1 FA:ACN:metanol 75:15:10 (v/v/v) gözlemlenmiştir. SilUR/USil C18 (250 mm, 4.6 mm, 5 µm) kolonda, 1.0 mL/dk akış hızı, 30.0 °C kolon sıcaklığı, 265 nm dalga boyu kromatografik koşullarında değişen mobil faz bileşenleri değerlerine göre SDZ, SMR ve SMX'in alıkonma zamanları (dk), kapasite faktörleri, seçicilik faktörü ve rezolüsyon değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Sistem uygunluk parametreleri dikkate alındığında mobil faz bileşimi 75:15:10 (v/v/v) olarak seçilmiştir. Mobil faz bileşimde %ACN oranı arttıkça pik genişliği ve kuyruklanma azalmakta ve analiz süresi kısalmaktadır. % 75:25 (v/v) kapasite faktörü sırasıyla 0.6, 0.9 ve 3.0 hesaplanmıştır. Bu koşulda analitlerin birbirinden uygun olarak ayıramadığı gözlemlenmiştir.

Mobil faz bileşimine metanol eklenerek SAs'lerin kromatografik ayırımına etkisi incelenmiştir. Mobil Faz bileşiminde metanol oranının artmasıyla kapasite faktörü 1'e yaklaşmıştır. Mobil faz bileşimi 75:15:10 (v/v/v) ve 75:10:15 (v/v/v) arasında k ve α değerleri arasında fark gözlenmemiş sürenin daha kısa olması nedeniyle mobil faz bileşimi 75:15:10 (v/v/v) optimum olarak seçilmiştir. Daha sonra aynı mobil faz bileşimde aynı özellikte daha kısa bir kolon kullanılarak SAs'lerin ayırımı incelenmiştir. 150 mm kolonda SAs'lerin kromatografik ayırımı başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Bundan sonraki deneyler 75:15:10 (v/v/v) mobil faz bileşimi ve 150 mm C18 kolonu kullanılmıştır. Mobil faz bileşen oranları ile ilgili kromatogramlar Çizelge-1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Mobil Faz Bileşen Oranlarının SAs'lerin Kromatografik Ayırımına Etkisi

Mobil Faz Bileşenleri (%)			Alınma Süreleri (dk)			Kapasite Faktörü			α		Rs	
A	B	C	SDZ	SMR	SMX	k_1	k_2	k_3	α_1	α_2	Rs ₁	Rs ₂
85	15	-	7.2	9.3	28.5	1.3	1.9	7.9	1.5	4.1	1.1	8.6
80	20	-	5.7	6.9	17.3	0.8	1.2	4.4	1.5	3.8	1.1	6.0
75	25	-	4.9	5.7	12.1	0.6	0.9	3.0	1.4	3.4	0.7	3.7
75	20	5	5.1	6.1	13.7	0.7	1.0	3.4	1.4	3.5	1.0	5.3
75	15	10	5.4	6.7	15.9	0.8	1.2	4.2	1.6	3.5	1.1	6.8
75	10	15	5.5	7.1	17.2	0.8	1.3	4.6	1.6	3.5	0.8	8.4

A: % 0.1 FA çözeltisi, B: ACN C: Metanol

Protein çöktürme yönteminin optimizasyonu

Protein çöktürme yöntemi, bir plazma ve süt gibi protein içeriği yüksek bir örneğe metanol, asetonitril gibi bir organik çözücünün veya HCl, HClO₄ gibi bir inorganik asitin eklenmesini içerir (Li et al., 2015; Pochivalov, Cherkashina, Shishov, & Bulatov, 2021). Eklenen reaktif numunedeki proteinlerin çözücüden çökmesine neden olur ve santrifüjlemeden sonra proteinler tüpün dibinde bir pelet oluşturur. Süpernatant analiz için kullanılmak üzere alınır.

Protein çöktürme yöntemi geliştirme çalışmaları sırasında çöktürücü ajan olarak metil alkol, asetonitril (ACN), perklorik asit (PA), aseton ve bunların bileşimleri denenmiştir. Çöktürme işlemi için 2,5 mL süt örneği üzerine standartlar ve çöktürme ajanları eklenmiştir. En iyi çökmeyi PA ile sağlamıştır. ACN ve metil alkol ile yapılan çöktürme işleminde proteinlerin çökmesi ve pelet haline gelmesi daha fazla çöktürücü (≥ 2 mL) gerekmektedir ve süpernatant berrak değildir ve HPLC analizine uygun değildir. PA ile yapılan çöktürme işleminde proteinlerin çökmesi için gerekli olan hacim diğer çöktürücülerden daha az (≤ 1 mL) ve süpernatant berraktır. Bu sebeple çöktürücü ajan olarak % 10' luk PA'nın farklı miktarları denenmiştir.

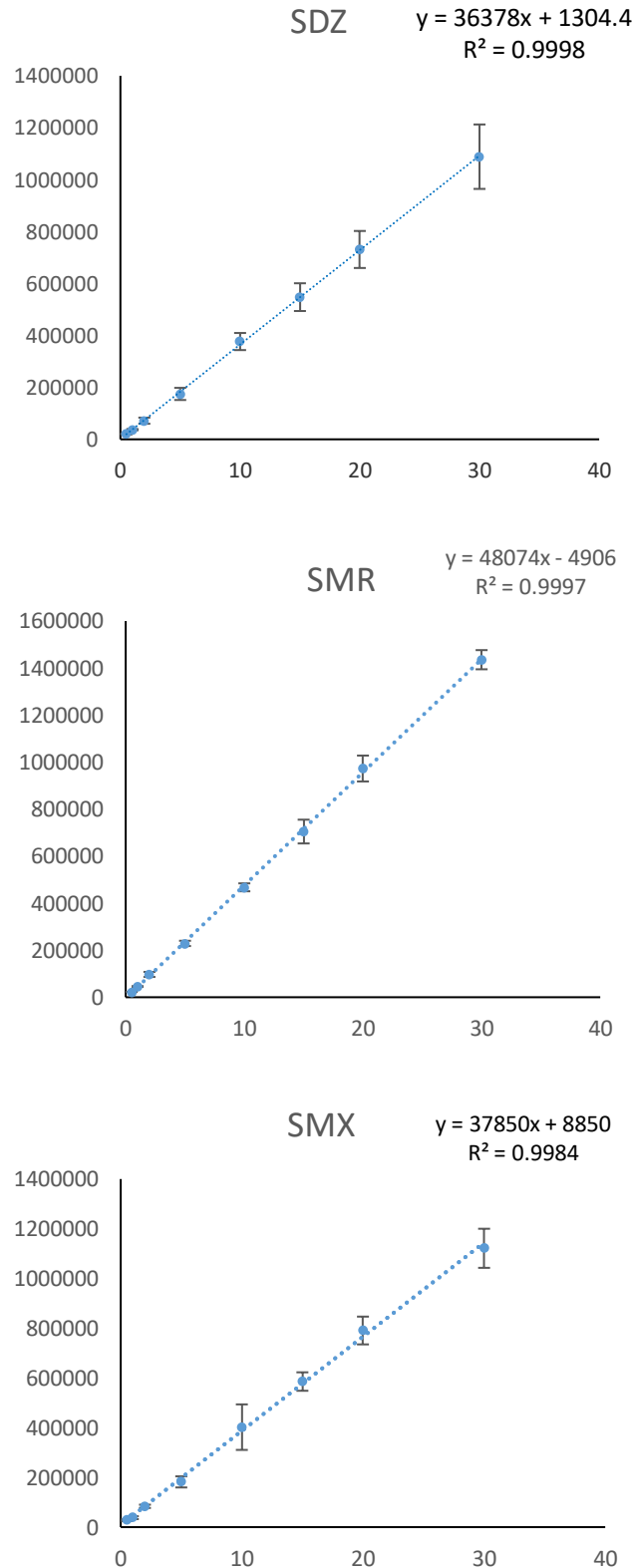
0.25 ve 0.5 mL %10 PA ilavesinde SDZ ve SMX geri kazanım değerleri \geq %94.8 iken SMX için % GK değerleri sırasıyla %73.4 ve 80.4'tür. 0.75 mL ve 1.0 mL % 10 PA miktarlarında üç analit içinde % GK değerleri \geq %95.2'tir. %10 PA miktarı arttığında SMX için %GK değeri düşmüştür. Büyük bir olasılıkla çöktürücü miktarı arttığında SMR'de proteinlerle birlikte çökmektedir. Geri kazanım verileri Çizelge 2'de verilmiştir. Optimum PA miktarı olarak 1.0 mL seçilmiş ve bundan sonraki deneylerde çöktürücü olarak %10'luk 1 mL PA kullanılmıştır.

Çizelge 2. Protein Çöktürme Ajanı Olarak Kullanılan % 10 PA Miktarının SAs Geri Kazanımlarına Etkisi

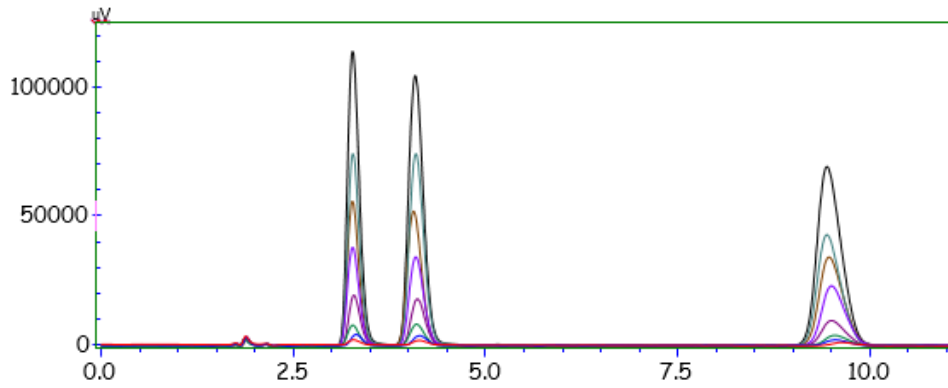
Protein çöktürme ajanı olarak kullanılan %10 PA miktarı (mL)	SDZ %GK	SMR %GK	SMX %GK
0.25	99.1±4.8	94.8±5.4	73.4±6.3
0.5	100.3±0.4	101.5±3.2	80.4±5.8
0.75	104.1 ±1.1	102.1±0.9	95.7±4.9
1.0	100.0 ±4.0	98.3 ±1	95.2 ±4.1
1.25	91.8 ±2.6	94.4 ±6.1	74.2 ±0.7

Doğrusallık

Doğrusallık çalışması kapsamında elde edilen HPLC yanıtları ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Analizde 0.5 ile 30.0 µg/mL, arasında değişen sekiz noktada ve her birinde 3 tekrarlı analiz yapıldı. Elde edilen HPLC yanıtları ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrileri ve denklemleri Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2. SAs lerin Kalibrasyon Grafikleri



Şekil 3. SAs'lerin Standart Çözeltilerinin Kromatogramları (0.5-30 µg/mL)

Gözlenebilme ve tayin sınırı

Yöntemin gözlenebilme(GS) ve tayin sınırı (TS) belirlemek için süt örneklerine 2 µg/mL SAs eklenerek aynı günde 10 tekrarlı analizi yapıldı. GS ve TS değerleri aşağıda verilen formüller kullanılarak hesaplandı (ICH, 2005).

$$GS = 3.3 * \frac{SD}{S} \quad (5)$$

$$TS = 10 * \frac{SD}{S} \quad (6)$$

SD: Standart sapma S: eğim

Yöntemin kesinlik çalışmasında 2, 5, 10 µg/mL SAs standart çözeltileri kullanıldı. Gün içi kesinlik çalışmaları, aynı gün içinde üç farklı derişimde hazırlanan çözeltilerin 5 tekrarlı analizi yapıldı. Günler arası kesinlik çalışması ise 3 farklı derişimdeki çözeltilerin 3 farklı gün de analizi ile yapıldı. Standart sapma ve ortalamala değer kullanılarak % bağıl standart sapma (BSS) hesaplanmıştır.

$$\%BSS = \frac{SD}{\bar{X}} * 100$$

SD: Standart sapma \bar{X} : ortalama

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 3' te verilmiştir.

Çizelge 3. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik Sonuçları

SAs	Gün içi tekrarlanabilirlik (n=5)					Günler arası tekrarlanabilirlik (n=3)			
	Eklenen (µg/mL)	Bulunan ($\bar{x} \pm SD, \mu\text{g/mL}$)	%GK	%BSS	%BH	Bulunan ($\bar{x} \pm SD, \mu\text{g/mL}$)	%GK	%BSS	%BH
SDZ	2	2.10±0.1	105.0±5.0	2.3	0.0	1.99±0.10	99.4±4.6	4.6	-0.6
	5	5.14±0.26	102.8±5.16	5.0	-7.0	4.98±0.11	99.7±2.1	2.1	-0.3
	10	10.61±0.20	106.1±2.0	2.0	-1.8	10.26±0.56	102.6±5.6	5.4	5.2
SMR	2	2.06±0.11	103.0±5.5	5.4	0.0	2.08±0.03	104.1±1.3	1.2	4.1
	5	5.11±0.22	102.3±4.4	4.3	-7.0	4.90±0.20	98.0±4.1	4.2	-2.0
	10	9.93±0.18	99.3±1.8	2.0	-1.8	9.80±0.20	98.0±2.0	2.0	-4.0
SMX	2	2.14±0.07	107.0±3.5	3.1	0.0	2.13±0.03	106.3±1.6	1.4	2.0
	5	4.81±0.29	96.1±5.8	6.0	-7.0	4.65±0.22	93.0±4.4	4.7	-7.0
	10	9.54±0.30	95.4±3	3.4	-1.8	9.63±0.19	96.3±1.9	1.9	-7.5

Doğruluk

Doğruluk için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Geri kazanım çalışması süt örneklerinde 4, 10, 20 µg/mL olmak üzere 3 farklı derişimde 3 ayrı tekrar olacak şekilde yapıldı. Çalışmada % geri kazanım hesabı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{Geri kazanım} = \frac{\text{ölçülen}}{\text{eklenen}} * 100$$

Süt numunesinde geri kazanım sonuçları SDZ için % 99.4±4.6 ve 106.1 ±2.0 SMR için 99.3±1.8 ve 104.1±1.3 SMX için 93.0 ±4.4 ve 107.0±3.5 aralığında gözlenmiştir. Sülfanamidler için bağıl hata değerleri % -0.3 ve % 7.5 aralığındadır. Sonuçlar Çizelge 4'te detaylı olarak verilmiştir.

Sağlamlık

Geliştirilen HPLC yönteminin sağlamlığının sınanması için sıcaklıktaki küçük değişimlerin analiz sonuçlarına etkisi incelendi. Çalışmada sıcaklığının kromatografik ayırma etkisini gözlemlemek için 30, 35 ve 40 °C de analizler yapıldı. Artan sıcaklık değerlerinin analitlerin alıkonma süresi ve pik alanları üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüş ve optimum sıcaklık 30 °C olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4. Sıcaklığın SAs'lerin kromatografik Ayırma Etkisi (1.00 mL/dk akış hızı, λ=265 nm n=3)

Kolon Sıcaklığı (°C)	SDZ		SMR		SMX	
	t _R	Pik Alanı	t _R	Pik Alanı	t _R	Pik Alanı
30	5.26±0.16	587244±7999	5.60±0.14	432353±4508	15.66±0.22	414646±17590
35	5.45±0.07	585816±12368	6.52±0.49	430544±24838	16.35±0.30	406767±22333
45	5.36±0.01	581556±5153	6.69±0.05	433214±1753	15.40±0.14	405471±24664

Sistem uygunluk testi

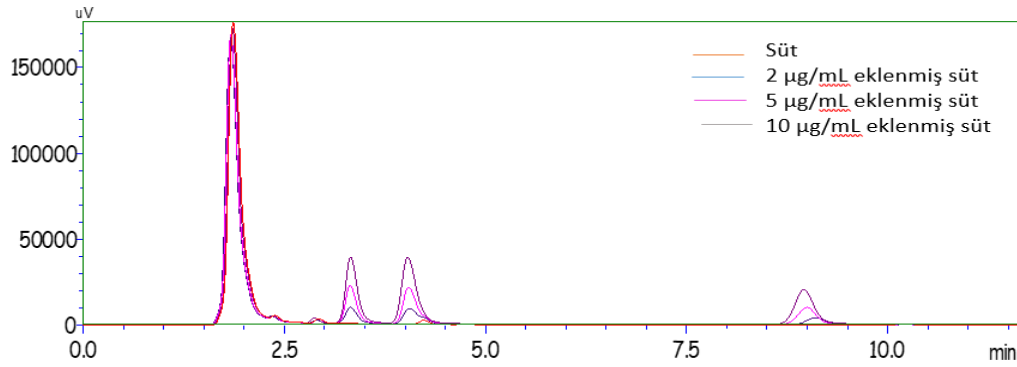
Yöntemin sistem uygunluğunu değerlendirmek için, teorik plaka sayıları, kuyruklanma faktörü, kapasite faktörü, alıkonma süresi, rezolüsyon ve pik genişliği kullanıldı. Sistem uygunluk parametreleri LC Labsolution 1.25 yazılımı ile hesaplandı. Sistem uygunluk parametreleri Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. HPLC Sistem Uygunluk Parametreleri

Parametre	SDZ	SMR	SMX
Lineer aralık	0.5-30	0.5-30	0.5-30
Kalibrasyon eşitliği	y = 36378x + 1304	y = 48074x - 4906	y = 37850x + 8850
Korelasyon katsayısı	0.9998	0.9997	0.9984
GS (µg/mL)	0.11	0.10	0.14
Teorik plaka sayısı (N)	2131	2267	4120
Kapasite faktörü (k')	2.35	3.18	8.73
Kuyruklanma faktörü (TF)	1.22	1.19	1.16
Alıkonma zamanı (t _r)	3.27	4.08	9.38
Resolüsyon (Rs)	3.42	2.56	11.2
USP Pik genişliği	0.284	0.343	0.579

Örnek uygulaması

Yerel marketten alınan üç farklı markaya ve çiftlikten alınan bir süt örneğine geliştirilen yöntem uygulanmıştır. Yöntem uygulanmış süt numunesi ve 2, 5 ve 10 µg/mL eklenmiş süt numunesine ait kromatogram Şekil 4'de verilmiştir. Süt örneklerinde SDZ, SMR ve SMX kalıntısına rastlanmamıştır.



Şekil 4. Süt Numunesine Protein Çöktürme İşlemi Sonrası Elde Edilen SAs'lerin Kromatogramı

Geliştirilen protein çöktürme temelli- kromatografik yöntemin diğer yöntemlerle karşılaştırılması

Süt örneklerinde SAs'lerin tayini için geliştirilen protein çöktürme temelli HPLC-DAD yönteminin literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılması Çizelge 6'da verilmiştir. Literatürde bulunan bir çok çalışma da süt örneklerine protein çöktürmeye ek olarak bir ayırma/deriştirme yöntemi de uygulanmıştır (Arroyo-Manzanares, Gámiz-Gracia, & García-Campaña, 2014; Fu et al., 2019; Gao, Luo, Ding, & Feng, 2010). Önerilen yöntemde süt örneklerinde SAs'lerin miktarları protein çöktürme işleminden sonra HPLC ile basit, doğru ve hızlı bir şekilde tayin edilebilmektedir. Geliştirilen yöntem Tablo 4'teki diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında daha az kimyasal kullanımı, pratiklik, zaman ve süt örneklerindeki \geq %93 geri kazanım değerleri ile önemli avantajlara sahiptir. Ayrıca karşılaştırılabilir LOD ve % BSS değerlerine sahiptir.

Çizelge 6. Geliştirilen Yöntemin Literatürdeki Diğer Yöntemlerle Karşılaştırılması

Yöntem	LOD (µg/L)	Lineer Aralık (µg/L)	%BSS	% GK	Kaynak
DLLME-HPLC-PD	≤ 1.21	2.01-250	≤ 9.7	90.8-104.7	(Arroyo-Manzanares et al., 2014)
MSPE-LC-MS/MS	0.5-49.5 ^a	0.05-20 ^b	0.9-10.8	87.6-115.6	(Gao, Luo, Ding, & Feng, 2010)
IAC-HPLC-PDA	14.1-45.0 ^c	46.9-150.0	< 5.5	78.2-105.2	(Kim, Jeong, Park, Kim, & Kim, 2016)
M-µ-SPE/HPLC-DAD	0.02-1.5	0.1-500	≤ 7.7	80.7-116.2	(Nasir et al., 2019)
DLLME-UHPLC-MS	0-5-1.5	10-500	≤ 7.5	88.2-99.5	(Shaaban et al., 2023)
MSPE-HPLC-UV	1.16-1.59	0.02-50.00 ^d	≤ 8.9	62.2-104.3	(Li et al., 2015)
ME-HPLC-UV	1-5	3-1500	≤ 9.0	93-100	(Pochivalov et al., 2021)
SPE-HPLC-VWD	1	10-20000	< 5.2	68.9-103.8	(Chen et al., 2019)
PÇ-HPLC-DAD	$\leq 0.43^d$	0.5-30 ^d	≤ 6.0	93.0-106.3	Bu çalışma

^a:ng/L, ^b:ng/mL, ^c:µg/kg, ^d:mg/L, MSPE: Manyetik katı faz ekstraksiyon, ME: Mikroekstraksiyon DLLME: Dispersif sıvı sıvı ekstraksiyon M-µ-SPE: Manyetik mikro-katı faz ekstraksiyon, IAC: immünoafinite kromatografisi PÇ:Protein Çöktürme

SONUÇ

Bu çalışmada SDZ, SMR, ve SMX'in süt örneklerinde aynı anda analizi için HPLC yöntemi geliştirilmiştir. SDZ, SMR, ve SMX'in HPLC yöntemi ile aynı anda analizi 1.0mL/dk akışta 75:15:10 (v/v/v) oranında %0.1'lik formik asit, ACN ve metanol ile ters faz C18 kolonu (4.6 x 150 mm x 5 µm) ile yapılmıştır. Geliştirilen HPLC yönteminin validasyonu için SDZ, SMR, ve SMX standart çözeltilerinin doğrusallığı, gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı, doğruluğu, kesinliği, geri kazanım ve sağlamlık gibi validasyon parametreleri değerlendirilmiştir. İzlenen tüm validasyon test parametrelerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak önerilen yöntem,

süt örneklerinde sülfonamidlerin miktarının belirlenmesi için doğruluğu yüksek, tekrarlanabilir ve sağlamdır. Ayrıca süt örneklerinde SAs'lerin eş zamanlı tayinin için rutin olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Arroyo-Manzanares, N., Gámiz-Gracia, L., & García-Campaña, A. M. (2014). Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, *143*, 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.008>
- Chen, Z., Yu, C., Xi, J., Tang, S., Bao, T., & Zhang, J. (2019). A hybrid material prepared by controlled growth of a covalent organic framework on amino-modified MIL-68 for pipette tip solid-phase extraction of sulfonamides prior to their determination by HPLC. *Microchimica Acta*, *186*(6), 393. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3513-7>
- Chromatography, A. (2014). *International Conference on Harmonization, Photostability testing of new drug substances and products, QIB, November 1996. 1*(2), 1–4.
- Fu, L., Zhou, H., Miao, E., Lu, S., Jing, S., Hu, Y., ... Wu, M. (2019). Functionalization of amino terminated carbon nanotubes with isocyanates for magnetic solid phase extraction of sulfonamides from milk and their subsequent determination by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, *289*(October 2018), 701–707. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.097>
- Gao, Q., Luo, D., Ding, J., & Feng, Y. Q. (2010). Rapid magnetic solid-phase extraction based on magnetite/silica/poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate) composite microspheres for the determination of sulfonamide in milk samples. *Journal of Chromatography A*, *1217*(35), 5602–5609. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.067>
- ICH. (2005). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ICH Q2(R1). In *International Conference on Harmonization Quality Guidelines*. Geneva, Switzerland.
- Kim, H. J., Jeong, M. H., Park, H. J., Kim, W. C., & Kim, J. E. (2016). Development of an immunoaffinity chromatography and HPLC-UV method for determination of 16 sulfonamides in feed. *Food Chemistry*, *196*, 1144–1149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.014>
- Korashy, M. A. R., Gawad, S. A. A., Hassan, N. Y., & Abdelkawy, M. (2022). Solid Phase Extraction and Simultaneous Chromatographic Quantification of some Non-steroidaAnti-inflammatory Drug Residues; an Application in Pharmaceutical Industrial Wastewater Effluent. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *58*, 1–14. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e18691>
- Li, Y., Wu, X., Li, Z., Zhong, S., Wang, W., Wang, A., & Chen, J. (2015). Fabrication of CoFe₂O₄-graphene nanocomposite and its application in the magnetic solid phase extraction of sulfonamides from milk samples. *Talanta*, *144*, 1279–1286. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.006>
- Mthiyane, Z. L., Makhubela, N., Nyoni, H., Madikizela, L. M., Maseko, B. R., & Ncube, S. (2023). Determination of antibiotics during treatment of hospital wastewater using automated solid-phase extraction followed by UHPLC-MS: occurrence, removal and environmental risks. *Environmental Technology (United Kingdom)*, (May), 1–11. <https://doi.org/10.1080/09593330.2023.2209741>

- Nasir, A. N. M., Yahaya, N., Zain, N. N. M., Lim, V., Kamaruzaman, S., Saad, B., ... Hirota, Y. (2019). Thiol-functionalized magnetic carbon nanotubes for magnetic micro-solid phase extraction of sulfonamide antibiotics from milks and commercial chicken meat products. *Food Chemistry*, 276(June 2018), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.044>
- Pochivalov, A., Cherkashina, K., Shishov, A., & Bulatov, A. (2021). Microextraction of sulfonamides from milk samples based on hydrophobic deep eutectic solvent formation by pH adjusting. *Journal of Molecular Liquids*, 339, 116827. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116827>
- Sabir, A. M., Moloy, M., & Bhasin, P. S. (2016). Hplc Method Development and Validation: a Review. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4), 39–46. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04407>
- Sarakatsanou, C., Karastogianni, S., & Girousi, S. (2023). Promising Electrode Surfaces, Modified with Nanoparticles, in the Sensitive and Selective Electroanalytical Determination of Antibiotics: A Review. *Applied Sciences (Switzerland)*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/app13095391>
- Shaaban, H., Mostafa, A., Alqarni, A. M., Alsultan, R., shehab, Z. Al, Aljarrash, Z., ... Amir, M. (2023). Dispersive liquid-liquid microextraction utilizing menthol-based deep eutectic solvent for simultaneous determination of sulfonamides residues in powdered milk-based infant formulas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 117(December 2022), 105137. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105137>
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., & Costanzo, S. D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*, 41(18), 4164–4176. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.005>
- Zhao, L., Ji, Y., Sun, P., Deng, J., Wang, H., & Yang, Y. (2019). Effects of individual and combined zinc oxide nanoparticle, norfloxacin, and sulfamethazine contamination on sludge anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 273(September 2018), 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.049>