

Sunuş

Hayvancılık sektörü bakımından büyük bir potansiyele sahip olan ülkemizde bazı hayvan hastalıklarının mevcudiyeti önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalıklarla mücadelede veteriner teşhis ve analiz laboratuvarlarında hızlı ve güvenilir teşhis yapılması erken tedbir alınması açısından son derece önemlidir.

Bu kapsamda veteriner teşhis ve analiz laboratuvarlarının alt yapıları bütçe imkanları doğrultusunda sürekli iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Çalışmalar sonucunda, Avrupa Birliği entegrasyonu içerisinde ulusal referans laboratuvar oluşturulmuş ve Bakanlığımız Teşhis ve Analiz Laboratuvarlarının akreditasyonları gerçekleştirilmiştir.

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde yeni hastalıkların görülmeye başlaması ve teknolojik gelişmelere paralel olarak hastalıkların teşhisinde yeni metotlar kullanılmaya başlanmıştır. Gerek ülkemizde kullanılan mevcut metotların gerekse uluslararası kabul görmüş yeni teşhis metotlarının tekrar gözden geçirilerek standart operasyon prosedürlerin güncellenmesi amacıyla Bakanlığımız yetkilileri, Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri ve Enstitü Uzmanlarının koordineli olarak çalışacakları altı adet komisyon oluşturulmuştur. Oluşturulan komite üyelerinin özverili çalışmaları sonucunda teşhis metodu standart operasyon prosedürlerine son hali verilmiş ve tüm komisyonların çalışmaları bir araya getirilerek "Teşhiste Metot Birliği Kitabı" oluşturulmuştur. Tüm Kamu ve Özel Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarları bu kitapta yer alan bilimsel komitenin onayını almış teşhis ve analiz metotlarını kullanacak ve bu suretle teşhiste metot birliği sağlanacaktır.

Gerek Bakanlığımız Laboratuvarlarında ve gerekse Bakanlığımızdan ruhsatlı Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarlarında yayımlanmış olan bu metotlar uygulanacak olup, analiz sonuçları ulusal referans laboratuvarlar tarafından doğrulandıktan sonra geçerli olacaktır.

Bilimsel komite üyeleri belli zamanlarda bir araya gelip, gelişmeleri takip ederek bünyelerinde çalışmalarına devam edecek ve yeni geliştirilen metotların mevcut kitaba ilavesiyle kitabın güncellenmesi temin edilecektir. Yeni geliştirilen veya ilk defa kullanılacak bir metodun Standart Operasyon Prosedürü oluşturulup bilimsel komitenin onayından geçtikten sonra kullanılmaya başlanacaktır.

AB müktesebatına uyumlaştırma çalışmalarının aktif olarak yürütüldüğü bu günlerde, Genel Müdürlüğümüz, Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri ve Enstitü Uzmanlarının gayretli çalışmaları sonucu hazırlanan Teşhiste Metot Birliği kitabının ülkemize yararlı olacağını umuyor ve bu konuda emeği geçenlere teşekkür ediyorum.

Dr. M. Mehdi EKER

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı
Sayın Dr. M. Mehdi EKER'in himayeleri ile

YÖNETİM KOMİTESİ

Vedat MİRMAHMUTOĞULLARI
Dr. Nihat PAKDİL
Prof. Dr. İrfan EROL
Habib CAN
Dr. Nahit YAZICIOĞLU

GÖREV ALANLAR

VE KATKIDA BULUNANLAR (*)

Dr. Funda ALTINÖZ

Dr. Erhan AKÇAY

Ayşe ATEŞOĞLU

Zeynel ARSLAN

Yusuf AKPINAR

Hasan AYDIN

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Hüseyin ATİK

Özlem BAĞCI

Halil BAŞARAN

Dr. Ayşen BEYAZIT

Prof. Dr. Emine BAYDAN

Dr. Aysel Ünsal BACA

Dr. Yasemin COŞKUN

Mustafa COŞAR

Hüseyin ÇAKIROĞLU

Emine ÇİFTÇİ

Dr. Fethiye ÇÖVEN

Dr. Ahmet DENİZ

Prof. Dr. K. Serdar DİKER

Dr. İffet DİNÇ

Asiye DAKMAN

Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER

A.Turan ERDOĞDU

Dr. Arife ERTÜRK

Dr. Mehmet EKİK

Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ

Prof. Dr. Bahadır GÖNENÇ

Elçin GÜNAYDIN

Yasin GÜÇLÜ

Dr. Ziynet GÜNEN

Burak GÜNGÖR

Dr. Yasemin GÜREL

İrem GÜLAÇTI

Mehmet Fahrettin HOCANOĞLU

Dr. Uğur KÜÇÜKAYAN

Prof. Dr. Osman KUTSAL

Doç. Dr. Taner KARAOĞLU

Dr. Gülnur KALAYCI

Kamile KESLER

M. Levent KAYNAR

Tülay KURT

M. Murat MADEN

Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU

Asuman SOYSAL NARIŞAHİN

Dr. Taraneh ÖNCEL

Ümit ÖZDEMİR

Doç Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU

Dr. Buket ÖZYER

Dr. Çiğdem PIŞKİN

Ünal PARLAK

Alper SEZGİN

Dr. Beyhan SAREYYÜPOĞLU

Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

Dr. M. Melih SELVER

Yasin ŞEN

Dr. Serra TUNALIGİL

Dr. Yavuz ULUSOY

Dr. H. Hüseyin ÜNAL

Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI

Dr. Öznur YAZICIOĞLU

Dr. Funda YÜZBAŞIGİL

Dr. Ayşin BAŞSATAN YORUMAZ

Dr. N. Fadime YALÇIN

(*) Soyadına göre alfabetik dizin

Redaksiyon Komitesi Listesi

Parazitoloji Komisyonu	: Dr. Funda ALTINÖZ Özlem BAĞCI
Bakteriyoloji Komisyonu	: Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER Dr. Serra TUNALIGİL
Patoloji Komisyonu	: Dr. Öznur YAZICIOĞLU Dr. Ziyet GÜNEN
Farmakoloji ve Toksikoloji Komisyonu	: Dr. Yasemin COŞKUN Dr. H. Hüseyin ÜNAL
Viroloji Komisyonu	: Doç. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU Dr. Arife ERTÜRK
Kanatlı Hastalıkları	: Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU Dr. Fethiye ÇÖVEN

Editör Listesi

Parazitoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU
Bakteriyoloji Komisyonu	: Prof. Dr. K. Serdar DİKER
Patoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL
Farmakoloji ve Toksikoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Emine BAYDAN
Viroloji Komisyonu	: Doç. Dr. Taner KARAOĞLU
Kanatlı Hastalıkları	: Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

İÇİNDEKİLER

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ	9
ZEHİRLENMELER	11
AĞIR METALLERİN AAS İLE ANALİZİ METODU	12
HAYVANSAL DOKU ÖRNEKLERİNDE KADMİYUM ELEMENTİNİN AAS İLE ANALİZİ METODU	19
HAYVANSAL DOKU ÖRNEKLERİNDE KURŞUN ELEMENTİNİN AAS İLE ANALİZİ METODU	24
KAN SERUMUNDA VE DOKULARDA BAKIR ELEMENTİNİN AAS İLE ANALİZİ METODU	29
KAN SERUMUNDA VE DOKULARDA ÇİNKO ELEMENTİNİN AAS İLE ANALİZİ METODU	33
KAN SERUMUNDA VE DOKULARDA DEMİR ELEMENTİNİN AAS İLE ANALİZİ METODU	37
ZEHİRLEME ŞÜPHELİ METARYALLERDE KARBAMAT GRUBU İNSEKTİSİDLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE KALİTATİF ANALİZ METODU	41
ZEHİRLEME ŞÜPHELİ METARYALLERDE ORGANİK FOSFORLU İNSEKTİSİTLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE KALİTATİF ANALİZ METODU	45
ZEHİRLEME ŞÜPHELİ METARYALLERDE ORGANİK KLORLU İNSEKTİSİTLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE KALİTATİF ANALİZ METODU	49
BAL VE PETEKLERDE PESTİSİTLERİN LC-MS/MS İLE ANALİZ METODU	53

BAL VE PETEKLERDE PESTİSİT KALINTILARININ GC-MS İLE ANALİZİ METODU	60
HAYVANSAL DOKU VE YEMLERDE PESTİSİTLERİN LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	66
HAYVANSAL DOKU VE YEMLERDE PESTİSİT KALINTILARININ GC-MS İLE ANALİZİ METODU	73
HAYVANSAL DOKU, YEM VE YEM HAMMADDELERİNDE AFLATOKSİN VE OKRATOKSİNİN LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	79
SÜT ve SÜT ÜRÜNLERİNDE AFLATOKSİN M1'İN LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	87
BALDA AMİNOASİTLERİN LC-MSMS İLE ANALİZİ METODU	94
ZEHİRLEME ŞÜPHELİ METARYALLERDE PESTİSİTLERİN GC- MS TEKNİĞİYLE TARAMA ANALİZ METODU	100
HAYVANSAL DOKULAR, YEM VE SUDA BAZI ELEMENTLERİN ICP-MS İLE ANALİZİ METODU	104
Ulusal Kalıntı İzleme Projesi	109
BALDA NİTROFURAN İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	110
BALIK KAS DOKUSUNDA TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ CHARM II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF ANALİZİ	117
BALIK DOKUSUNDA NİTROİMİDAZOL İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	123
BALIKTA NİTROFURAN İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	130

KANATLI KARACIĞER DOKUSUNDA TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ CHARM II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF ANALİZİ	136
KANATLI KARACIĞERİNDE KLORAMFENİKOL KALINTILARININ ELISA YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU	142
KANATLI KAS DOKUSUNDA TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ CHARMII YÖNTEMİ İLE KALİTATİF ANALİZİ	148
KAS DOKUDA KLORAMFENİKOL KALINTILARININ ELISA YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU	154
KAS DOKUDA NİTROFURAN KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	160
KAS DOKUDA NİTROİMİDAZOL KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	167
KIRMIZI ETTE TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ CHARM II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF ANALİZİ	175
SÜTTE MAKROLİT GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ CHARM-II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF ANALİZİ	181
SÜTTE KLORAMFENİKOL KALINTILARININ ELISA YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU	187
SÜTTE NİTROFURAN İLAÇ KALINTILARININ LCMS/ MS İLE ANALİZİ METODU	193
SÜTTE NİTROİMİDAZOL İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	200
SÜTTE TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN CHARM-II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU	207

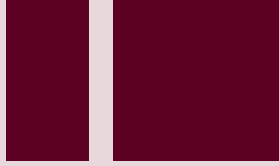
YUMURTADA KLORAMFENİKOL KALINTILARININ ELISA YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU	212
YUMURTADA NİTROFURAN GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	218
YUMURTADA NİTROİMİDAZOL İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	225
SÜTTE NONSTEROİD ANTI INFLAMATUAR GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MSMS İLE ANALİZ METODU	232
BALDA FUMAGİLLİN İLAÇ KALINTILARININ HPLC-DAD/MS İLE ANALİZ METODU	240
BALIKTA AVERMEKTİN GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MSMS İLE ANALİZİ	247
DOKULARDA BENZİMİDAZOL GRUBU İLAÇLARIN VE LEVAMİZOL KALINTILARININ LCMS/ MS İLE ANALİZİ METODU	254
KAS DOKUDA ANTİKOKSİDİAL GRUBU İLAÇLARIN LC-MS/MS İLE ANALİZ METODU	261
SÜTTE LEVAMİZOL VE BENZİMİDAZOL GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MSMS İLE ANALİZİ METODU	269
SÜTTE AVERMEKTİN GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MSMS İLE ANALİZİ METODU	276
YUMURTADA ANTİKOKSİDİAL GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU	284
BALDA PESTİSİT KALINTILARININ GC-ECD-FPD, HPLC-PCD İLE TAYİNİ METODU	290
BALDA AMİTRAZ VE METABOLİTLERİNİN GC-MS İLE TAYİNİ METODU	300

BALIK VE KANATLI ETLERİNDE ORGANİK KLORLU İNSEKTİSİTLERİN GC-ECD İLE TAYİNİ METODU	305
KANATLI ETİNDE PRETROİD İNSEKTİSİTLERİN GC-ECD İLE TAYİNİ	311
ÇİĞ SÜTTE ORGANİK FOSFORLU İNSEKTİSİTLERİN GC-FPD İLE TAYİNİ METODU	317
KANATLI PLAZMASINDA ANABOLİK HORMONLARIN GC-MS İLE TAYİNİ METODU	323
BALIK DOKUSUNDA POLİKLORBİFENİLLERİN GC-ECD İLE TAYİNİ METODU	329
ÇİĞ SÜTTE ORGANİK KLORLU İNSEKTİSİTLERİN GC-ECD İLE TAYİNİ METODU	334
YUMURTADA ORGANİK KLORLU İNSEKTİSİTLER ve POLİKLOROBİFENİLLERİN GC-ECD İLE TAYİNİ METODU	340
BALDA STREPTOMİSİN KALINTILARININ CHARM-II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU	346
BALDA KLORAMFENİKOL KALINTILARININ ELISA YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU	353



**FARMAKOLOJİ VE
TOKSİKOLOJİ**

ZEHİRLENMELER



AĞIR METALLERİN AAS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu metot, hayvansal doku ve ürünlerde, yem ve yem hammaddelerinde ağır metallerin varlığını ve miktarını belirlemeyi amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot Atomik Absorbtion Spektrometre -AAS sistemlerinin kullanarak kursun, bakır, kadmiyum, civa ve çinko gibi elementlerin analizini kapsamaktadır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.
7. Kullanılan AAS sistemi ve lambaları her analiz öncesi kontrol edilmelidir.
8. Kullanım sonrası AAS sistemi ve lambaları gerekli bakım ve temizlik yapılarak uygun şartlarda saklanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Ağır metal/Metal: Ağır metal terimi, arsenik, kadmiyum, krom, kurşun gibi çoğunlukla güçlü zararlı etkisi olan ve organizma için gerekli olmayan elementleri ifade eder. Çinko, demir gibi bazı elementler ise vücut için gereklidir. Ancak, bu elementlerin yüksek dozları da canlılarda zehirlenmelere neden olur. Elementler yeryüzü kabuğunun doğal unsurlarıdır. Coğrafi özelliklere bağlı olarak doğal su kaynakları ve toprakta, dolayısıyla böyle yerlerde yetişen bitkilerde farklı düzeylerde element bulunur. Özellikle endüstriyel faaliyetler çevredeki metal/zararlı metal yükünü önemli ölçüde artırır. Ağır metaller, insan ve hayvanlarda genellikle ağız (yem, gıda, su vb) ya da solunum yoluyla vücuda girerek çeşitli zararlı etkilere neden olur.

Spike: standart madde yüklenmiş marazi madde örneği.

AAS: Atomik Absorbtion Spektrometre

Hidrür Sistem

Flame sistem

Grafit sistem

Mikrodalga fırın

Kül fırını

DİS: Deiyonize su

MRL:Maksimum rezidü limiti

MRPL:Minimum required performans level

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Ağır metal zehirlenmesi veya kalıntılarının araştırılması amacıyla, laboratuara gelen hayvansal doku (et, karaciğer, böbrek, mide ve barsak içeriği ve ürünlerin) ve şüpheli numunelerin (su , yem v.s.) ekstraksiyon yöntemi ile kül fırını veya mikrodalga fırın kullanılarak organik dokulardan uzaklaştırılması ve ağır metal bakiyelerinin uygun çözümlerle çözünerek AAS sisteminde test edilmesi işlemlerini kapsamaktadır.

Bu metot 4 basamakta uygulanır;

1. Şüpheli numuneler yapılarına göre olası ağır metal kalıntılarının dokulardan ayrıştırılması için Nitrik asit, HCl gibi güçlü asidik çözeltilerle işleme tabii tutularak çözünmesi sağlanır.
2. Ağır metaller kül fırınında organik maddelerden ayrıştırılarak kalan bakiyeleri test edilmesi için uygun çözümlerle çözünür.
3. Olası ağır metal düzeylerinin ölçümü için öncelikle standart çözeltilerle performans testi yapılarak AAS' ye verilmek üzere hazırlanır.
4. AAS sistemi ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. 50 ml.lik balon joje
2. 100 ml. balon joje
3. 250 ml.lik balon joje
4. 100 ml.lik beherler
5. 250 ml.lik beherler
6. 250 ml. erlenmayer
7. 100 ml. mezür
8. 250 ml. mezür
9. 50 cc.lik huni
10. 100cc.lik huni
11. Porselen kroze
12. Kroze tutucu maşa

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Deiyonize su
2. Nitrik Asit (Analitik saflıkta)
3. Hidrojen Peroksit (Analitik saflıkta)
4. $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (M=115,03 g/mol'dan % 1'lik)
5. $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (M=256,41 g/mol'dan % 1'lik)
6. % 65 Nitrik asit (Analitik saflıkta)
7. % 30 Hidrojen peroksit (Analitik saflıkta)
8. % 2 Nitrik asit: 1 L'lik bir balon joje içerisine 2 ml HNO_3 (% 65) konulur. Daha sonra balon joje işaret çizgisine kadar saf su ile doldurulur.
9. Matrix modifier çözeltisi: 100 μL $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ + 1 mL $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 'dan ve ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.
10. Referans Maddeler

- Kadmiyum standardı (Ana stok -1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- Sertifikalı referans standart madde (kursun, bakır, çinko, kadmiyum ve civa)

11. Standart Çözeltiler

- Kadmiyum standardı-Ana stok (1000 µg/ml-1000 ppm)
- Dilüe kadmiyum standardı-Ara stok (1000 µg/ L-1000 ppb): Ana stok kadmiyum standardından 0.1 mL alınır ve 100 mL'ye ultra saf su ile tamamlanır.
- Kadmiyum çalışma standardı (2 µg/L: 2 ppb): Ara stok kadmiyum standardından 0.2 mL alınır ve 100 mL'ye ultra saf su ile tamamlanır.
- Diğer referans standart çözeltiler de benzer şekilde hazırlanarak çalışma her bir için ayrı ayrı hazırlanır.

7.3. Numune Analizi

1. Analiz için gelen hayvansal dokuların sadece yenilebilir kısımları analizlerde kullanılır. Alınan örnekler öncelikle etüvde 110-130 °C'de kuru madde bazında %99,9 oranını tanımlayan şekilde (sabit tartım ağırlığına gelene kadar) suyu uçurulur ve kurutma işlemi gerçekleştirilir.
2. Daha sonra farklı numuneler için uygun yakma programına göre 0.5 g'lık doku örnekleri dijital terazide tartılır, sonra da mikrodalga fırının numune kaplarına (Vassell) konularak üzerine 6 mL nitrik asit (% 65 HNO₃) + 3 mL Hidrojen Peroksit (% 30 H₂O₂) ilave edilir.
3. Aşağıda gösterilen dört basamakta ısı, güç ve Süre (minute) programı uygulanır.

Adım	Güç (watts)	Süre (minute)
1	250	3
2	630	5
3	500	22
4	0	15

Bu program 12 teflon kap için uygundur. Eğer daha az örnekle çalışılacaksa diğer kaplara sadece reagent konulmalıdır.

4. Sistemik hatalara izin vermemek için sertifikalı bir referans materyal veya miktarını bildiğimiz standart çözeltiyi örnek partiye dahil etmek gerekir.
5. Çözümleme işlemi sonrası numuneler soğumaya bırakılır.
6. USS ile numune kaplarının temas yerleri yıkanarak 15 ml'lik polietilen tüplere aktarılır ve 15 ml tamamlanır.

7.4. Cihaz Parametreleri

AAS Grafit Fırın İşlem parametreleri aşağıdaki Tablo'da yer almaktadır.

"Hollow Catod Lamps" kadmiyum lambası kullanılır. Cihaz aşağıdaki parametrelere göre ayarlanır.

Dalga Boyu (nm)	Slit Aralık	Enerji	İşaret Tipi	Kalib. Tipi	Aspirasyon Süresi (s)	Lamba Akımı (mA)	Ölçüm Tipi	Tekrar Okuma	Okuma Zamanı (s)	Gaz Akımı
228.8	0.7	100	AA-BG	Linear	4	210	Peak Area	2	4	Hava / Argon

Hava subapı basınç 40-100 psi (2.8-7.0 kg/cm²) oluncaya kadar açılır.Argon tüpü açılır ve basıncı 80-100 psi (6-7 kg/cm²)'ye ayarlanır.

1. Cihaz talimatnamesinde belirtilen şartlar girilir; referans standart çözeltilerin her birinden belli oranlarda 20 mL'yi tamamlayacak şekilde 110 °C'ye 5 s'de çıkarılıp 15 s süreyle çözücünün kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve ardından 130 °C'ye 10 s'de çıkarılıp, 20 s süreyle çözücü buharının homojen bir ısıtma-kurutma sistemiyle ortamdaki uzaklaştırılması sağlanır. Külleştirme ısı 550 °C'de çıkış süresi (Ramp Time) 15 s tutma süresi (Hold Time) 30 s olacak şekilde, atomizasyon ısı da 1450 °C'de çıkış süresi (Ramp Time) 0 s tutma süresi (Hold Time) 4 s'ye ayarlanır. 2450 °C'de temizleme işlemi gerçekleştirilir.
2. Kör çözeltiler ile cihazın absorbanz zemini sıfırlanır. Kör ve çalışma standardı (2 mg/L) ile külleştirme ve atomizasyon ısıları uygun absorbanzda pik verinceye kadar deneme yapılır.
3. Isılar ayarlandıktan sonra, kalibrasyon eğrisi çizdirilir. Güven aralığı 0.99500-1.00000 ile kalibrasyon kat sayısının % 99.5 arasında olması sağlanır.
4. Daha sonra ara stok standart ile hazırlanan çalışma standardı otomatik kalibrasyonda, kurutma-küllendirme-atomizasyon işlemleri yapılarak matriks düzenleyici çözeltilerden 5 µl standartlara ilave edilir ve Kalibrasyon Eğrisi çizdirilir. Sonra referans standart çözeltilerin güven aralığı 0.99500-1.00000 arasında en yüksek absorbanzı veren kalibrasyon eğri değerleri alınır. Kalibrasyon lineeriteye uyumlu olmayan çözeltiler okuyucusu (Ignore) devre dışı bırakılır veya aynı nolu çözeltiler tekrar okutulur. Örneklere Matriks düzenleyici çözeltilerden otomatik pipetle 5 µl örnekler ilave edilir ve yukarıdaki şartlara uyum sağlayarak kurutma, küllendirme ve atomizasyon işlemine tabi tutulur. Çözümlemiş doku örnekleri 15 ml'ye tamamlanır. Numunelerin her bir grup analiz sonuçlarının değerlendirilmesi için AAS'ye sırasıyla Çalışma standardı, USS, tanık numune, sertifikalı referans materyal enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir. Numune spektroskopisi ile standart spektroskopisi ve spike/referans materyal karşılaştırılır ve kontrol edilir. Pozitif bulunan sonuçlar ise AAS'de tekrar okutularak teyit edilir.

Verilerin Kayıt edilmesi

Sonuçlar cihaza kaydedilirken aşağıdaki dosyalama sistemi kullanılır;

Dataları kaydetmek için: C:\Data \ Analiz yılı \ Grup adı \ Matriks \ (Numuneler, Performans, , Standart, Raporlar) ;dosyaları açılır.

Deneme çalışmaları için: C:\Data \ Grup adı \ Analiz yılı \ Deneme; Burada açılan deneme dosyasına analize başlamadan önce analizde kullanılan herhangi bir ekipman, cihazın veya çözeltinin çalışıp çalışmadığının kontrolü yapılmak üzere yapılan analizler kaydedilir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Bilgisayara bağlı cihazın otomatik hesaplamasıyla monitöre yansıyan ön değerlerinden çıktı alınır ve elde edilen veriler formül kullanılarak hesaplanır.

Hesaplama: $C_E = C \times (V / W)$

W= Alınan test örneğinin tartım miktarı (g)

V= Test örneğinin tamamlanan hacmi (mL)

C= Ölçülen elementin son konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)

C_E = Test örneğindeki elementin son konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) / ($\mu\text{g}/\text{L} = \text{ppb}$)

NOT: 1.AOAC 999.10 Metodunun Laboratuvar şartları altında valide edilerek GF-AAS ile kadmiyum tayini yapılır.

2.Analizi yapılan örnek türüne göre sonuçlar $\leq 0,05-01 \text{ mg/L}$ Türk Gıda Kodeksi Tebliği 2008/26 referans değerinin altında ise negatif, yüksek ise pozitif olarak değerlendirilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR/ KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon(2011). Pendik Veri Kontrol Prosedürü
2. Anon. (2004). Kullanma Talimatı. Berghof Products + Instruments GmbH EN 13804.
3. Anon (2008). Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ No.: 2008/26
4. Anon (2000). Ağır Metal (Cd, Pb) Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği 2008/11. Anon (2000).
5. Rose M, et al. (2001) Perkin-Elmer International Instruments Chemical Analytical Methods For FL-AAS / GF-AAS İn Handbook Laboratory . Journal of Analytical F-AAS/ GF-AAS 16 9); p1101-1106.
6. Rose M, (2004) et.al.(2004).European Journal of Clinical Nutrition 58, 343–349. AOAC Official Method 999.10. Lead, Cadmium, Zinc, Copper and Iron in Foods Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave Digestion

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan güncellemeler aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

HAYVANSAL DOKU ÖRNEKLERİNDE KADMIYUM ELEMENTİNİN AAS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu, hayvansal doku örneklerinde kadmiyum düzeylerinin GF-AAS tekniği ile belirlenmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, hayvansal doku örneklerinde kadmiyum elementinin kantitatif belirlenmesini amaçlar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

GF-AAS: Grafit-atomic absorption spectroscopy,

AAS : Atomic absorption spectroscopy

Cd : Kadmiyum

EDL : Electrodeless Discharge Lamps

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Test metodu iki aşamadan oluşur;

1. Numunenin mikrodalga yakma yöntemi ile yakılması
2. GF-AAS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. Santrifüj
2. AAS
3. Otomatik pipet ve uçları
4. Tüp karıştırıcı (Vortex)
5. Cam tüp ve tüp sporları (portekü)
6. Standart laboratuvar cam malzemesi (balon joje, beher, pipet)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Ultra saf su (18 M Ω)
2. Nitrik Asit (HNO₃, Analitik saflıkta)
3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂, Analitik saflıkta)
4. Kadmiyum standardı (1000 μ g/mL)
5. Amonyum Hidrojen Fosfat (NH₄)H₂PO₄, M=115,03 g/mol'dan % 1'lik
6. Magnezyum Nitrat (Mg (NO₃)₂ 6H₂O, M=256,41 g/mol'dan % 1'lik)

7.3. Numune Analizi

1. Laboratuvara ulaştırılan numuneler analize alınincaya kadar derin dondurucuda (-15,-20°C) muhafaza edilir.
2. Analiz için gelen dokular kesilir, balıkla çalışılırken sindirim organları ile kasların bulaşmasını önlemek için karın boşluğu duvarına zarar vermemeye dikkat edilmelidir. Sadece kaslı kısım analizlerde kullanılır.

3. Sardalya, hamsi gibi bazı balık türlerinin küçükleri gibi kılçıkları ve derisi ile yenilen balıkların tümü analizlerde kullanılır.
4. Alınan örnekler öncelikle etüvde 110-130 °C'de kuru madde bazında %99,9 oranını tanımlayan şekilde (sabit tartım ağırlığına gelene kadar) suyu uçurulur ve kurutma işlemi gerçekleştirilir.
5. Daha sonra farklı numuneler için uygun yakma programına göre 0.5 g'lık doku örnekleri dijital terazide tartılır.
6. Mikrodalga fırının numune kaplarına (Vassell) konularak ve üzerine 6 mL nitrik asit (% 65 HNO₃) + 3 mL Hidrojen Peroksit (% 30 H₂O₂) ilave edilir.
7. Aşağıda gösterilen üç basamakta ısı, güç ve süre programı uygulanır.

Basamaklar	Isı=(Tem. °C)	Güç=(Power W)	Zaman= (Time min)
1. Basamak	130	% 80	8
2. Basamak	155	% 80	5
3. Basamak	170	% 80	12

* 10 numune için bu program uygulanır, her eksik numune için güç % 10 azaltılır (6).

8. Çözümleme işlemi sonrası numuneler soğumaya bırakılır ve 15 ml'lik polietilen tüplere aktarılır.
9. Sistematik hatalara izin vermemek için sertifikalı bir referans materyal veya miktarını bildiğimiz standart çözeltiyi örnek partiye dahil etmek gerekir. Çözümleme işlemi sonrası numuneler soğumaya bırakılır ve 15 ml'lik polietilen tüplere aktarılır, USS ile numune kaplarının temas yerleri yıkanarak ve sonra AAS'de okutulur.

7.4. Cihaz Parametreleri

1. EDL kadmiyum lambası kullanılır. Cihaz aşağıdaki parametrelere göre ayarlanır.

Dalga Boyu (nm)	Slit Aralığı	Enerji	İşaret Tipi	Kalibrasyon Tipi	Aspirasyon Süresi (s)	Lamba Akımı (mA)	Ölçüm Tipi	Tekrar Okuma	Okuma Zamanı (s)	Gaz Akımı
228,8	0.7	100	AA-BG	Linear	4	210	Peak Area	2	4	Hava / Argon

2. Argon tüpü açılır ve basıncı 80-100 psi (6-7 kg/cm²)'ye ayarlanır.
3. Hava supabı basıncı 40-100 psi (2.8-7.0 kg/cm²) ayarlanır.

4. Cihaz talimatnamesinde belirtilen şartlar girilir; referans standart çözeltilerin her birinden belli oranlarda 20 mL'yi tamamlayacak şekilde 110 °C'ye 5 s'de çıkarılıp 15 s süreyle çözücünün kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve ardından 130 °C'ye 10 s'de çıkarılıp, 20 s süreyle çözücü buharının homojen bir ısıtma-kurutma sistemiyle ortamdan uzaklaştırılması sağlanır.
5. Külleştirme ısı 550 °C'de çıkış süresi (Ramp Time) 15 s tutma süresi (Hold Time) 30 s olacak şekilde, atomizasyon ısı da 1450 °C'de çıkış süresi (Ramp Time) 0 s tutuş süresi (Hold Time) 4 s'ye ayarlanır. 2450 °C'de temizleme işlemi gerçekleştirilir.
6. Kör çözeltiler ile cihazın absorpsiyon zemini sıfırlanır. Kör ve çalışma standardı 2 mg/L (2 ppm) ile külleştirme ve atomizasyon ısıları uygun absorpsiyonda pik verinceye kadar deneme yapılır.
7. Isılar ayarlandıktan sonra, kalibrasyon eğrisi çizdirilir. Güven aralığı 0.99500-1.00000 ile kalibrasyon kat sayısının % 99.5 arasında olması sağlanır.
8. Daha sonra ara stok standart ile hazırlanan çalışma standardı otomatik kalibrasyonda, kurutma-külleştirme-atomizasyon işlemleri yapılarak matris düzenleyici çözeltilerden 5 µl standartlara ilave edilir ve Lineer Curve çizdirilir. Sonra referans standart çözeltilerin güven aralığı 0.99500-1.00000 arasında en yüksek absorpsiyon veren kalibrasyon eğri değerleri alınır. Kalibrasyon lineeriteye uyumlu olmayan çözeltiler okuyucusu (ignore) devre dışı bırakılır veya aynı nolu çözeltiler tekrar okutulur.
9. Örnekler Matris düzenleyici çözeltilerden otomatik pipetle 5 µl örnekler ilave edilir ve yukarıdaki şartlara uyum sağlayarak kurutma, külleştirme ve atomizasyon işlemine tabi tutulur.
10. Çözümlemiş doku örnekleri 15 ml'ye tamamlanır. Numunelerin her bir grup analiz sonuçlarının değerlendirilmesi için AAS'ye sırasıyla standart, USS, tanık numune, sertifikalı referans materyal enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir. Numune spektroskopisi ile standart spektroskopisi ve spike/referans materyal karşılaştırılır ve kontrol edilir. Pozitif bulunan sonuçlar ise AAS'de tekrar okutulmuş olarak teyit edilir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

1. Bilgisayara bağlı cihazın otomatik hesaplamasıyla monitöre yansıyan değerler çıktı (printer) olarak alınır.
2. Elde edilen veriler örnek seyreltme kat sayısı ile çarpılarak hesaplanır. Cihazda Okunan Değer (COD x Seyreltme katsayısı= Sonuç)
3. Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik kalite kontrol grafiği hazırlanmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. N.M.L.K. (1996). Nordic Committee on Food Analyssis, Validation of Chemical Analytical Methods Procedure 4. Page: 21 (24) Ver.1.Feb.1997.
2. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği 2011/28157 ve Ağır Metal (Cd, Pb) Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği 2011/31.
3. Anon (2000). Perkin-Elmer International Instruments Chemical Analytical Methods For FL-AAS / GF-AAS İn Handbook Laboratory.
4. Rose M, Knaggs M, Owen L, Baxter M (2001). Journal of Analytical F-AAS/ GF-AAS 16 (9); p1101-1106.
5. Rose M, Knaggs M, Owen L, Baxter M (2004). European Journal of Clinical Nutrition 58, 343-349.
6. Anon (2004). MWS-2. Temassız Sıcaklık Ölçümüne Sahip Mikrodalga Parçalama Sistemi. V.3.0 Kullanma Talimatı. Berghof Products + Instruments GmbH
7. TS EN 13804 (Mart 2004). Gıdalar-Eser Elementlerin Tayini-Performans Ölçütleri, Genel Hususlar ve Numune Hazırlama.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

HAYVANSAL DOKU ÖRNEKLERİNDE KURŞUN ELEMENTİNİN AAS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu, hayvansal doku örneklerinde kurşun düzeylerinin GF-AAS tekniği ile belirlenmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, hayvansal doku örneklerinde kurşun elementinin kantitatif belirlenmesini amaçlar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

GF-AAS: Grafit-atomic absorption spectroscopy,

AAS : atomic absorption spectroscopy

Pb : Kurşun

HCL : Hollow Cathode Lamp

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Test metodu iki aşamadan oluşur;

1. Numunenin mikrodalga yakma yöntemi ile yakılması
2. GF-AAS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. Santrifüj
2. AAS
3. Otomatik pipet ve uçları
4. Tüp karıştırıcı (Vortex)
5. Cam tüp ve tüp sporları (portekü)
6. Standart laboratuvar cam malzemesi (balon joje, beher, pipet)

7.2. Kullanılan Kimyasallar

1. Ultra saf su (18 MΩ)
2. Nitrik Asit (HNO₃, Analitik saflıkta)
3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂, Analitik saflıkta)
4. Kurşun standardı (1000µg/mL)
5. Amonyum Hidrojen Fosfat (NH₄)H₂PO₄, M=115,03 g/mol'dan % 1'lik)
6. Magnezyum Nitrat (Mg (NO₃)₂ 6H₂O, M=256,41 g/mol'dan % 1'lik)

7.3. Numune Analizi

1. Laboratuara ulaştırılan numuneler analize alınıncaya kadar derin dondurucuda (-15,-20°C) muhafaza edilir.
2. Analiz için gelen dokular kesilir, balıkla çalışılırken sindirim organları ile kasların bulaşmasını önlemek için karın boşluğu duvarına zarar vermemeye dikkat edilmelidir. Sadece kaslı kısım analizlerde kullanılır.

3. Sardalya, hamsi gibi bazı balık türlerinin küçükleri gibi kılçıkları ve derisi ile yenilen balıkların tümü analizlerde kullanılır.
4. Alınan örnekler öncelikle etüvde 110-130 °C'de kuru madde bazında %99,9 oranını tanımlayan şekilde (sabit tartım ağırlığına gelene kadar) suyu uçurulur ve kurutma işlemi gerçekleştirilir.
5. Daha sonra farklı numuneler için uygun yakma programına göre 0.5 g'lık doku örnekleri dijital terazide tartılır.
6. Mikrodalga fırının numune kaplarına (Vassell) konularak ve üzerine 6 mL nitrik asit (% 65 HNO₃) + 3 mL Hidrojen Peroksit (% 30 H₂O₂) ilave edilir.
7. Aşağıda gösterilen üç basamakta ısı, güç ve süre programı uygulanır.

Basamaklar	Isı=(Tem. °C)	Güç=(Power W)	Zaman= (Time min)
1. Basamak	130	% 80	8
2. Basamak	155	% 80	5
3. Basamak	170	% 80	12

* 10 numune için bu program uygulanır, her eksik numune için güç % 10 azaltılır (6).

8. Çözümleme işlemi sonrası numuneler soğumaya bırakılır ve 15 ml'lik polietilen tüplere aktarılır.
9. Sistematik hatalara izin vermemek için sertifikalı bir referans materyal veya miktarını bildiğimiz standart çözeltiyi örnek partiye dahil etmek gerekir. Çözümleme işlemi sonrası numuneler soğumaya bırakılır ve 15 ml'lik polietilen tüplere aktarılır, USS ile numune kaplarının temas yerleri yıkanarak ve sonra AAS'de okutulur.

7.4. Cihaz Parametreleri:

1. "Hollow Cathode" kurşun lambası kullanılır. Cihaz aşağıdaki parametrelere göre ayarlanır.

Dalga Boyu (nm)	Slit Aralığı	Enerji	İşaret Tipi	Kalibrasyon Tipi	Aspirasyon Süresi (s)	Lamba Akımı (mA)	Ölçüm Tipi	Tekrar Okuma	Okuma Zamanı (s)	Gaz Akımı
283,3	0.7	100	AA-BG	Linear	4	10	Peak Area	2	2	Hava / Argon

2. Argon tüpü açılır ve basıncı 80-100 psi (6-7 kg/cm²)'ye ayarlanır.
3. Hava supabı basınç 40-100 psi (2.8-7.0 kg/cm²) ayarlanır.
4. Asetilen tüpü açılır ve basıncı 14 psi (0.9 Bar) ayarlanır.

5. Cihaz talimatnamesinde belirtilen şartlar girilir; referans standart çözeltilerin her birinden belli oranlarda 20 µL'yi tamamlayacak şekilde 110 °C'ye 5 s' de çıkarılıp 15 s süreyle çözücünün kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve ardından 130 °C'ye 10 s'de çıkarılıp, 20 s süreyle çözücü buharının homojen bir ısıtma-kurutma sistemiyle ortamdaki uzaklaştırılması sağlanır.
6. Külleştirme ısı 550 °C'de çıkış süresi (Ramp Time) 15 s tutma süresi (Hold Time) 30 s olacak şekilde, atomizasyon ısı da 1450 °C'de çıkış süresi (Ramp Time) 0 s tutma süresi (Hold Time) 4 s'ye ayarlanır. 2450 °C'de temizleme işlemi gerçekleştirilir.
7. Kör çözelti ile cihazın absorbanans zemini sıfırlanır. Kör ve çalışma standardı (10 µg/L) ile külleştirme ve atomizasyon ısıları uygun absorbanansda pik verinceye kadar deneme yapılır.
8. Isılar ayarlandıktan sonra, kalibrasyon eğrisi çizdirilir. Güven aralığı 0.99500-1.00000 ile kalibrasyon kat sayısının % 99.5 arasında olması sağlanır.
9. Daha sonra ara stok standart ile hazırlanan çalışma standardı otomatik kalibrasyonda, kurutma-küllendirme-atomizasyon işlemleri yapılarak matriks düzenleyici çözeltiden 5 µl standartlara ilave edilir ve Lineer Curve çizdirilir. Sonra referans standart çözeltilerin güven aralığı 0.99500-1.00000 arasında en yüksek absorbanansı veren kalibrasyon eğri değerleri alınır. Kalibrasyon lineeriteye uyumlu olmayan çözelti okuyucusu (ignore) devre dışı bırakılır veya aynı nolu çözelti tekrar okutulur.
10. Örneklere Matriks düzenleyici çözeltiden otomatik pipetle 5 µL örneklere ilave edilir ve yukarıdaki şartlara uyum sağlayarak kurutma, küllendirme ve atomizasyon işlemine tabi tutulur.
11. Çözümlemiş doku örnekleri 15 mL'ye tamamlanır. Numunelerin her bir grup analiz sonuçlarının değerlendirilmesi için AAS' ye sırasıyla standart, USS, tanık numune, sertifikalı referans materyal enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir. Numune spektroskopisi ile standart spektroskopisi ve spike/referans materyal karşılaştırılır ve kontrol edilir. Pozitif bulunan sonuçlar ise AAS' de tekrar okutulularak teyit edilir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

1. Bilgisayara bağlı cihazın otomatik hesaplamasıyla monitöre yansıyan değerleri çıktı (printer) olarak alınır.
2. Elde edilen veriler örnek seyreltme kat sayısı ile çarpılarak hesaplanır. Cihazda Okunan Değer (COD x Seyreltme katsayısı= Sonuç)
3. Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik kalite kontrol grafiği hazırlanmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. N.M.L.K. (1996). Nordic Committee on Food Analysis, Validation of Chemical Analytical Methods Procedure 4. Page: 21 (24) Ver.1.Feb.1997.
2. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği 2011/28157 ve Ağır Metal (Cd, Pb) Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği 2011/31.
3. Anon (2000). Perkin-Elmer International Instruments Chemical Analytical Methods For FL-AAS / GF-AAS İn Handbook Laboratory.
4. Rose M, Knaggs M, Owen L, Baxter M (2001). Journal of Analytical F-AAS/ GF-AAS 16 (9); p1101-1106.
5. Rose M, Knaggs M, Owen L, Baxter M (2004). European Journal of Clinical Nutrition 58, 343-349.
6. Anon (2004). MWS-2. Temassız Sıcaklık Ölçümüne Sahip Mikrodalga Parçalama Sistemi. V.3.0 Kullanma Talimatı. Berghof Products + Instruments GmbH
7. TS EN 13804 (Mart 2004). Gıdalar-Eser Elementlerin Tayini-Performans Ölçütleri, Genel Hususlar ve Numune Hazırlama.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KAN SERUMUNDA VE DOKULARDA BAKIR ELEMENTİNİN AAS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu, kan serumlarında ve dokularda bakır düzeylerinin F-AAS tekniği ile belirlenmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, kan serumlarında ve dokularda bakır düzeylerinin kantitatif belirlenmesini amaçlar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

F-AAS: Flame-atomic absorption spectroscopy,

AAS : Atomic absorption spectroscopy

Cu : Bakır

HCL : Hollow Cathode Lamp

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

F-AAS, prosedüründe spesimenlerin yüksek sıcaklıkta ısıtılıp iyonik bakırın (Cu), atomik bakır buharına dönüştürülmesiyle karakteristik dalga boyu olan 324.8 nm bakır tarafından absorblanan ışık miktarının kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanır

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. Santrifüj
2. F-AAS
3. Otomatik pipet ve uçları
4. Tüp karıştırıcı (Vortex)
5. Cam tüp ve tüp sporları (portekü)
6. Standart laboratuvar cam malzemesi (balon joje, beher, pipet)

7.2. Kullanılan Kimyasallar

1. Ultra saf su (18 MΩ)
2. Nitrik Asit (HNO₃, Analitik saflıkta)
3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂, Analitik saflıkta)
4. Bakır standardı (1000µg/mL)

7.3. Numune Analizi

1. Laboratuara ulaştırılan numuneler analize alınincaya kadar derin dondurucuda (-15,-20°C) muhafaza edilir.
2. Analiz için gelen dokular kesilir, balıkla çalışılırken sindirim organları ile kasların bulaşmasını önlemek için karın boşluğu duvarına zarar vermemeye dikkat edilmelidir. Sadece kaslı kısım analizlerde kullanılır.
3. Sardalya, hamsi gibi bazı balık türlerinin küçükleri gibi kılçıkları ve derisi ile yenilen balıkların tümü analizlerde kullanılır.

4. Alınan örnekler öncelikle etüvde 110-130 °C'de kuru madde bazında %99,9 oranını tanımlayan şekilde (sabit tartım ağırlığına gelene kadar) suyu uçurulur ve kurutma işlemi gerçekleştirilir.
5. Daha sonra farklı numuneler için uygun yakma programına göre 0.5 g'lık doku örnekleri dijital terazide tartılır.
6. Mikrodalga fırının numune kaplarına (Vassell) konularak ve üzerine 6 mL nitrik asit (% 65 HNO₃) + 3 mL Hidrojen Peroksit (% 30 H₂O₂) ilave edilir.
7. Aşağıda gösterilen üç basamakta ısı, güç ve süre programı uygulanır.

Basamaklar	Isı=(Tem. °C)	Güç=(Power W)	Zaman= (Time min)
1. Basamak	130	% 80	8
2. Basamak	155	% 80	5
3. Basamak	170	% 80	12

* 10 numune için bu program uygulanır, her eksik numune için güç % 10 azaltılır (6).

8. Çözümleme işlemi sonrası numuneler soğumaya bırakılır ve 15 ml'lik polietilen tüplere aktarılır.
9. Serum bakırının saptanması için serum eşit miktarda ultra saf su ile sulandırılır (1/4 oranında sulandırma)

7.4. Cihaz Parametreleri:

1. "Hollow Cathode" bakır lambası kullanılır. Lamba ışık yoluna ve selektörü 2'ye, lamba akım gücü 30 mA'e, lamba ışık yolunu (Slit Width) 0.7'ye, enerjiyi (Evergy) 100'e, aspirasyon süresi 4 saniyeye, dalga boyunu (Wavelength) 324.8 nm'ye, işaret tipi (Type) AA'ya, okuma süresini (Read Time) 5'e, ölçüm süresini (Time average)'ye, alev tipi (Flame Type) : Hava/Asetilen'e ayarlanır.
2. Hava supabı basınç 40-100 psi (2.8-7.0 kg/cm²) ayarlanır.
3. Asetilen tüpü açılır ve basıncı 14 psi (0.9 Bar) ayarlanır.
4. Argon tüpü açılır ve basıncı 50-100 psi (5.0 kg/cm²) ayarlanır.
5. Cihaz talimatnamesinde belirlendiği gibi şartlar cihaza kaydedilir. Alev yakılarak alevin kesiksiz kendine özgü yanışı kontrol edilir. Analizlere başlamadan önce 5-10 dakika ısıtılır.
6. Kör çözelti ile cihazın 0 kontrolü yapılır (cihaz absorbans zemini sıfırlanır).
7. Hazırlanan çalışma standartları sıra ile verilerek kalibrasyon eğrisi çizdirilir ve güven aralığının 0.99500-1.00000 ile kalibrasyon kat sayısı (C.V.) % 99.5 arasında olması sağlanır.
8. Sulandırılmış serum örnekleri (1/4 oranında) cihaza verilerek okutulur. Diğer örneklerde okunan değer standart değer üzerinde olursa seyreltmenin artırılması gerekebilir.
9. Okunan 5-10 örnekten sonra kör ve standartlarla cihazın kontrolü yapılır ve daha sonra örneklerin okunmasına devam edilir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

1. Bilgisayara bağlı cihazın otomatik hesaplamasıyla monitöre yansıyan değerleri çıktı (printer) olarak alınır.
2. Elde edilen veriler örnek seyreltme kat sayısı ile çarpılarak hesaplanır. Cihazda Okunan Değer (COD x Seyreltme katsayısı= Sonuç)
3. Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik kalite kontrol grafiği hazırlanmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Makino, T. and Takahara, (1981). Direct Determination of Plasma Copper and Zinc in Infants by Atomic absorption with Discrete Nebulization. Clin. Chem. 27, 1445
2. Taga, Y., Aslan, D., Güner, G., Kutay, F.Z. (1998). Tıbbi laboratuvarlarda standardizasyon ve Kalite Yönetimi el kitabı. Mart matbacılık hizmetleri A.Ş. ANKARA.
3. Anon., (2000). Perkin-Elmer, Analytical methods for atomic absorption Spectroscopy. Laboratuvar el kitabı.
4. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği.: 2011/28157 ve Ağır Metal (Cd, Pb) Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği 2011/31.
5. Rose M, Knaggs M, Owen L, Baxter M (2001). Journal of Analytical F-AAS/ GF-AAS 16 (9); p1101-1106.
6. Anon (2004). MWS-2. Temassız Sıcaklık Ölçümüne Sahip Mikrodalga Parçalama Sistemi. V.3.0 Kullanma Talimatı. Berghof Products + Instruments GmbH
7. TS EN 13804 (Mart 2004). Gıdalar-Eser Elementlerin Tayini-Performans Ölçütleri, Genel Hususlar ve Numune Hazırlama.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KAN SERUMUNDA VE DOKULARDA ÇİNKO ELEMENTİNİN AAS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu, kan serumlarında ve dokularda çinko düzeylerinin F-AAS tekniği ile belirlenmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, kan serumlarında ve dokularda çinko düzeylerinin kantitatif belirlenmesini amaçlar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

F-AAS: Flame-atomic absorption spectroscopy,

AAS : Atomic absorption spectroscopy

Zn : Çinko

HCL : Hollow Cathode Lamp

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

F-AAS, prosedüründe spesimenlerin yüksek sıcaklıkta ısıtılıp iyonik çinkonun (Zn), atomik çinko buharına dönüştürülmesiyle karakteristik dalga boyu olan 213.9 nm çinko tarafından absorblanan ışık miktarının kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanır

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. Santrifüj
2. F-AAS
3. Otomatik pipet ve uçları
4. Tüp karıştırıcı (Vortex)
5. Cam tüp ve tüp sporları (portekü)
6. Standart laboratuvar cam malzemesi (balon joje, beher, pipet)

7.2. Kullanılan Kimyasallar

1. Ultra saf su (18 MΩ)
2. Nitrik Asit (HNO₃, Analitik saflıkta)
3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂, Analitik saflıkta)
4. Çinko standardı (1000µg/mL)

7.3. Numune Analizi

1. Laboratuara ulaştırılan numuneler analize alınıncaya kadar derin dondurucuda (-15,-20°C) muhafaza edilir.
2. Analiz için gelen dokular kesilir, balıkla çalışılırken sindirim organları ile kasların bulaşmasını önlemek için karın boşluğu duvarına zarar vermemeye dikkat edilmelidir. Sadece kashi kısım analizlerde kullanılır.
3. Sardalya, hamsi gibi bazı balık türlerinin küçükleri gibi kılçıkları ve derisi ile yenilen balıkların tümü analizlerde kullanılır.

4. Alınan örnekler öncelikle etüvde 110-130 °C'de kuru madde bazında %99,9 oranını tanımlayan şekilde (sabit tartım ağırlığına gelene kadar) suyu uçurulur ve kurutma işlemi gerçekleştirilir.
5. Daha sonra farklı numuneler için uygun yakma programına göre 0.5 g'lık doku örnekleri dijital terazide tartılır.
6. Mikrodalga fırının numune kaplarına (Vassell) konularak ve üzerine 6 mL nitrik asit (% 65 HNO₃) + 3 mL Hidrojen Peroksit (% 30 H₂O₂) ilave edilir.
7. Aşağıda gösterilen üç basamakta ısı, güç ve süre programı uygulanır.

Basamaklar	Isı=(Tem. °C)	Güç=(Power W)	Zaman= (Time min)
1. Basamak	130	% 80	8
2. Basamak	155	% 80	5
3. Basamak	170	% 80	12

* 10 numune için bu program uygulanır, her eksik numune için güç % 10 azaltılır (3).

8. Çözümleme işlemi sonrası numuneler soğumaya bırakılır ve 15 ml'lik polietilen tüplere aktarılır.
9. Serum çinkosunun saptanması için serum eşit miktarda ultra saf su ile sulandırılır (1/4 oranında sulandırma)

7.4. Cihaz Parametreleri:

1. "Hollow Cathode" çinko lambası kullanılır. Lamba ışık yoluna ve selektörü 3'e, lamba akım gücü 20 mA'e, lamba ışık yolunu (Slit Width) 0.7'ye, enerjiyi (Evergy) 100'e, aspirasyon süresi 4 saniyeye, dalga boyunu (Wavelength) 324.8 nm'ye, işaret tipi (Type) AA'ya, okuma süresini (Read Time) 5'e, ölçüm süresini (Time average)'ye, alev tipi (Flame Type) : Hava/Asetilen'e ayarlanır.
2. Hava supabı basınç 40-100 psi (2.8-7.0 kg/cm²) ayarlanır.
3. Asetilen tüpü açılır ve basıncı 14 psi (0.9 Bar) ayarlanır.
4. Argon tüpü açılır ve basıncı 50-100 psi (5.0 kg/cm²) ayarlanır.
5. Cihaz talimatnamesinde belirlendiği gibi şartlar cihaza kaydedilir. Alev yakılarak alevin kesiksiz kendine özgü yanışı kontrol edilir. Analizlere başlamadan önce 5-10 dakika ısıtılır.
6. Kör çözelti ile cihazın 0 kontrolü yapılır (cihaz absorbans zemini sıfırlanır).
7. Hazırlanan çalışma standartları sıra ile verilerek kalibrasyon eğrisi çizdirilir ve güven aralığının 0.99500-1.00000 ile kalibrasyon kat sayısı (C.V.) % 99.5 arasında olması sağlanır.

8. Sulandırılmış serum örnekleri (1/4 oranında) cihaza verilerek okutulur. Diğer örneklerde okunan değer standart değer üzerinde olursa seyreltmenin arttırılması gerekebilir.
9. Okunan 5-10 örnekten sonra kör ve standartlarla cihazın kontrolü yapılır ve daha sonra örneklerin okunmasına devam edilir.

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamaların Yapılması

1. Bilgisayara bağlı cihazın otomatik hesaplamasıyla monitöre yansıyan değerleri çıktı (printer) olarak alınır.
2. Elde edilen veriler örnek seyreltme kat sayısı ile çarpılarak hesaplanır. Cihazda Okunan Değer (COD x Seyreltme katsayısı= Sonuç)
3. Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik kalite kontrol grafiği hazırlanmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Makino, T. and Takahara, (1981). Direct Determination of Plasma Copper and Zinc in Infants by Atomic absorption with Discrete Nebulization. Clin. Chem. 27, 1445.
2. Tağa, Y., Aslan, D., Güner, G., Kutay, F.Z. (1998). Tıbbi laboratuvarlarda standardizasyon ve Kalite Yönetimi el kitabı. Mart matbacılık hizmetleri A.Ş. ANKARA.
3. Anon., (2000). Perkin-Elmer, Analytical methods for atomic absorption Spectroscopy. Laboratuvar el kitabı.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KAN SERUMUNDA VE DOKULARDA DEMİR ELEMENTİNİN AAS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu, kan serumlarında ve dokularda demir düzeylerinin F-AAS tekniği ile belirlenmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, kan serumlarında ve dokularda demir düzeylerinin kantitatif belirlenmesini amaçlar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

F-AAS: Flame-atomic absorption spectroscopy,

AAS : atomic absorption spectroscopy

Fe : Demir

HCL : Hollow Cathode Lamp

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

F-AAS, prosedüründe spesimenlerin yüksek sıcaklıkta ısıtılıp iyonik Demirin (Fe), atomik demir buharına dönüştürülmesiyle karakteristik dalga boyu olan 248,3 nm demir tarafından absorblanan ışık miktarının kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanır

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. Santrifüj
2. F-AAS
3. Otomatik pipet ve uçları
4. Tüp karıştırıcı (Vortex)
5. Cam tüp ve tüp sporları (portekü)
6. Standart laboratuvar cam malzemesi (balon joje, beher, pipet)

7.2. Kullanılan Kimyasallar

1. Ultra saf su (18 MΩ)
2. Nitrik Asit (HNO₃, Analitik saflıkta)
3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂, Analitik saflıkta)
4. Demir standardı (1000µg/mL)

7.3. Numune Analizi

1. Laboratuara ulaştırılan numuneler analize alınıncaya kadar derin dondurucuda (-15,-20°C) muhafaza edilir.
2. Analiz için gelen dokular kesilir, balıkla çalışılırken sindirim organları ile kasların bulaşmasını önlemek için karın boşluğu duvarına zarar vermemeye dikkat edilmelidir. Sadece kaslı kısım analizlerde kullanılır.
3. Sardalya, hamsi gibi bazı balık türlerinin küçükleri gibi kılçıkları ve derisi ile yenilen balıkların tümü analizlerde kullanılır.

4. Alınan örnekler öncelikle etüvde 110-130 °C'de kuru madde bazında %99,9 oranını tanımlayan şekilde (sabit tartım ağırlığına gelene kadar) suyu uçurulur ve kurutma işlemi gerçekleştirilir.
5. Daha sonra farklı numuneler için uygun yakma programına göre 0.5 g'lık doku örnekleri dijital terazide tartılır.
6. Mikrodalga fırının numune kaplarına (Vassell) konularak ve üzerine 6 mL nitrik asit (% 65 HNO₃) + 3 mL Hidrojen Peroksit (% 30 H₂O₂) ilave edilir.
7. Aşağıda gösterilen üç basamakta ısı, güç ve süre programı uygulanır.

Basamaklar	Isı=(Tem. °C)	Güç=(Power W)	Zaman= (Time min)
1. Basamak	130	% 80	8
2. Basamak	155	% 80	5
3. Basamak	170	% 80	12

* 10 numune için bu program uygulanır, her eksik numune için güç % 10 azaltılır (6).

8. Çözümleme işlemi sonrası numuneler soğumaya bırakılır ve 15 ml'lik polietilen tüplere aktarılır.
9. Serum demirinin saptanması için serum eşit miktarda ultra saf su ile sulandırılır (1/4 oranında sulandırma)

7.4. Cihaz Parametreleri:

1. "Hollow Cathode" bakır lambası kullanılır. Lamba ışık yoluna ve selektörü 2'ye, lamba akım gücü 30 mA'e, lamba ışık yolunu (Slit Width) 0.7'ye, enerjiyi (Evergy) 100'e, aspirasyon süresi 4 saniyeye, dalga boyunu (Wavelength) 248,3 nm'ye, işaret tipi (Type) AA'ya, okuma süresini (Read Time) 6'ya, ölçüm süresini (Time average)'ye, alev tipi (Flame Type) : Hava/Asetilen'e ayarlanır.
2. Hava supabı basınç 40-100 psi (2.8-7.0 kg/cm²) ayarlanır.
3. Asetilen tüpü açılır ve basıncı 14 psi (0.9 Bar) ayarlanır.
4. Argon tüpü açılır ve basıncı 50-100 psi (5.0 kg/cm²) ayarlanır.
5. Cihaz talimatnamesinde belirlendiği gibi şartlar cihaza kaydedilir. Alev yakılarak alevin kesiksiz kendine özgü yanışı kontrol edilir. Analizlere başlamadan önce 5-10 dakika ısıtılır.
6. Kör çözelti ile cihazın 0 kontrolü yapılır (cihaz absorbands zemini sıfırlanır).
7. Hazırlanan çalışma standartları sıra ile verilerek kalibrasyon eğrisi çizdirilir ve güven aralığının 0.99500-1.00000 ile kalibrasyon kat sayısı (C.V.) % 99.5 arasında olması sağlanır.

8. Sulandırılmış serum örnekleri (1/4 oranında) cihaza verilerek okutulur. Diğer örneklerde okunan değer standart değer üzerinde olursa seyreltmenin arttırılması gerekebilir.
9. Okunan 5-10 örnekten sonra kör ve standartlarla cihazın kontrolü yapılır ve daha sonra örneklerin okunmasına devam edilir.

7.5. Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

1. Bilgisayara bağlı cihazın otomatik hesaplamasıyla monitöre yansıyan değerleri çıktı (printer) olarak alınır.
2. Elde edilen veriler örnek seyreltme kat sayısı ile çarpılarak hesaplanır. Cihazda Okunan Değer (COD x Seyreltme katsayısı= Sonuç)
3. Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik kalite kontrol grafiği hazırlanmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Tağa, Y., Aslan, D., Güner, G., Kutay, F.Z. (1998). Tıbbi laboratuvarlarda standardizasyon ve Kalite Yönetimi el kitabı. Mart matbacılık hizmetleri A.Ş. ANKARA.
2. Anon., (2000). Perkin-Elmer, Analytical methods for atomic absorption Spectroscopy. Laboratuvar el kitabı.
3. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği.: 2011/28157 ve Ağır Metal (Cd, Pb) Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği 2011/31.
4. Rose M, Knaggs M, Owen L, Baxter M (2001). Journal of Analytical F-AAS/ GF-AAS 16 (9); p1101-1106.
5. Anon (2004). MWS-2. Temassız Sıcaklık Ölçümüne Sahip Mikrodalga Parçalama Sistemi. V.3.0 Kullanma Talimatı. Berghof Products + Instruments GmbH
6. TS EN 13804 (Mart 2004). Gıdalar-Eser Elementlerin Tayini-Performans Ölçütleri, Genel Hususlar ve Numune Hazırlama.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

ZEHİRLEME ŞÜPHELİ MATERYALLERDE KARBAMAT GRUBU İNSEKTİSİDLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE KALİTATİF ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Zehirlenme şüphesi ile muayenesi istenen iç organ (karaciğer,böbrek), mide-barsak içeriği, yem, su ve zehirlenmeye neden olduğu düşünülen şüpheli maddelerde karbamat grubu insektisitlerin, tarama testi olan İTK (İnce Tabaka Kromatografi) ile kalitatif olarak tayin edilmesi amaçlanmaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, zehirlenme şüphesi ile gelen materyallerde karbamat grubu insektisidlerin kalitatif tespiti için uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılan kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/ TANIMLAR

İTK: İnce Tabaka Kromatografi

Na₂SO₄: Sodyum Sülfat

NaCl: Tuz

DBQC: 2,6 Dibromkinonklorimid

NaOH: Sodyum hidroksit

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot zehirlenme şüphesi ile gelen numunenin ekstrakte edilip, elde edilen ekstrakta karbamat grubu insektisitlerin varlığının İTK yöntemiyle kromojenik ayıraçlar kullanılarak kalitatif olarak tanımlanmasıdır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. Homojenizatör
2. Hassas terazi
3. Erlenmayer
4. Shaker
5. Cam ayırma hunisi (250-500 ml'lik)
6. Süzgeç kağıdı
7. Armudi balon (250 ml'lik)
8. Mezür (100 ml'lik)
9. Huni (15 cm çapında)
10. İTK plakaları
11. Developman tankı
12. Statif
13. Tüp ve sporu
14. Ultrasonik banyo
15. Benmari/ Rotari evaporatör
16. Otomatik pipet (20–200 µL)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Susuz Na₂SO₄
2. Asetonitril
3. %2 lik NaCl
4. Petrol eteri
5. Kloroform
6. n-Hexan
7. Aseton
8. Sikloheksan
9. 2,6 dibromkinonklorimid
10. 2-fenoksietanol
11. % 30'luk Hidrojen peroksit
12. NaOH
13. Karbaril Standart Çözeltisi
14. Silikajel 60 F₂₅₄ kaplanmış hazır alüminyum İTK plakaları.

Developman Çözeltisi: 70 ml n-hexan+30 ml aseton karışımı amber renkli şişelerde hazırlanır.

NaOH Çözeltisi: 1.5 N NaOH (100 ml 1.5 N NaOH için; 6 g NaOH tartılıp 100 ml metanolde çözdürülür.)

DQBC Ayırıcı: Sikloheksanda % 0.5'lik 2,6 dibromokinonklorimid hazırlanarak kullanılır.

7.3. Numune Analizi

1. Yem 12.5 g, iç organ vs. 25 g tartılarak homojenizatörde parçalanır.
2. Homojenize olan numune erlenmayere alınır, üzerine 75 ml asetonitril ilave edilerek yaklaşık 30 dakika shakerda çalkalanır.
3. Süzgeç kağıdından süzülür, süzütünün hepsi bir ayırma hunisine alınır ve üzerine 125 ml %2'lik NaCl ilave edilerek çalkalanır, 50 ml petrol eteri ilave edilerek tekrar çalkalanır. Faz oluşması için bir süre bekletilir. Alttaki faz erlenmayerde toplanır, ayırma hunisinde kalan kısım susuz Na₂SO₄ konmuş süzgeç kâğıdından geçirilerek bir armudi balon içine süzülür.
4. Ayrılan alt faz tekrar bir ayırma hunisine alınır üzerine 50 ml kloroform ilave edilerek çalkalanır, faz oluşması için bir süre beklenir ve alttaki faz susuz Na₂SO₄ konmuş süzgeç kâğıdından geçirilerek aynı armudi balon içinde fazlar birleştirilir. Evaporatörde vakum pompası ve ısı yardımıyla balon içeriği kuruyuncaya kadar buharlaştırılır.
5. Kurutulmuş olan ekstrakt 2 ml kloroform ilave edilerek ultrasonik banyosunda çözdürülerek tüpe alınır ve İTK plakasına uygulanır.

6. Karbaril standart çözeltisi numune uygulama noktasından 1-2 cm mesafede uygulanır.
7. Developman tankına developman solventinden (70 ml n-hexan+30 ml aseton) 5-10 ml dökülerek tankın kapağı kapatılıp bir süre beklendikten sonra numune ve standart uygulanmış İTK plakası developman tankına daldırılarak solventin plaka üzerinde ilerlemesi beklenir. İlerlemesi tamamlanan (plakanın ¾ kadar) plaka developman tankından çıkartılıp oda ısısında kurutulur.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Oda ısısında kurutulmuş İTK plakasına NaOH ayırıcı püskürtülür ve oda ısısında kurutulduktan sonra DQBC ayırıcı ile sprey tarzında boyanır. Sarı zemin üzerinde gözlenen mavi lekeler karbamat grubu insektisit yönünden şüpheli pozitif olarak değerlendirilir. Sarı zemin üzerinde mavi lekelerin oluşmaması negatif olarak değerlendirilir.

8. KAYNAKLAR/İLGİLİ DOKÜMANLAR/EKLER

1. Mills P.A. (1959): Detection and semiquantitative estimation of chlorinated organic pesticide residues in food by paper chromatography. J.A.O.A.C. 42:734-740.
2. Güley M., Karakaya AE. Türkiye'de kullanılan Karbamat İsektisitlerin, Analitik Toksikoloji Yönünden İncelenmesi. Fac. Pharm. Sayfa:102-125. Ankara, 1976.
3. Ceylan, S. (1980): Organik fosforlu, karbamat ve organik klorlu pestisitlerin ince tabaka kromatografisinde kromojenik ayıraçlarla sistematik analizi. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 27: 440-466.

9.REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

ZEHİRLEME ŞÜPHELİ METARYALLERDE ORGANİK FOSFORLU İNSEKTİSİTLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE KALİTATİF ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu, zehirlenme şüphesi ile muayenesi istenen iç organ (karaciğer,böbrek), mide-barsak içeriği, yem, su ve zehirlenmeye neden olduğu düşünülen şüpheli maddelerde organik fosforlu insektisitlerin, tarama testi olan İTK (İnce Tabaka Kromatografi) ile kalitatif olarak tayin edilmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, zehirlenme şüphesi ile gelen materyallerde organik fosforlu insektisidlerin kalitatif tespiti için uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/ TANIMLAR

Na_2SO_4 : Sodyum Sülfat

İTK: İnce Tabaka Kromatografi

NaCl: Tuz

BFB: Brom Fenol Blue

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot zehirlenme şüphesi ile gelen numunenin ekstrakte edilip, elde edilen ekstrakta organik fosforlu insektisitlerin varlığının İTK yöntemiyle kromojenik ayırma kullanılarak kalitatif olarak tanımlanmasıdır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. Homojenizatör
2. Hassas terazi
3. Erlenmayer
4. Shaker
5. Cam ayırma hunisi (250-500 ml'lik)
6. Süzgeç kağıdı
7. Armudi balon (250 ml'lik)
8. Mezür (100 ml'lik)
9. Huni (15 cm çapında)
10. İTK plakaları
11. Developman tankı
12. Statif
13. Tüp ve sporu
14. Etüv
15. Benmari/ Rotari evaporatör
16. Otomatik pipet (20–200 µL)
17. Ultrasonik banyo

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Susuz Na₂SO₄
2. Asetonitril
3. %2 lik NaCl
4. Petrol eteri
5. Kloroform
6. n-Hexan
7. Aseton
8. Brom fenol blue
9. Azinfos metil Standart Çözeltisi
10. Silikajel 60 F₂₅₄ kaplanmış hazır alüminyum İTK plakaları

Developman Solventi: 70 ml n-hexan+30 ml aseton karışımı amber renkli şişelerde hazırlanır.

Kromojenik Ayıraç (BFB): 0.05 g BFB 10 ml asetonda çözülür. 100 ml % 1'lik AgNO₃ çözeltisi ile karıştırılır. Amber renkli şişelerde ışık görmeyecek şekilde muhafaza edilir.

7.3. Numune Analizi

1. Yem 12.5 g, iç organ vs. 25 g tartılarak homojenizatörde parçalanır.
2. Homojenize olan numune erlenmayere alınır, üzerine 75 ml asetonitril ilave edilerek yaklaşık 30 dakika shakerda çalkalanır.
3. Süzgeç kağıdından süzülür, süzütünün hepsi bir ayırma hunisine alınır ve üzerine 125 ml %2'lik NaCl ilave edilerek çalkalanır, 50 ml petrol eteri ilave edilerek tekrar çalkalanır. Faz oluşması için bir süre bekltilir. Alttaki faz erlenmayerde toplanır, ayırma hunisinde kalan kısım susuz Na₂SO₄ konmuş süzgeç kâğıdından geçirilerek bir armudi balon içine süzülür.
4. Ayrılan alt faz tekrar bir ayırma hunisine alınır üzerine 50 ml kloroform ilave edilerek çalkalanır, faz oluşması için bir süre beklenir ve alttaki faz susuz Na₂SO₄ konmuş süzgeç kâğıdından geçirilerek aynı armudi balon içinde fazlar birleştirilir. Evaporatörde vakum pompası ve ısı yardımıyla balon içeriği kuruyuncaya kadar buharlaştırılır.
5. Kurutulmuş olan ekstrakt 2 ml kloroform ilave edilerek ultrasonik banyosunda çözdürülerek tüpe alınır ve İTK plakasına uygulanır.
6. Azinfos metil standart çözeltisi numune uygulama noktasından 1-2 cm mesafede 20 µl uygulanır.
7. Developman tankına developman solventinden (70 ml n-hexan+30 ml aseton) 5-10 ml dökülerek tankın kapağı kapatılıp bir süre beklendikten sonra numune ve standart uygulanmış İTK plakası developman tankına daldırılarak solventin plaka üzerinde ilerlemesi beklenir. İlerlemesi tamamlanan (plakanın ¾ kadar) plaka developman tankından çıkartılıp oda ısısında kurutulur.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Oda ısısında kurutulmuş İTK plakasına BFB ayırıcı ile sprey tarzında boyanır. Boyanan İTK plakası 55 °C'de 15 dakika etüvde bekletilir. Bekletme sonucunda elde edilen mavi zemin üzerinde sarı lekeler organik fosforlu insektisitler yönünden şüpheli pozitif olarak değerlendirilir. Mavi zemin üzerinde sarı lekelerin oluşmaması negatif olarak değerlendirilir.

8. KAYNAKLAR/İLGİLİ DOKÜMANLAR/EKLER

1. Mills P.A. (1959): Detection and semiquantitative estimation of chlorinated organic pesticide residues in food by paper chromatography. J.A.O.A.C. 42:734-740.
2. Ceylan, S. (1980): Organik fosforlu, karbamat ve organik klorlu pestisitlerin ince tabaka kromatografisinde kromojenik ayraçlarla sistematik analizi. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 27: 440-466.
3. Vural N. Organik fosforlu insektisitlerin İTK ile kalitatif (nitel) analizleri. Toksikoloji Laboratuvar Kitabı, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayın No: 84. Sayfa: 186-188. 2000, ANKARA

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

ZEHİRLEME ŞÜPHELİ METARYALLERDE ORGANİK KLORLU İNSEKTİSİTLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE KALİTATİF ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu zehirlenme şüphesi ile muayenesi istenen iç organ (karaciğer,böbrek), mide-barsak içeriği, yem, su ve zehirlenmeye neden olduğu düşünülen şüpheli maddelerde organik klorlu insektisitlerin, tarama testi olan İTK (İnce Tabaka Kromatografi) ile kalitatif olarak tayin edilmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, zehirlenme şüphesi ile gelen materyallerde organik klorlu insektisidlerin kalitatif tespiti için uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR / TANIMLAR

İTK: İnce Tabaka Kromatografi

Na₂SO₄: Sodyum Sülfat

NaCl: Tuz

AgNO₃: Gümüş Nitrat

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot zehirlenme şüphesi ile gelen numunenin ekstrakte edilip, elde edilen ekstrakta organik klorlu insektisitlerin varlığının İTK yöntemiyle kromojenik ayıraçlar kullanılarak kalitatif olarak tanımlanmasıdır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. Homojenizatör
2. Hassas terazi
3. Erlenmayer
4. Shaker
5. Cam ayırma hunisi (250-500 ml'lik)
6. Süzgeç kağıdı
7. Armudi balon (250 ml'lik)
8. Mezür (100 ml'lik)
9. Huni (15 cm çapında)
10. İTK plakaları
11. Developman tankı
12. Statif
13. Tüp ve sporu
14. Ultrasonik banyo
15. Benmari/ Rotari evaporatör
16. Otomatik pipet (20–200 µL)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Sarf Malzemeler
2. Susuz Na₂SO₄
3. Asetonitril
4. %2 lik NaCl
5. Petrol eteri
6. Kloroform
7. n-heotan
8. Aseton
9. AgNO₃
10. Endosülfan Standart Çözeltisi
11. Silikajel 60 F254 kaplanmış hazır alüminyum İTK plakaları
12. 2-fenoksietanol
13. % 30'luk Hidrojen peroksit

Developman Solventi: 91 ml n-heptan+ 9 ml aseton karışımı amber renkli şişelerde hazırlanır.

Kromojenik Ayıraç (AgNO₃-Fenoksietanol): 0.1 g AgNO₃ 1 ml distile suda çözdürülür, üzerine 20 ml 2-fenoksietanol ilave edilerek karıştırılır. Karışım asetonla 200 ml'ye tamamlanırken birkaç damla % 30 hidrojen peroksit katılarak ayıraç hazırlanır. Amber renkli şişelerde ışık görmeyecek şekilde muhafaza edilir.

7.3. Numune Analizi

1. Yem 12.5 g, iç organ vs. 25 g tartılarak homojenizatörde parçalanır.
2. Homojenize olan numune erlenmayere alınır, üzerine 75 ml asetonitril ilave edilerek yaklaşık 30 dakika shakerda çalkalanır.
3. Süzgeç kağıdından süzülür, süzüntünün hepsi bir ayırma hunisine alınır ve üzerine 125 ml %2'lik NaCl ilave edilerek çalkalanır, 50 ml petrol eteri ilave edilerek tekrar çalkalanır. Faz oluşması için bir süre bekletilir. Alttaki faz erlenmayerde toplanır, ayırma hunisinde kalan kısım susuz Na₂SO₄ konmuş süzgeç kâğıdından geçirilerek bir armudi balon içine süzülür.
4. Ayrılan alt faz tekrar bir ayırma hunisine alınır üzerine 50 ml kloroform ilave edilerek çalkalanır, faz oluşması için bir süre beklenir ve alttaki faz susuz Na₂SO₄ konmuş süzgeç kâğıdından geçirilerek aynı armudi balon içinde fazlar birleştirilir. Evaporatörde vakum pompası ve ısı yardımıyla balon içeriği kuruyuncaya kadar buharlaştırılır.

5. Kurutulmuş olan ekstrakt 2 ml kloroform ilave edilerek ultrasonik banyosunda çözdürülerek tüpe alınır ve İTK plakasına uygulanır.
6. Endosülfan standart çözeltisi numune uygulama noktasından 1-2 cm mesafede 20 µl uygulanır.
7. Developman tankına developman solventinden (91 ml n-heptan+ 9 ml aseton) 5-10 ml dökülerek tankın kapağı kapatılıp bir süre beklendikten sonra numune ve standart uygulanmış İTK plakası developman tankına daldırılarak solventin plaka üzerinde ilerlemesi beklenir. İlerlemesi tamamlanan (plakanın ¾ kadar) plaka developman tankından çıkartılıp oda ısısında kurutulur.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Oda ısısında kurutulmuş İTK plakasına etüvde 75 °C'de 15 dakika kurutulduktan sonra gümüş nitrat fenoksietanol ayırıcından sprey tarzında püskürtülür ve 254 nm UV ışık altında en düşük organik klorlu insektisit düzeyi belirene dek ışınlama yapılır. Beyaz zemin üzerinde gri renkte lekeler organik klorlu insektisitler yönünden şüpheli pozitif olarak değerlendirilir. Beyaz zemin üzerinde gri renkte lekelerin oluşmaması negatif olarak değerlendirilir.

8. KAYNAKLAR/İLGİLİ DOKÜMANLAR/EKLER

1. Mills P.A. (1959): Detection and semiquantitative estimation of chlorinated organic pesticide residues in food by paper chromatography. J.A.O.A.C. 42: 734-740.
2. Ceylan, S. (1980): Organik fosforlu, karbamat ve organik klorlu pestisitlerin ince tabaka kromatografisinde kromojenik ayıraçlarla sistematik analizi. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 27: 440-466.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BAL VE PETEKLERDE PESTİSİTLERİN LC-MS/MS İLE ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu bal ve petek örneklerinde pestisitlerin LC-MS/MS sistemi ile kantitatif belirlenmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, bal ve petek örneklerinde 68 adet pestisit (Tablo 3) belirlenmesini kapsar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MSMS: Likit Kromatografi – Kütle / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

ES: Eksternal standart

PP: Polipropilen

AA: Amino asit

S1 Amino asit standart karışımı (Tablo 3)

R1 Pestisit dahili (internal) standart IS-1 ve IS-2 karışımı

IS-1, Thiamine pyrophosphate - TPP

IS-2 Etoprophos

R2 ekstraksiyon çözültisi (Methanol)

R3 ekstraksiyon çözültisi

Mobil faz A: Methanol (%10)

Mobil Faz B: Su (%90) + Asetik asit (%0.1)

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Test metodu iki aşamadan oluşur;

1. Numunenin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve zenginleştirilmesi.
2. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. PP Santrifüj tüpü 15 mL'lik
2. PP Santrifüj tüpü 50 mL'lik
3. Enjektör 5 mL'lik
4. Filtre 0.45 µm
5. Ependrof tüpü
6. Pipet ucu (200, 1000 ve 5000 µL'lik)
7. Ayarlanabilir pipet 20–200 µL
8. Ayarlanabilir pipet 100–1000 µL
9. Ayarlanabilir pipet 500–5000 µL

10. Hassas terazi
11. Multireaks vorteks
12. Soğutmalı santrifüj
13. Pestisit HPLC Kolonu 75 x 4,6 mm 5 µ
14. ZIVAK Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MSMS
15. Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler;

1. **Standart karışımı (S1) ve iç standart karışımlarının (IS-I + IS-2) R1 hazırlanması:** Kullanıma hazır olarak gelen pestisit standart çözeltileri ve mobil fazlar etiketlerinde belirtildiği şekilde hazırlanır.

Not: S1- Standart karışımı ve R1- İç standart karışımları derin dondurucuda (-20 °C) saklanmalıdır.

2. **Pestisit analiz kiti içinde yer alan ayraçlar (R2, R3):** Bal örneklerinde pestisit kalıntıları analizi için (R2 ve R3 2-8 °C saklanmalıdır. Mobil Faz A ve B oda sıcaklığında saklanmalıdır.
3. **Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması:** 4 adet 5 g. Bal numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır. Üzerine Tablo 1 de belirtildiği oranlarda uygun standart konsantrasyonundan ilave edilir. Hazırlanan bu standartlı numunelere normal analitik numune hazırlığındaki gibi basamaklar uygulanır.

Tablo1. Standart konsantrasyonları ve uygulama miktarları.

Bal ve petek numunesindeki Konsantrasyon	5 µg/kg	10µg/kg	15 µg/kg	20 µg/kg
Eklenecek Standart Hacmi	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl

7.3. Numune Analizi

1. 5 g. bal numunesi tartılarak 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır
2. Üzerine 5 ml seyreltme çözeltisi (Ethyl asetat % 10 + su % 90 + asetik asit % 0.1) ilave edilerek şerbet haline gelene (10 dak) kadar vortekslenir.
3. Üzerine 100 µl R1 eklenerek 60 sn. vortexlenir.
4. R2 çözeltisi eklenerek 5 dakika vortekslenir.
5. 5000 RPM` de 10 dakika santrifüj edilir.
6. Santrifüj sonunda, üst fazdan 6 mL cam tüpe alınarak, N2 altında 40 °C` de kuruluğa kadar uçurulur.

7. 400µl R3 (LC-MS) ile çözülerek 1 dk vortekslenir,
8. Sonra 5 dk ultrasonik banyoda bekletilir
9. Sonrasında tüp içindeki ekstrakt vialle alınarak LC-MS/MS sistemine 10 µL enjeksiyon yapılır.

7.4. Cihaz Parametreleri

Bal örneklerinde pestisit analizi için LC –MS/MS parametreleri : Tablo 2 de yer almaktadır.

Tablo 2. LC-MS/MS Parametreleri

Kol	Zivak / pestisit kolonu 10 x 2,0 µm			
Enjeksiyon hacmi	10 µL			
Gradient program	Time (dakika)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)	Flow (mL/dak)
	0	50	50	0.15
	0.06	50	50	0.15
	7	0	100	0.15
	18	0	100	0.15
	18.06	50	50	0.5
	23	50	50	0.5
	23.06	50	50	0.15
	25	50	50	0.15
Kolon sıcaklığı	35 °C			
Akış hızı	0.15 ml/min			
Dwell Time	0,01			
Quad1 Quad 3	2			
Dedector	1600 V			
Needle Voltage	5000 V			
Spray Chamber Temperature	50 ° C			
Drying Gas Temperature	300 ° C			

Pestisit LC-MS/MS iyonları ve parçalanma enerjileri: Pestisid standart karışımı (S1) olarak kullanılmakta olan 68 adet pestisid bileşiklerinin ve İç (Internal) standartlar IS1 ve IS2 bileşiklerinin LC-MS/MS iyonları ve parçalanma enerjileri Tablo 3'de yer almaktadır.

Tablo 3. Pestisit bileşiklerinin isimleri iyonları ve parçalanma ürünleri

Sıra No.	PESTİSİT	Q1	Q3	CV	CE	R.T
1	2.4D	219	160,5	-50	10	11.49
2	Acetamiprid	223	126	40	34	5.83
3	Alachlor	238	162	50	15	13.03
4	Amitraz	294	197	30	18	12.52
5	Atrazine	216	174	50	25	11.11
6	Azoxystrobin	404	372	80	25	11.81
7	Buprimate	317	108	50	43	12.88
8	Buprofezine	306.6	116	50	25	14.93
9	Carbaryl	145	127	50	20	10.13
10	Carbendazim	192	160	50	32	3.13
11	Carbofuran	222	165	50	12	9.60
12	Chlofentezine	303	138	30	10	13.98
13	Chlorfluazuron	538	518	-40	15	16.23
14	Chlorpyrifos	350	198	60	15	15.56
15	Cyproconazole	292.5	70	50	35	12.55
16	Cyprodinil	226	93	50	25	13.15
17	Dichlofluanid	333	123	40	20	12.92
18	Dichlorvos	221	109	50	15	9.46
19	Dimethoate	230	199	30	10	6.14
20	Dimethomorph	388	301	50	20	12.18
21	Epoxiconazole	330	121	50	48	12.92
22	Ethion	385	199	40	6	15.32
23	Ethofumasate	287	161	36	31	13.36
24	Famoxadone	331	238.4	40	10	13.44
25	Fenarimol	331	268	50	30	12.81
26	Fenazaquin	307	161	40	20	17.35
27	Fenoxycarb	302	88	30	15	13.06
28	Fenpropathrin	350	125	40	10	15.94
29	Fenthion	279	169	50	15	13.60
30	Flodioxonyl	247	180	-30	38	12.28
31	Furathiocarb	384	195	50	13	14.84
32	Hexythiazox	353	228	50	20	15.45
33	Imidachloprid	256	209	50	15	4.86
34	Ioxynil	370	127	-50	20	11.73
35	Lufenuron	508.8	325	-40	14	15.28
36	Malathion	331.4	127	50	15	12.44
37	Metalaxyl	280	219,6	50	10	11.12
38	Metolachlor	284	252	50	18	13.11
39	Metribuzine	215	187	70	16	9.72
40	Monolinuron	216	126	30	35	10.55
41	Oxadixyl	279.6	219	50	15	11.12
42	Oxamyl	237	72	80	18	3.34
43	Oxyfluorfen	362	316	50	15	14.76
44	Pendimethalin	282	212	10	10	15.88
45	Phasolone	368	182	50	26	13.88
46	Phenthoate	321	247	20	10	13.35
47	Phosmet	318	160	50	12	11.85
48	Primicarb	239	72	40	40	7.33
49	Primiphos methyl	306	164	50	18	13.99
50	Profenofos	375	305	50	20	14.63

51	Propargite	368	175	40	13	15.80
52	Propiconazole	342	159	50	20	13.57
53	Propyzamide	256	190	50	15	12.49
54	Pyrazophos	374	222	80	15	14.11
55	Pyridaben	365	309	40	18	16.98
56	Pyriproxyfen	322	96	60	48	15.18
57	Simazine	202	104	50	25	9.82
58	Tebuconazole	308	70	50	35	13.36
59	Terbutryn	242	186	50	32	12.24
60	Thiamethoxam	292	211	50	15	3.89
61	Tolyfluanide	364	238	20	10	13.40
62	Triadimenole	296	227	11	15	12.51
63	Trichlorfon	257	109	50	18	4.86
64	Trifloxystrobin	409.7	186	40	40	14.20
65	Triflumizole	346	73	50	24	14.37
66	DMPF	163	107	50	15	10.46
67	DMF	150	122	50	15	8.80
68	DMA	122	107	50	13	2.91
69	IS1(TPP)	243	131	40	32	12.89
70	IS2 (Etoprophos)	327	152	50	46c	13,58

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Değerlendirme,

1. Pestisit analizlerinde kromatografik piklerin alan hesaplamalarına göre değerlendirilir.
2. Numuneye ait piklerle standarda ait pikler ve bunların saflık, dilusyon, tartım ve enjeksiyon volümleri gibi spesifik özellikleri hesaplamada faktör olarak kullanılır.
3. Hassas analitik cihazların kendi doğrulamaları sayesinde tüm veriler girilerek otomatik hesaplama yöntemleri de kullanılabilir.
4. Validasyon ve ölçüm belirsizliği SANCO dokümanı baz alınarak, Eurachem ve NMLK literatürleri kullanılarak yapılır.
5. Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik kalite kontrol grafiği hazırlanmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR/KAYNAKLAR ve EKLER

1. Anon (2011). Quality control procedures for pesticide residues analysis, Sanco Document 10232/2011
2. Anon.(2002) Official Journal of the European Communities 2002/657/EC Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 12 August 2002 implementing.
3. Beatriz, A. et al. (2004). Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 52: 5828-5835
4. Ferrer, I. (2005). Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1082: 81–90
5. G. Rene´ van der Hoff (1999). Trace analysis of pesticides by gas chromatography Journal of Chromatography A, 843: 301–322
6. Gowik, P., Polzer J., (2003). AV 014-01-V06 Proceedings for the Validation of Test Methods .
7. Kaya, S. Veteriner Klinik Toksikoloj. Medisan Yayınevi, Ankara, 1995

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BAL VE PETEKLERDE PESTİSİT KALINTILARININ GC-MS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu bal örneklerinde pestisit kalıntılarının GC-MS sistemi ile analiz edilmesini amaçlar

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, bal ve petek örneklerinde 44 adet pestisit (Tablo 3) belirlenmesini kapsar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

GC-MS: Gaz Kromatografi – Kütle Spektrometresi

CI: Kimyasal iyonizasyon

PP: Polipropilen

S1: Pestisit miks standart karışımı (Tablo 2)

R1 :Pestisit dahili (internal) standart IS-1 ve IS-2 karışımı

IS-1:Internal standart

R2 : Ekstraksiyon çözeltilisi (Ethyl acetate)

R3 :Ekstraksiyon çözeltilisi (LC için Acetonitrille; GC için Methanol))

MF.A: Mobil faz A:

MF.B: Mobil Faz B:

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

İki aşamada gerçekleştirilir;

- 1.Numunenin ekstraksiyonu, prufikasyonu ve zenginleştirilmesi.
- 2.GC-MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1.Kullanılan Ekipmanlar

1. Standart 2 (S2) GC-MS
2. Reaktif D (RD) Seyreltim çözeltilisi
3. Reaktif 1 (R1)
4. Reaktif 2 (R2)
5. Reaktif 3 (R3-GC-MS)
6. 15 mL santrifüj tüpü
7. Vial (1,5 mL)
8. Vial kapağı (1,5 mL)
9. 20-200 µL pipet ucu
10. 100-1000 µL pipet ucu
11. 20-200 µL otomatik pipet
12. 100-1000 µL pipet ucu
13. 20-200 µL otomatik pipet
14. Uçurma Tüpü
15. 1000-5000 µL pipet ucu
16. 1000-5000 µL otomatik pipet
17. Santrifüj
18. Vorteks

19. Column: Zebron™ ZB-5MS, GC Cap. Column 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Ea
20. Thermo Single quadrapol -MS
21. Kromatografik program: Xcalibur (Version 2010)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Standart karışımı(S1) ve iç standart karışımı (IS-1 + IS-2) R1: Kullanıma hazır olarak gelen pestisit standart çözeltileri ve mobil fazlar etiketlerinde belirtildiği şekilde hazırlanır.

Not: S1- Standart karışımı ve R1- İç standart karışımları derin dondurucuda (-20 °C) saklanmalıdır. Diğer reaktifler oda sıcaklığında saklanmalıdır.

2. Pestisit analiz kiti içinde yer alan ayraçlar (R1, R2, R3) : Bal örneklerinde pestisit kalıntıları analizi için (R1: - 20 °C de saklanmalı, R2 ve R3 2-8 °C saklanmalıdır).Mobil Faz A: Balda Pestisit için için. (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).Mobil Faz B: Balda Pestisit için (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

3. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması: Kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 4 adet 5 g. Bal numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır. Üzerine aşağıdaki tabloya uygun Standart konsantrasyonundan ilave edilir. Hazırlanan bu matris std. numunelerine normal analitik numune hazırlığındaki basamaklar uygulanır.

Tablo1. Standart konsantrasyonları ve uygulama miktarları.

Bal ve petek numunesindeki Konsantrasyon	5 µg/kg	10µg/kg	15 µg/kg	20 µg/kg
Eklenecek Standart Hacmi	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl

7.3. Numune Analizi

1. 2 gr bal örneği 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınır.
2. Üzerine 2 ml seyreltim çözeltilisi (RD) eklenerek bal şerbeti haline gelene kadar vortekslenir.
3. 100 µl R1 ilave edilir. 10 sn vorteksle karıştırılır.
4. 6 ml R2 ilave edilir. 2 dk vortekslenir.
5. 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.
6. 5 ml üst faz alınarak 15 ml uçurma tüpüne aktarılır. Azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulur.
7. 750 µl R3 ilave edilerek 10 sn vortekslenir. Ultrasonik banyoda 1 dk bekletilir.
8. Çözme işleminden sonra vialle alınarak GC-MS sistemine enjeksiyon yapılır

7.4. Cihaz Parametreleri

Bal örneklerinde pestisit analizi için GC-MS parametreleri Tablo 2 de yer almaktadır.

Tablo 2: GC-MS Parametreleri

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	250 °C
Drying gas pressure	30 psi
Scan Time	1,767 sec
SIM Width	2.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 600V
Capillary	Method
Detector	+ 1600 V
CID Gas Pressure	2.00 mTorr
Spray Chamber T	50°C
Mass peak width in amu	Q1=2.0 Q3=2.0
Column	Zebtron™ ZB-5MS, GC Cap. Column 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Ea
Oven Profile	40 °C for 1 min to 100 °C @ 15 °C/min to 225 °C @ 5 °C/min to 320 °C @ 15 °C/min for 8 min
Carrier Gas:	Constant Flow Helium, 0.5 mL/min
Injection:	On-Column :1 0.5 µL @ 43°C
Detection:	Mass Selective (335°C)

Pestisit GC-MS iyonları ve parçalanma enerjileri

Pestisit standart karışımı (S1) olarak kullanılmakta olan 44 adet pestisit bileşiklerinin ve İç (Internal) standartlar IS1 bileşiklerinin GC-MS iyonları ve Retention time'ları tablo 3. de yer almaktadır.

Tablo 3. Pestisit bileşiklerinin isimleri iyonları ve parçalanma ürünleri

Sıra No.	Pestisit	İyon	R.Time
1	Trifluralin	264	7.44
2	Chlorpropham	213	7.46
3	Lindan	219	8.15
4	Chlorothalonil	266-264-268	8.29
5	α.BHC	219-181	8.41
6	β.BHC	219-183	8.41
7	Formothion	257	8.52
8	Vinclozolin	285	8.7
9	Parathion methyl	263	8.76
10	Heptachlor	100-237-271	8.9
11	Fenitrothion	277	9
12	Aldrin	263-293	9.29
13	Procymidone	283	9.68
14	Captan	79.149	9.73
15	Folpet	260	9.8
16	Chlordan	373	9.89
17	Endosulfan A	195-339	10.04
18	Prothiophos	162	10.08
19	4.4 DDE	318-246	10.16
20	Kresoxim methyl	116	10.17
21	Dieldrin	263-277	10.3
22	İprodione	244	10.51
23	Endrin	263	10.52
24	4.4 DDD	235	10.58
25	Endosulfan-B	195-339	10.61
26	2.4 DDT	235	10.62
27	4.4 DDT	235	10.95
28	Endosulfan sulfat	272-229	10.96
29	IS	326	11.08
30	Bifenthrin	181	11.31
31	Bromopropilate	341	11.4
32	Methoxychlor	227	11.44
33	Tetradifon	159	11.68
34	Lamda Cyhalothrin	181	11.81
35	Permethrin1	183	12.36
36	Permethrin2	183	12.44
37	B-Cyfluthrin 1	163	12.82
38	B-Cyfluthrin 2	163	12.84
39	Alpha- cyperpermethrin	181	12.97
40	Beta -Cypermethrin	181	13.04
41	Esfanvalarate	167	13.79
42	Tau-fluvalinate1	250	13.86
43	Tau-fluvalinate2	250	13.91
44	fenvalarete	167	14
45	Deltamethrin	181-253	14.59

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Değerlendirme,

1. Pestisit analizlerinde kromatografik piklerin alan hesaplamalarına göre değerlendirilir.
2. Numuneye ait piklerle standarda ait pikler ve bunların saflık, dilüsyon, tartım ve enjeksiyon volümleri gibi spesifik özellikleri hesaplamada faktör olarak kullanılır.
3. Hassas analitik cihazların kendi konfirmasyon metotları sayesinde tüm veriler girilerek otomatik hesaplama yöntemleri de kullanılabilir.
4. Validasyon ve ölçüm belirsizliği SANCO dokümanı baz alınarak, Eurachem ve NMLK literatürleri kullanarak yapılır.
5. Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik kalite kontrol grafiği hazırlanmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR/KAYNAKLAR ve EKLER

1. Anon (2002). Official Journal of the European Communities 2002/657/EC Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 12 August 2002 implementing.
2. Kaya, S.(1995). Veteriner Klinik Toksikoloji, Medisan Yayınevi, 1995
3. Anon.(2011)Quality control procedures for pesticide residues analysis, Sanco Document 10232/2011
4. BEATRIZ ALBERO at all (2004) Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5828-5835,
5. Ferrer, I (2005) Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082 (2005) 81-90
6. G. Rene´ van der Hoff (1999) Trace analysis of pesticides by gas chromatography *Journal of Chromatography A*, 843, 301-322 Review
7. Gowik, P., Polzer J., (2003). AV 014-01-V06 Proceedings for the Validation of Test Methods 2003

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

HAYVANSAL DOKU VE YEMLERDE PESTİSİTLERİN LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu hayvansal doku ve yemlerde pestisitlerin LC-MS/MS sistemi ile analiz edilmesini amaçlar

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, hayvansal doku ve yemlerde 68 adet pestisit (Tablo 3) belirlenmesini kapsar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matrisin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MSMS: Likit Kromatografi – Kütle / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro spreng iyonizasyon

ES: Eksternal standart

PP: Polipropilen

AA: Amino asit

S1 Amino asit standart karışımı (Tablo 3)

R1 Pestisit dahili (internal) standart IS-1 ve IS-2 karışımı

IS-1, Thiamine pyrophosphate - TPP

IS-2 Etoprophos

R2 ekstraksiyon çözeltisi (Methanol)

R3 ekstraksiyon çözeltisi

Mobil faz A: Methanol (%10)

Mobil Faz B: Su (%90) + Asetik asit (%0.1)

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

iki aşamada gerçekleştirilir;

1. Dokunun analize hazırlanması
2. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. PP Santrifüj tüpü 15 mL'lik
2. PP Santrifüj tüpü 50 mL'lik
3. Enjektör 5 mL'lik
4. Filtre 0.45 µm
5. Ependrof tüpü
6. Pipet ucu (200, 1000 ve 5000 µL'lik)
7. Ayarlanabilir pipet 20–200 µL
8. Ayarlanabilir pipet 100–1000 µL
9. Ayarlanabilir pipet 500–5000 µL
10. Hassas terazi

11. Multireaks vorteks
12. Soğutmalı santrifüj
13. Pestisit HPLC Kolonu 75 x 4,6 mm 5 µ
14. ZIVAK Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MSMS
15. Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1)

7.2. Kullanılan Kimyasallar

1. **Standart karışımı(S1) ve iç standart karışımları (IS-I + IS-2) R1:** Kullanıma hazır olarak gelen pestisit standart çözeltileri ve mobil fazlar etiketlerinde belirtildiği şekilde hazırlanır.
Not: S1- Standart karışımı ve R1- İç standart karışımları derin dondurucuda (-20 °C) saklanmalıdır.
2. **Pestisit analiz kiti içinde yer alan ayıraçlar (R2, R3) :** Doku veya yem örneklerinde pestisit kalıntıları analizi için (R2 ve R3 2-8 °C saklanmalıdır).Mobil Faz A: Doku'da Pestisit için için. (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).Mobil Faz B: Doku'da Pestisit için (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
3. **Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması:** Kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 4 adet 5 g. doku numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır. Üzerine aşağıdaki tabloya uygun Standart konsantrasyonundan ilave edilir. Hazırlanan bu matris std. numunelerine normal analitik numune hazırlığındaki basamaklar uygulanır.

Tablo1. Standart konsantrasyonları ve uygulama miktarları.

Bal ve petek numunesindeki Konsantrasyon	5 µg/kg	10µg/kg	15 µg/kg	20 µg/kg
Eklenecek Standart Hacmi	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl

7.3. Numune Analizi

1. 2 gr doku veya yem örneği 5 ml'lik santrifüj tüpüne alınır.
2. Üzerine 2 ml seyreltim çözeltilisi (RD) eklenerek bal şerbeti haline gelene kadar vortekslenir.
3. 100 µl R1 ilave edilir. 10 sn vorteksle karıştırılır.
4. 6 ml R2 ilave edilir. 2 dk vortekslenir.
5. 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.
6. 5 ml üst faz alınarak 15 ml uçurma tüpüne aktarılır. Azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulur.
7. 750 µl R3 ilave edilerek 10 sn vortekslenir. Ultrasonik banyoda 1 dk bekletilir.
8. Çözme işleminden sonra vialle alınarak LC-MS/MS sistemine enjeksiyon yapılır

7.4. Cihaz Parametreleri

Doku örneklerinde pestisit analizi için LC –MS/MS parametreleri Tablo 2’de yer almaktadır.

Tablo 2. LC-MS/MS Parametreleri

Kol	Zivak / pestisit kolonu 10 x 2,0 µm			
Enjeksiyon hacmi	10 µL			
Gradient program	Time (dakika)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)	Flow (mL/dak)
	0	50	50	0.15
	0.06	50	50	0.15
	7	0	100	0.15
	18	0	100	0.15
	18.06	50	50	0.5
	23	50	50	0.5
	23.06	50	50	0.15
	25	50	50	0.15
Kolon sıcaklığı	35 °C			
Akış hızı	0.15 ml/min			
Dwell Time	0,01			
Quad1 Quad 3	2			
Dedector	1600 V			
Needle Voltage	5000 V			
Spray Chamber Temperature	50 ° C			
Drying Gas Temperature	300 ° C			

Pestisit LC-MS/MS iyonları ve parçalanma enerjileri: Pestisid standart karışımı (S1) olarak kullanılmakta olan 68 adet pestisid bileşiklerinin ve İç (Internal) standartlar IS1 ve IS2 bileşiklerinin LC-MS/MS iyonları ve parçalanma enerjileri Tablo 3’de yer almaktadır.

Tablo 3. Pestisit bileşiklerinin isimleri iyonları ve parçalanma ürünleri

Sıra No.	PESTİSİT	Q1	Q3	CV	CE	R.T
1	2.4D	219	160,5	-50	10	11.49
2	Acetamiprid	223	126	40	34	5.83
3	Alachlor	238	162	50	15	13.03
4	Amitraz	294	197	30	18	12.52
5	Atrazine	216	174	50	25	11.11
6	Azoxystrobin	404	372	80	25	11.81
7	Buprimate	317	108	50	43	12.88
8	Buprofezine	306.6	116	50	25	14.93
9	Carbaryl	145	127	50	20	10.13

10	Carbendazim	192	160	50	32	3.13
11	Carbofuran	222	165	50	12	9.60
12	Chlofentezine	303	138	30	10	13.98
13	Chlorfluazuron	538	518	-40	15	16.23
14	Chlorpyriphos	350	198	60	15	15.56
15	Cyproconazole	292.5	70	50	35	12.55
16	Cyprodinil	226	93	50	25	13.15
17	Dichlofluanid	333	123	40	20	12.92
18	Dichlorvos	221	109	50	15	9.46
19	Dimethoate	230	199	30	10	6.14
20	Dimethomorph	388	301	50	20	12.18
21	Epoxiconazole	330	121	50	48	12.92
22	Ethion	385	199	40	6	15.32
23	Ethofumasate	287	161	36	31	13.36
24	Famoxadone	331	238.4	40	10	13.44
25	Fenarimol	331	268	50	30	12.81
26	Fenazaquin	307	161	40	20	17.35
27	Fenoxycarb	302	88	30	15	13.06
28	Fenpropathrin	350	125	40	10	15.94
29	Fenthion	279	169	50	15	13.60
30	Flodioxonyl	247	180	-30	38	12.28
31	Furathiocarb	384	195	50	13	14.84
32	Hexythiazox	353	228	50	20	15.45
33	Imidachloprid	256	209	50	15	4.86
34	Ioxynil	370	127	-50	20	11.73
35	Lufenuron	508.8	325	-40	14	15.28
36	Malathion	331.4	127	50	15	12.44
37	Metalaxyl	280	219,6	50	10	11.12
38	Metolachlor	284	252	50	18	13.11
39	Metribuzine	215	187	70	16	9.72
40	Monolinuron	216	126	30	35	10.55
41	Oxadixyl	279.6	219	50	15	11.12
42	Oxamyl	237	72	80	18	3.34
43	Oxyfluorfen	362	316	50	15	14.76
44	Pendimethalin	282	212	10	10	15.88
45	Phasolone	368	182	50	26	13.88
46	Phenthoate	321	247	20	10	13.35
47	Phosmet	318	160	50	12	11.85
48	Primicarb	239	72	40	40	7.33

49	Primiphos methyl	306	164	50	18	13.99
50	Profenofos	375	305	50	20	14.63
51	Propargite	368	175	40	13	15.80
52	Propiconazole	342	159	50	20	13.57
53	Propyzamide	256	190	50	15	12.49
54	Pyrazophos	374	222	80	15	14.11
55	Pyridaben	365	309	40	18	16.98
56	Pyriproxyfen	322	96	60	48	15.18
57	Simazine	202	104	50	25	9.82
58	Tebuconazole	308	70	50	35	13.36
59	Terbutryn	242	186	50	32	12.24
60	Thiamethoxam	292	211	50	15	3.89
61	Tolyfluanide	364	238	20	10	13.40
62	Triadimenole	296	227	11	15	12.51
63	Trichlorfon	257	109	50	18	4.86
64	Trifloxystrobin	409.7	186	40	40	14.20
65	Triflumizole	346	73	50	24	14.37
66	DMPF	163	107	50	15	10.46
67	DMF	150	122	50	15	8.80
68	DMA	122	107	50	13	2.91
69	IS1(TPP)	243	131	40	32	12.89
70	IS2 (Etoprophos)	327	152	50	46c	13,58

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Değerlendirme,

1. Pestisit analizlerinde kromatografik piklerin alan hesaplamalarına göre değerlendirilir.
2. Numuneye ait piklerle standarda ait pikler ve bunların saflık, dilüsyon, tartım ve enjeksiyon volümleri gibi spesifik özellikleri hesaplamada faktör olarak kullanılır.
3. Hassas analitik cihazların kendi konfirmasyon metotları sayesinde tüm veriler girilerek otomatik hesaplama yöntemleri de kullanılabilir.
4. Validasyon ve ölçüm belirsizliği SANCO dokümanı baz alınarak, Eurachem ve NMLK literatürleri kullanarak yapılır.
5. Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik kalite kontrol grafiği hazırlanmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR/KAYNAKLAR ve EKLER

1. Anon (2011). Quality control procedures for pesticide residues analysis, Sanco Document 10232/2011
2. Anon.(2002) Official Journal of the European Communities 2002/657/EC Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 12 August 2002 implementing.
3. Beatriz, A. et al. (2004). Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 52: 5828-5835
4. Ferrer, I. (2005). Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1082: 81–90
5. G. Rene´ van der Hoff (1999). Trace analysis of pesticides by gas chromatography Journal of Chromatography A, 843: 301–322
6. Gowik, P., Polzer J., (2003). AV 014-01-V06 Proceedings for the Validation of Test Methods
7. Kaya, S. Veteriner Klinik Toksikoloj. Medisan Yayınevi, Ankara, 1995

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

HAYVANSAL DOKU VE YEMLERDE PESTİSİT KALINTILARININ GC-MS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu hayvansal doku, yem ve yem hammaddelerinde pestisitlerin GC-MS sistemi ile analiz edilmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, hayvansal doku, yem ve yem hammaddelerinde 44 adet pestisit (Tablo 3) kantitatif belirlenmesini kapsar

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

GC-MS: Gaz Kromatografi – Kütle Spektrometresi

CI: Kimyasal iyonizasyon

PP: Polipropilen

S1: Pestisit miks standart karışımı (Tablo 2)

R1 :Pestisit dahili (internal) standart IS-1 ve IS-2 karışımı

IS-1:Internal standart

R2 : Ekstraksiyon çözeltisi (Ethyl acetate)

R3 :Ekstraksiyon çözeltisi (LC için Acetonitrille; GC için Methanol))

MF.A: Mobil faz A:

MF.B: Mobil Faz B:

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

İki aşamada gerçekleştirilir;

- 1.Numunenin ekstraksiyonu, prufikasyonu ve zenginleştirilmesi.
- 2.GC-MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1.Kullanılan Ekipmanlar

1. Standart 2 (S2) GC-MS
2. Reaktif D (RD) Seyreltim çözeltisi
3. Reaktif 1 (R1)
4. Reaktif 2 (R2)
5. Reaktif 3 (R3-GC-MS)
6. 15 mL santrifüj tüpü
7. Vial (1,5 mL)
8. Vial kapağı (1,5 mL)
9. 20-200 µL pipet ucu
10. 100-1000 µL pipet ucu
11. 20-200 µL otomatik pipet
12. 100-1000 µL pipet ucu
13. 20-200 µL otomatik pipet

14. Uçurma Tüpü
15. 1000-5000 µL pipet ucu
16. 1000-5000 µL otomatik pipet
17. Santrifüj
18. Vorteks
19. Column: Zebron™ ZB-5MS, GC Cap. Column 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Ea
20. Thermo Single quadrapol -MS
21. Kromatografik program: Xcalibur (Version 2010)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Standart karışımı (S1) ve iç standart karışımları (IS-I + IS-2) R1: Kullanıma hazır olarak gelen pestisit standart çözeltileri ve mobil fazlar etiketlerinde belirtildiği şekilde hazırlanır.

Not: S1- Standart karışımı ve R1- İç standart karışımları derin dondurucuda (-20 °C) saklanmalıdır. Diğer reaktifler oda sıcaklığında saklanmalıdır.

2. Pestisit analiz kiti içinde yer alan ayraçlar (R2, R3) : Bal örneklerinde pestisit kalıntıları analizi için (R2 ve R3 2-8 °C saklanmalıdır). Mobil Faz A: Doku'da Pestisit için için. (Oda sıcaklığında saklanmalıdır). Mobil Faz B: Doku'da Pestisit için (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

3. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması: Kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 4 adet 5 g. Doku numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır. Üzerine aşağıdaki tabloya uygun Standart konsantrasyonundan ilave edilir. Hazırlanan bu matris std. numunelerine normal analitik numune hazırlığındaki basamaklar uygulanır.

Tablo1. Standart konsantrasyonları ve uygulama miktarları.

Doku numunesindeki Konsantrasyon	5 µg/kg	10µg/kg	15 µg/kg	20 µg/kg
Eklenecek Standart Hacmi	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl

7.3. Numune Analizi

1. 2 gr doku örneği 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınır.
2. Üzerine 2 ml seyreltim çözeltisi (RD) eklenerek bal şerbeti haline gelene kadar vortekslenir.
3. 100 µl R1 ilave edilir. 10 sn vorteksle karıştırılır.
4. 6 ml R2 ilave edilir. 2 dk vortekslenir.
5. 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.

6. 5 ml üst faz alınarak 15 ml uçurma tüpüne aktarılır. Azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulur.
7. 750 µl R3 ilave edilerek 10 sn vortekslenir. Ultrasonik banyoda 1 dk bekletilir.
8. Çözme işleminden sonra vialle alınarak GC-MS sistemine enjeksiyon yapılır

7.4. Cihaz Parametreleri

Doku örneklerinde pestisit analizi için GC-MS parametreleri Tablo 2' de yer almaktadır.

Tablo 2: GC-MS Parametreleri

Ionization Mode	ESI +	
API Nebulizing gas pressure	55 psi	
Drying gas temperature	250 °C	
Drying gas pressure	30 psi	
Scan Time	1,767 sec	
SIM Width	2.0 amu	
Needle	+ 5000V	
Shield	+ 600V	
Capillary	Method	
Detector	+ 1600 V	
CID Gas Pressure	2.00 mTorr	
Spray Chamber T	50°C	
Mass peak width in amu	Q1=2.0	Q3=2.0
Column	Zebron™ ZB-5MS, GC Cap. Column 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Ea	
Oven Profile	40 °C for 1 min to 100 °C @ 15 °C/min to 225 °C @ 5 °C/min to 320 °C @ 15 °C/min for 8 min	
Carrier Gas:	Constant Flow Helium, 0.5 mL/min	
Injection:	On-Column :1 0.5 µL @ 43°C	
Detection:	Mass Selective (335°C)	

Pestisit GC-MS iyonları ve parçalanma enerjileri

Pestisit standart karışımı (S1) olarak kullanılmakta olan 44 adet pestisit bileşiklerinin ve İç (Internal) standartlar IS1 bileşiklerinin GC-MS iyonları ve Retention time'ları Tablo 3' de yer almaktadır.

Tablo 3. Pestisit bileşiklerinin isimleri MS iyonları ve parçalanma ürünleri

Sıra No.	Pestisit	İyon	R.Time
1	Trifluralin	264	7.44
2	Chlorpropham	213	7.46
3	Lindan	219	8.15
4	Chlorothalonil	266-264-268	8.29
5	α.BHC	219-181	8.41
6	β.BHC	219-183	8.41
7	Formothion	257	8.52
8	Vinclozolin	285	8.7
9	Parathion methyl	263	8.76
10	Heptachlor	100-237-271	8.9
11	Fenitrothion	277	9
12	Aldrin	263-293	9.29
13	Procymidone	283	9.68
14	Captan	79.149	9.73
15	Folpet	260	9.8
16	Chlordan	373	9.89
17	Endosulfan A	195-339	10.04
18	Prothiophos	162	10.08
19	4.4 DDE	318-246	10.16
20	Kresoxim methyl	116	10.17
21	Dieldrin	263-277	10.3
22	İprodione	244	10.51
23	Endrin	263	10.52
24	4.4 DDD	235	10.58
25	Endosulfan-B	195-339	10.61
26	2.4 DDT	235	10.62
27	4.4 DDT	235	10.95
28	Endosulfan sulfat	272-229	10.96
29	IS	326	11.08
30	Bifenthrin	181	11.31
31	Bromopropilate	341	11.4
32	Methoxychlor	227	11.44
33	Tetradifon	159	11.68
34	Lamda Cyhalothrin	181	11.81
35	Permethrin1	183	12.36
36	Permethrin2	183	12.44
37	B-Cyfluthrin 1	163	12.82
38	B-Cyfluthrin 2	163	12.84
39	Alpha- cyperpermethrin	181	12.97
40	Beta -Cypermethrin	181	13.04
41	Esfanvalarate	167	13.79
42	Tau-fluvalinate1	250	13.86
43	Tau-fluvalinate2	250	13.91
44	fenvalarete	167	14
45	Deltamethrin	181-253	14.59

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Değerlendirme,

1. Pestisit analizlerinde kromatografik piklerin alan hesaplamalarına göre değerlendirilir.
2. Numuneye ait piklerle standarda ait pikler ve bunların saflık, dilüsyon, tartım ve enjeksiyon volümleri gibi spesifik özellikleri hesaplamada faktör olarak kullanılır.

3. Hassas analitik cihazların kendi konfirmasyon metotları sayesinde tüm veriler girilerek otomatik hesaplama yöntemleri de kullanılabilir.
4. Validasyon ve ölçüm belirsizliği SANCO dokümanı baz alınarak, Eurachem ve NMLK literatürleri kullanarak yapılır.
5. Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik kalite kontrol grafiği hazırlanmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR/KAYNAKLAR ve EKLER

1. Anon (2002). Official Journal of the European Communities 2002/657/EC Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 12 August 2002 implementing.
2. Anon.(2011)Quality control procedures for pesticide residues analysis, Sanco Document 10232/2011
3. Beatriz A. et al (2004) Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5828-5835,
4. Ferrer, I (2005) Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082 (2005) 81–90
5. G. Rene´ van der Hoff (1999) Trace analysis of pesticides by gas chromatography *Journal of Chromatography A*, 843, 301–322 Review
6. Gowik, P., Polzer J., (2003). AV 014-01-V06 Proceedings for the Validation of Test Methods 2003
7. Kaya, S.(1995). Veteriner Klinik Toksikoloji, Medisan Yayınevi, 1995

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

HAYVANSAL DOKU, YEM VE YEM HAMMADDELERİNDE AFLATOKSİN VE OKRATOKSİNİN LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu hayvansal dokularda, yem ve yem hammaddelerinde aflatoksin (B1,B2,G1,G2) ve okratoksinin (Okr-A) LC-MS/MS sistemi ile kantitatif belirlenmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, zehirlenme şüpheli olaylarda aflatoksinlerin (B1,B2,G1,G2) ve Okratoksinin (Okr-A) LC-MSMS sistemi ile kantitatif analizlerini kapsar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Okr-A: Okratoksin A

B1: Aflatoksin B1

B2: Aflatoksin B2

G1: Aflatoksin G1

G2: Aflatoksin G2

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MSMS: Likit Kromatografi – Kütle / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

ES: Eksternal standart

PP: Polipropilen

MW: molekül ağırlığı

DİS: Deiyonize su

MRL: Maksimum Kalıntı Limiti

MRPL: Minimum gerekli performans Limiti

Aflatoksin: Hayvanların beslenmesinde kullanılan yağlı tohumlu tahıllar başta olmak üzere üretimi, hasat edilmesi, depolanması ve karma yem üretimi aşamalarında uygun olmayan şartlara (yem, sıcaklık, ışık v.s.) maruz kaldığında bütünlüğü bozularak küflenme ve sonrasında da toksin üremeye başlar. Aspergillus türü mantarların sentezlediği bu aflatoksinler insan ve hayvanlar için toksiktir. Hayvan yetiştiriciliğinde başta kanatlılar olmak üzere duyarlı olan türlerde ciddi ekonomik kayıplara ve ölümlere neden olabilmektedir. Bu yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünlerde bulunan aflatoksin (B1,B2,G1,G2) kalıntıları tüketici durumunda olan insanlarda kansere neden olabilmektedir.

Okratoksin A: Aflatoksinlere benzer şekilde hayvanların beslenmesinde kullanılan yağlı tohumlu tahıllar başta olmak üzere üretimi, hasat edilmesi, depolanması ve karma yem üretimi aşamalarında uygun olmayan şartlara (yem, sıcaklık, ışık v.s.) maruz kaldığında bütünlüğü bozularak küflenme ve sonrasında da toksin üremeye başlar. Aspergillus ve Penicillium türü mantarlar tarafından üretilen bir okratoksin türüdür. Okr- A'nın deney hayvanlarında nefrotoksik etkisi kanıtlanmış ve böbrek için güçlü bir karsinogen olduğu belirlenmiştir

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Test metodu iki aşamadan oluşur;

1. Numunenin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve zenginleştirilmesi.
2. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. PP Santrifüj tüpü 15 mL'lik
2. PP Santrifüj tüpü 50 mL'lik
3. Enjektör 5 mL'lik
4. Filtre 0.45 µm
5. Ependrof tüpü
6. Pipet ucu (200, 1000 ve 5000 µL'lik)
7. Ayarlanabilir pipet 20–200 µL
8. Ayarlanabilir pipet 100–1000 µL
9. Ayarlanabilir pipet 500–5000 µL
10. Hassas terazi
11. Multireaks vorteks
12. Soğutmalı santrifüj
13. Aflatoksin LC--MSMS Kolonu 50 x 2,3 mm 3 µ
14. ZIVAK Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MSMS
15. Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Aflatoksin standart karışımları;

Tablo 1. Aflatoksin standart karışımlarının içerik, kütle değerleri ve konsantrasyonları.

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
Aflatoksin B1 (AFB1)	312	1000
Aflatoksin B2 (AFB2)	314	1000
Aflatoksin G1 (AFG1)	328	1000
Aflatoksin G2 (AFG2)	330	1000

2. Okratoksin standart karışımları;

Tablo 2. Okratoksin standart karışımlarının içerik, kütle değerleri ve konsantrasyonları.

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
Okratoksin A (Okr)	403	1000

3. Mikotoksin Analizi Kit İçeriği

Tablo 3. Mikotoksin (Aflatoksin-Okratoksin) Analizi Kit İçeriği

Malzeme kodu	Tanım	Adet	Açıklama
ZV-1031-02ST-50	Aflatoksin – okratoksin standart karışımı (50 MRL)	1	10 ml lik standart şişesi içerisinde 5 ml olarak verilir
ZV-1031-02R1-50	R1 reaktifi	1	1 L lik şişe içerisinde 1 L olarak verilir.
ZV-1031-02R2-50	R2 reaktifi	2	10ml lik şişe içerisinde 10 ml olarak verilir.
ZV-1031-02R3-50	R3 reaktifi	2	1 L lik şişe içerisinde 1 L olarak verilir.
ZV-1031-02R4-50	R4 reaktifi	1	180 ml lik şişe içerisinde 150 ml olarak verilir.
ZV-1031-02MA-50	Mobil faz A	1	1 litrelik şişe içerisinde verilir
ZV-1031-02MB-50	Mobil faz B	1	1 litrelik şişe içerisinde verilir
ZV-9007-0050	Santrifüj tüpü 50 ml lik	8	25 adetlik paketlerde
ZV-9008-0100	15 ml'lik cam tüp	2	100 adetlik paketlerde
ZV-9019-0100	Enjektör 2 ml'lik	2	100 adet/ paketlik
ZV-9018-0100	0.45 mikron filtre	2	100 adet/ paketlik
ZV-1031-50 C	Aflatoksin grubu LC-MSMS kolonu	1	Müşteri tarafından sipariş edilmelidir. Kit içerisinde yer almaz
ZV-9005-0200	Pipet ucu(5000 ul)	2	100 adet/paket
ZV-9003-0200	Pipet ucu (200 ul)	1	200 adet/paket
ZV-9005-0200	Pipet ucu(1000 ul)	1	250 adet/paket
ZV-9001-0200	Vial & Vial cap	2	100 adet/paket
ZV-1031-KK-T	Türkçe kullanım klavuzu	1	

7.3. Numune Analizi

1. 5 g öğütülmüş yem numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne tartılır.
2. 5 ml R1 ve 100 µl R2 eklenir. 30 sn vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
3. 10 ml R3 ilave edilir.
4. 2 dk vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
5. 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edilir.
6. Santrifüj sonunda, üstteki çözülden pipet ile 8 ml alınıp 15 ml'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında uçurulur. 0,75 ml R4 ilave edilerek çözülür.
7. Numune enjektöre takılan 0.45 mm filtreden süzülerek HPLC flakonuna alınır ve LC-MS/MS sistemine 20 µL enjeksiyon yapılır.

İlave standart hazırlanması

1. 5 g öğütülmüş yem numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne tartılır.
2. 100 µl standart karışımı eklenir.
3. 5 ml R1 ve 100 µl R2 eklenir. 30 sn vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
4. 10 ml R3 ilave edilir.
5. 2 dk vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
6. 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edilir.
7. Santrifüj sonunda, üstteki çözülden pipet ile 8 ml alınıp 15 ml'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında uçurulur.
8. 0,75 ml R4 ilave edilerek çözülür. Numune enjektöre takılan 0.45 mm filtreden süzülerek HPLC flakonuna alınır ve LC-MS/MS sistemine 20 µL enjeksiyon yapılır.

7.4. Cihaz Parametreleri

LC-MS/MS Parametreleri Tablo 4, 5 ve 6'da verilmiştir.

Tablo 4. Gradient pompa akış programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	100	0	0.20
01:30	100	0	0.20
09:00	0	100	0.20
09:01	100	0	0.20
13:00	100	0	0.20

Tablo 5. LC-MSMS Analitik Şartlar

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	50 psi
Drying gas temperature	350 °C
Drying gas pressure	35 psi
Scan Time	0.5 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 600V
Capillary	30V
Detector	+ 1800 V
CID Gas Pressure	2.00 mTorr
Spray Chamber T	60 °C
Mass peak width in amu	1.0
Quad 1	1.0
Quad 3	1.0

Aflatoksin – Okratoksin bileşiklerinin isimleri iyonları ve parçalanma ürünleri

Tablo 6. Aflatoksinlerin ve Okratoksinin iyonları ve parçalanma ürünleri

Analit	MW	Capillary	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Parçalanma Enerjisi
Aflatoksin B1 (AFB1)	312	30	313	285	-22
Aflatoksin B2 (AFB2)	314	30	315	287	-25
Aflatoksin G1 (AFG1)	328	30	329	243	-25
Aflatoksin G2 (AFG2)	330	30	331	245	-30
Okratoksin A (OKR)	404	30	404	239	-22

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Elde edilen LC-MSMS kromatogramları üzerinden cihazda var olan program ile kalibrasyonu incelenerek numuneye ait sonuçların değerlendirilmesi yapılır. Aflatoksin analizlerinde HPLC veya LC-MSMS tarama ve veya doğrulama yapılarak miktar tayini verilebilir. Pozitif şüpheli çıkan sonuçlar ile negatif sonuç alınanlar arasında 20 numuneyi temsilen rastgele bir örnekleme yapılarak analiz edilir ve sonuçları doğrulanmalıdır. Aflatoksinler hayvansal doku ve ürünlerde, yem ve yem

hammaddelerinde B1, B2,G1ve G2 metabolitleriyle bulunur. (süt için Af.M1)

Analiz numunesinden elde edilen kromatogramdaki ilgili piklerin alanları hesaplanır, ilave standart numunesi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki pik alanları hesaplanır.

Aşağıdaki formül kullanılarak miktarlandırılır, veya analitik sistemdeki otomatik hesaplama programı da kullanılarak hesaplanabilir. Kabul edilebilir değer veya hesaplanabilir düzeylerdeki bulgular raporlandırılır.

$$\text{İlgili Aflatoksin miktarı (ppb)} = \frac{A_T}{A_S} \times 20$$

A_T = Numune kromatogramındaki ilgili aflatoksin pik alanı

A_S = İlave standart kromatogramındaki ilgili aflatoksin pik alanı

Not. Validasyon ve Ölçüm Belirsizliği hesaplamaları EURACHEM, NMLK kriterlerine göre yapılır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. ANON. (1989). AOAC, Guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 72, pp. 694–704.
2. Kaya,S ve ark.. (1995), Veteriner Klinik Toksikoloji, Medisan Yayınevi, 1995
3. Barna - Vetro et al., 1996. I. Barna-Vetro, L. Solti, J. Teren, A. Gyöngyösi, E. Szabo and A. Wölfling, Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996), pp. 4071–4074. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (35)
4. De Saeger, S., Van Peteghem, C., 1999b. Detection of mycotoxins by flow-through membrane-based enzyme immunoassay. European Patent Application EP 0 893 690 A1. European Patent Office.
5. European Commission, 2000. European Commission, 2000. Draft Commission Decision laying down performance criteria for the analytical methods to be used for detecting certain substances and residues thereof in live animal and animal products according to Council Directive 96/23/EC repealing Commission Decision 90/515/EC, 93/256/EC and 93/257/EC. Directorate General for Public Health and Consumers Protection. SANCO/1805/2000.
6. FINK-GREMMELS (2008) Food Additives and Contaminants. Mycotoxins in cattle feeds and carry over to diary milk, A Review. 25(2):172-180.
7. EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Second Edition April 2000.
8. ISO Guide to Expression of Uncertainty in Measurement (ISO 1993)

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SÜT ve SÜT ÜRÜNLERİNDE AFLATOKSİN M1'İN LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu süt ve süt ürünlerinde aflatoksin (M1)'in LC-MS/MS sistemi ile kantitatif belirlenmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, zehirlenme şüpheli olaylarda aflatoksin (M1)'in LC-MS/MS sistemi ile kantitatif analizlerini kapsar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

M1: Aflatoksin M1

M2: Aflatoksin M2

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS/MS: Likit Kromatografi – Kütle / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

ES: Eksternal standart

PP: Polipropilen

MW: molekül ağırlığı

DİS: Deiyonize su

MRL: Maksimum Kalıntı Limiti

MRPL: Minimum gerekli performans Limiti

Aflatoksin: Hayvanların beslenmesinde kullanılan yağlı tohumlu tahıllar başta olmak üzere üretimi, hasat edilmesi, depolanması ve karma yem üretimi aşamalarında uygun olmayan şartlara (yem, sıcaklık, ışık v.s.) maruz kaldığında bütünlüğü bozularak küflenme ve sonrasında da toksin üremeye başlar. Aspergillus türü mantarların sentezlediği bu aflatoksinler hayvan yetiştiriciliğinde başta kanatlılar olmak üzere duyarlı olan türlerde ciddi ekonomik kayıplara, verim düşüklüğü ve neticesinde ölümlere neden olabilmektedir. Bu yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünlerde aflatoksin kalıntılarının (M1 ve M2) varlığı tüketici durumunda olan insanlar için ise kansere neden olabilmektedir. İnsan ve hayvanlarda zehirlenmelere yol açarlar

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Test metodu iki aşamadan oluşur;

1. Numunenin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve zenginleştirilmesi.
2. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. PP Santrifüj tüpü 15 mL'lik
2. PP Santrifüj tüpü 50 mL'lik
3. Enjektör 5 mL'lik
4. Filtre 0.45 µm
5. Ependrof tüpü
6. Pipet ucu (200, 1000 ve 5000 µL'lik)
7. Ayarlanabilir pipet 20–200 µL
8. Ayarlanabilir pipet 100–1000 µL
9. Ayarlanabilir pipet 500–5000 µL
10. Hassas terazi

11. Multireaks vorteks
12. Soğutmalı santrifüj
13. Aflatoksin LC--MSMS Kolonu 50 x 2,3 mm 3 µ
14. ZIVAK Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MSMS
15. Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Aflatoksin standart karışımları:

Tablo 1. Aflatoksin standart karışımlarının içerik, kütle değerleri ve konsantrasyonları.

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
Aflatoksin M1 (AFM1)	329	1000
Aflatoksin M2 (AFM2)	331	1000

2. Mikotoksin Analizi Kit İçeriği

Tablo 2. Mikotoksin (Aflatoksin M1, Aflatoksin M2) Analizi Kit İçeriği

Malzeme kodu	Tanım	Adet	Açıklama
ZV-1031-02ST-50	Aflatoksin M1, Aflatoksin M2 standart karışımı (50 MRL)	1	10 ml lik standart şişesi içerisinde 5 ml olarak verilir
ZV-1031-02R1-50	R1 reaktifi	1	1 L lik şişe içerisinde 1 L olarak verilir.
ZV-1031-02R2-50	R2 reaktifi	2	10ml lik şişe içerisinde 10 ml olarak verilir.
ZV-1031-02R3-50	R3 reaktifi	2	1 L lik şişe içerisinde 1 L olarak verilir.
ZV-1031-02R4-50	R4 reaktifi	1	180 ml lik şişe içerisinde 150 ml olarak verilir.
ZV-1031-02MA-50	Mobil faz A	1	1 litrelik şişe içerisinde verilir
ZV-1031-02MB-50	Mobil faz B	1	1 litrelik şişe içerisinde verilir

7.3. Numunenin Analizi

1. 5 mL Süt numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne tartılır.
2. 5 ml R1 ve 100 µl R2 eklenir. 30 sn vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
3. 10 ml R3 ilave edilir.
4. 2 dk vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
5. 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edilir.
6. Santrifüj sonunda, üstteki çözültiden pipet ile 8 ml alınıp 15 ml'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında uçurulur.0,75 ml R4 ilave edilerek çözülür.
7. Numune enjektöre takılan 0.45 mm filtreden süzülerek viallere alınır.
8. LC-MS/MS sistemine 10 µL enjeksiyon yapılır.

İlave standart hazırlanması

1. 5 mL süt numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne tartılır.
2. 100 µl standart karışımı eklenir.
3. 5 ml R1 ve 100 µl R2 eklenir. 30 sn vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
4. 10 ml R3 ilave edilir.
5. 2 dk vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
6. 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edilir.
7. Santrifüj sonunda, üstteki çözültiden pipet ile 8 ml alınıp 15 ml'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında uçurulur.
8. 0,75 ml R4 ilave edilerek çözülür. Numune enjektöre takılan 0.45 mm filtreden süzülerek HPLC flakonuna alınır ve LC-MS/MS sistemine 10 µL enjeksiyon yapılır.

7.4. Cihaz Parametreleri

LC-MS/MS'le ilgili parametreler Tablo 3, 4 ve 5'te verilmiştir.

1. LC-MS/MS Mobil Faz akış şartları

Tablo 3. Gradient pompa akış programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	100	0	0.20
01:30	100	0	0.20
09:00	0	100	0.20
09:01	100	0	0.20
13:00	100	0	0.20

2. Analitik Şartlar

Tablo 4. LC-MSMS Analitik Şartlar

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	50 psi
Drying gas temperature	350 °C
Drying gas pressure	35 psi
Scan Time	0.5 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 600V
Capillary	30V
Detector	+ 1800 V
CID Gas Pressure	2.00 mTorr
Spray Chamber T	60 °C
Mass peak width in amu	1.0
Quad 1	1.0
Quad 3	1.0

Aflatoksin M1, Aflatoksin M2 bileşiklerinin isimleri iyonları ve parçalanma ürünleri

Tablo 5. Aflatoksin M1 ve M2 nin iyonları ve parçalanma ürünleri

Analit	MW	Capillary	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Parçalanma Enerjisi
Aflatoksin M1 (AFM1)	329	40	330	285	-22
Aflatoksin M2 (AFM2)	331	30	332	285	-22

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Elde edilen LC-MSMS kromatogramları üzerinden cihazda var olan program ile kalibrasyonu incelenerek numuneye ait sonuçların değerlendirilmesi yapılır. Aflatoksin analizlerinde HPLC veya LC-MSMS tarama ve veya doğrulama yapılarak miktar tayini verilebilir. Pozitif şüpheli çıkan sonuçlar ile negatif sonuç alınanlar arasında 20 numuneyi temsilen rastgele bir örnekleme yapılarak analiz edilir ve sonuçları doğrulanmalıdır. Aflatoksinler, süt ve süt ürünlerinde M1 ve

M2 metabolitleriyle bulunur. Analiz numunesinden elde edilen kromatogramdaki ilgili piklerin alanları hesaplanır, ilave standart numunesi enjeksiyonundan elde edilen kromatogramdaki pik alanları hesaplanır.

Aşağıdaki formül kullanılarak miktarlandırılır, veya analitik sistemdeki otomatik hesaplama programı da kullanılarak hesaplanabilir. Kabul edilebilir değer veya hesaplanabilir düzeylerdeki bulgular raporlandırılır.

$$\text{İlgili Aflatoksin miktarı (ppb)} = \frac{A_T}{A_S} \times 20$$

A_T = Numune kromatogramındaki ilgili aflatoksin pik alanı

A_S = İlave standart kromatogramındaki ilgili aflatoksin pik alanı

Not. Validasyon ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplamaları EURACHEM, NMLK kriterlerine göre yapılır.

8- İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon (2000). European Commission, 2000. European Commission, 2000. Draft Commission Decision laying down performance criteria for the analytical methods to be used for detecting certain substances and residues thereof in live animal and animal products according to Council Directive 96/23/EC repealing Commission Decision 90/515/EC, 93/256/EC and 93/257/EC. Directorate General for Public Health and Consumers Protection. SANCO/1805/2000.
2. Anon.(2000)., EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Second Edition April 2000.
3. Anon (1993). ISO Guide to Expression of Uncertainty in Measurement (ISO 1993)
4. Kaya, S.(1989) Medisan Yayınevi, 1995 AOAC, 1989. AOAC, Guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 72 (1989), pp. 694–704.
5. Vetro, B. et al., (1996.) Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996), pp. 4071–4074. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (35)
6. De Saeger, S., Van Peteghem, C., 1999b. Detection of mycotoxins by flow-through membrane-based enzyme immunoassay. European Patent Application EP 0 893 690 A1. European Patent Office.
7. FINK-GREMMELS (2008) Food Additives and Contaminants. Mycotoxins in cattle feeds and carry over to diary milk, A Review. 25(2):172-180.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALDA AMİNOASİTLERİN LC-MSMS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu bal örneklerinde aminoasitlerin LC-MS/MS sistemi ile kantitatif analiz edilmesini amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu balda 19 aminoasit bileşiğinin (Tablo 1) varlığını ve miktarının belirlenmesini kapsar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılmaya kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

- HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi
LC/MSMS: Likit Kromatografi – Kütle / Kütle Spektrometresi
ESI: Elektro spreng iyonizasyon
ES: Eksternal standart
PP: Polipropilen
S1 :aminoasit mikş standart karışımı (Tablo 2)
R1: aminoasit dahili (internal) standart
R2 :ekstraksiyon çözeltisi (Ethyl acetate)
R3 :ekstraksiyon çözeltisi 3
R4 :ekstraksiyon çözeltisi 4
R5: ekstraksiyon çözeltisi 5
MFA.:Mobil faz A
MFB: Mobil Faz B

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Test metodu iki aşamadan oluşur;

1. Numunenin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve zenginleştirilmesi.
2. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1.Kullanılan Ekipmanlar

1. PP Santrifüj tüpü 15 mL'lik
2. PP Santrifüj tüpü 50 mL'lik
3. Enjektör 5 mL'lik
4. Filtre 0.45 µm
5. Ependrof tüpü
6. Pipet ucu (200, 1000 ve 5000 µL'lik)
7. Ayarlanabilir pipet 20–200 µL
8. Ayarlanabilir pipet 100–1000 µL
9. Ayarlanabilir pipet 500–5000 µL
10. Hassas terazi
11. Multireaks vorteks

12. Soğutmalı santrifüj
13. ZIVAK Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MSMS
14. ZIVAK-AA column 10 x 2.0µm
15. ZV-1002-KK-T : Amino Asit kiti
16. Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Standart karışımı (S1) ve iç standart karışımları IS (R1):

Aminoasit standart karışımı (S1) ve iç standart (IS) :

Bal ve bal peteği örneklerinde aranacak olan 19 aminoasit (S1 karışımı) ve iç standart -R1 (IS) bileşiklerine ait isimleri.

Tablo 1. S-1 karışımı, 19 aminoasit

Amino Asit	Konsantrasyon (ppb)
Alanin	26,75
Arginin	24,75
Asparagin	28,5
Aspartik Asit	31,25
Glutamin	26
Glutamik Asit	29,5
Glisin	27,25
Izolösin	26,75
Lösin	29,5
Lizin	34
Metyonin	29,5
Ornitin	36
Fenilalanin	25,25
Prolin	25,25
Serin	23,5
Treonin	28,25
Triptofan	22
Tirozin	25,5
Valin	29,5

2. R1, R2, R3, Bal örneklerinde aminoasit analizi için (R1: - 20 °C de saklanmalı, R2 ve R3 2-8 °C saklanmalıdır).

3. Mobil Faz A: Bal'da aminoasit için (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

4. Mobil Faz B: Bal'da aminoasit için (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

7.3. Numune Analizi

1. 1 g bal numunesi tartılarak üzerine 2 ml saf su eklenerek karıştırılır.
2. Homojenize edilmiş numunedan 100 µl (veya Kalibratör Level I ve II) cam örnek hazırlama tüplerine konur.
3. Üzerine 5 ml seyreltme çözeltilisi (Ethyl asetat %10+su%90+asetik asit%0.1) ilave edilerek şerbet haline gelene (10 dak) kadar vortekslenir.
4. Üzerine 100 µl R1 eklenerek 60 sn. vortexlenir.
5. 200 µl R2 eklenerek 60 sn. vortexlenir
6. 200 µl R3 eklenerek 60 sn. vortexlenir. 2 dakika beklenir tüp tekrar 10 sn. vortexlenir. 1 dakika daha beklenir.
7. 200 µl R4 eklenerek 60 sn. vortexlenir ve 1 dakika daha beklenir.
8. 6000 RPM`de 3 dakika santrifüj edilir.
9. Santrifüj sonunda, üst fazdan 200 µl cam tüpe alınarak, N2 altında 40 °C`de kuruluğa kadar uçurulur.
10. 500µl R5 ile çözülerek 1 dk vortekslenir,
11. Sonrasında tüp içindeki ekstrakt vialle alınarak LC-MS/MS sistemine 10 µL enjeksiyon yapılır.

7.4. Cihaz Parametreleri

Bal örneklerinde aminoasit analizi için LC MSMS parametreleri Tablo 2 ve 3'te yer almaktadır.

Tablo 2: LC-MSMS Parametreleri

Kol	Zivak / AA column 10 x 2,0 µm			
Enjeksiyon hacmi	10 µL			
Gradient program	Time (dakika)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)	Flow (mL/dak)
	0	50	50	0.25
	12	50	50	0.25
	12.01	0	100	0.25
	14	0	100	0.25
	14.01	50	50	0.25
18	50	50	0.25	
Kolon sıcaklığı	35 °C			
Akış hızı	0.25 ml/min			
Dwell Time	0,01			
Quad1 Quad 3	2			
Dedector	1300 V			
Needle Voltage	5000 V			
Spray Chamber Temperature	50 ° C			
Drying Gas Temperature	350 ° C			

Aminoasit LC-MS/MS iyonları ve parçalanma enerjileri

Aminoasit standart karışımı (S1) olarak kullanılmakta olan 19 adet amino asitin LC-MS/MS iyonları ve parçalanma enerjileri Tablo 2.de yer almaktadır.

Tablo 3. Amino asit std. Listesi ve parçalanma enerjileri.

Sıra no	Aminoasit	MW	MH+ (m/z)	MS/MS	CE	R.T
1	Alanin	89	218	130	10V	6.05
2	Arginin	174	303	156	15V	3.36
3	Asparagin	132	243	115	10V	4.46
4	Aspartik Asit	133	304	216	15V	9.06
5	Glutamin	146	275	172	15V	3.92
6	Glutamik Asit	147	318	172	15V	9.67
7	Glisin	75	204	76	8V	4.96
8	Izolösin	131	260	130	10V	11.85
9	Lösin	131	260	172	10V	11.35
10	Lizin	182	361	170	15V	9.05
11	Metyonin	149	278	142	15V	8.28
12	Ornitin	168	347	156	15V	7.80
13	Fenilalanin	165	294	164	15V	11.52
14	Prolin	115	244	156	15V	8.43
15	Serin	105	234	104	15V	4.38
16	Treonin	119	248	74	15V	5.04
17	Triptofan	204	333	245	15V	10.19
18	Tirozin	181	396	222	15V	14.36
19	Valin	117	246	158	15V	9.49

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Elde edilen kromatografik piklere göre değerlendirme yapılır. Aminoasit analizlerinde kromatografik piklerin alan hesaplamalarına göre değerlendirilir. Numuneye ait piklerle standarda ait pikler ve bunların saflık, dilüsyon, tartım ve enjeksiyon volümleri gibi spesifik özellikleri hesaplamada faktör olarak kullanılır. Hassas analitik cihazların kendi konfirmasyon metotları sayesinde tüm veriler girilerek otomatik hesaplama yöntemleri de kullanılabilir. Bu şekilde LC-MS/MS de görüntülenebilen aminoasitlerin önemli bir kısmı teşhis edilebilir.

Bal örneklerinde aminoasit analizi metodu validasyon raporunda 19 adet aminoasite ait analitik parametreler de yer almaktadır.

Not. Validasyon ve ölçüm belirsizliği Eurachem ve ISO Guide'e göre yapılır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR/KAYNAKLAR ve EKLER

- 1- EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Second Edition April 2000
- 2- ISO Guide to Expression of Uncertainty in Measurement (ISO 1993)
- 3- Bogdanov, S.(2009) Honey Composition, Book of Honey, Chapter 5 , Bee Product Science, August 2009
- 4- Simek, P. and Hušek, P.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

ZEHİRLEME ŞÜPHELİ METARYALLERDE PESTİSİTLERİN GC- MS TEKNİĞİYLE TARAMA ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Zehirlenme şüphesi ile laboratuara gönderilen hayvanlara ait iç organ, yem, su ve zehirlenmeye neden olduğu düşünülen şüpheli maddelerde pestisidlerin Gaz kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) yöntemi ile tarama analizleri yapılması amaçlanmaktadır.

2.UYGULAMA ALANI

Bu metot, zehirlenme şüphesi ile gelen materyallerde organik klorlu, organik fosforlu, karbamat, rat zehirleri ve fungusitlerin GC-MS sisteminde kalitatif tespiti için uygulanır.

3.TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kimyasallar hazırlanırken ağızla çekilmemeli ve pipetör kullanılmalıdır.
2. Eldiven ve gözlükle çalışma yapılmalıdır.
3. Atıklar, kimyasal atık şişesine atılmalıdır.
4. Çeker ocak içinde çalışılmalıdır.
5. Sıvı ve katı laboratuvar atıkları biyolojik tehlike olarak önem arz ettiği için, ihrak fırınında imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR / TANIMLAR

NaCl: Sodyum Klorür

GC-MS: Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi

Pestisit: İnsan ve hayvan vücudu ile bitkiler üzerinde veya çevresinde yaşayan, besin kaynaklarının üretim, depolanma ve tüketimi sırasında besin değerini düşüren ya da zarara uğratan böcek, kemirici, yabani ot, mantar gibi canlı formlarının yıkıcı etkilerini azaltmak için kullanılan kimyasal maddelerdir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Test metodu, laboratuvara gönderilen numunenin özütlenerek, elde edilen özütte pestisitlerin varlığının GC-MS cihazında kütle dedektörde kalitatif olarak tanımlanmasıdır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Zehirlenme olayı ile ilgili hayvan organ ve dokuları ile mide-bağırsak içeriği, yem örneği, su, şüpheli katı veya sıvı gıda maddesi, enjektör içeriği, toz vb. materyal olarak kullanılır.

1.1.1. Kullanılan Ekipman

- Parçalayıcı
- Hassas Terazi
- Erlenmayer
- Karıştırıcı
- Süzgeç kağıdı
- Cam ayırma hunisi, 250 ml.
- Huni
- Mezür, 250 ml.
- Enjektör
- PTFE Filtre
- Vial
- Balon joje, 1000 ml.
- Armudi balon, 250 ml.
- Evaporatör
- Mikropipet, 1 ml.
- Pipet ucu, 1 ml.
- Ultrasonik su banyosu
- GC-MS ve ekipmanları

7.2. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanması

7.2.1. Kullanılan Kimyasallar

Analitik saflıkta;

- Asetonitril

- Sodyum klorür (NaCl)
- n-hekzan
- Kloroform
- Susuz sodyum sülfat
- Metanol
- Aseton
- Pestisit standartları; Organik fosforlu (azinfos-etil, azinfos-metil, carbofenthion, klorprifos-metil, diklorfos, etrimfos, fenklorfos, fenitrotiyon, fonofos, heptanofos, isofenfos, metakrifos, mevinfos, pentoat, forat, fosmet, primifos-metil, sulfotep, tetraklorvinfos, metamidofos, dimetoat), organik klorlu (endosülfan), karbamat (metomil, karbaril), fungusid (metalaxyl, etoksiquin), herbisid (atrazin, molinate, simazine), akarısıd (mecarbam, methidathion), rat zehiri (kumarin).

7.2.2. Kimyasalların Hazırlanması

% 2 Sodyum Klorür: Hassas terazide 20 gr. NaCl tartılır, 1 litrelik balon jojeye aktarılır. Üzerine bir miktar distile su ilave edilir. Karıştırılarak sodyum klorür eritilir. Çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanır.

7.3. Numunenin Ekstraksiyonunun Yapılması ve Analiz Sonucunun Değerlendirilmesi

7.3.1. Numunenin Ekstraksiyonunun Yapılması

- Doku-organ örnekleri önce parçalayıcıda parçalanır.
- Erlenmayer içine 25 gr. numune tartılır. Su numunesi direk olarak 200 ml. alınır.
- Üzerine 75 ml. asetonitril ilave edilir. Karıştırıcı ile karıştırılır.
- 2-24 saat arasında bekletilir.
- Süzgeç kağıdı ve huni kullanılarak bir erlenmayer içine numune süzülür.
- Süzüntünün üzerine 125 ml. % 2 lik tuzlu su ilave edilir. Su numunesine sadece 4 gr. NaCl ilave edilir.
- Üzerine 50 ml n-hekzan ilave edilir, ayırma hunisine alınarak karıştırılır. Faz ayırımına kadar beklenir.
- Fazlar ayrılınca alt faz ayrı bir erlenmayere alınır. Üst faz, içine bir miktar sodyum sülfat konulan süzgeç kağıdından geçirilerek armudi balon içine süzülür.
- Alt faz üzerine 50 ml. kloroform ilave edilir. Ayırma hunisine aktarılır, karıştırılır, faz ayırımına kadar beklenir.
- Faz ayırımından sonra alt faz aynı armudi balon içine süzülerek fazlar birleştirilir.
- Evaporatörde vakum pompası ve ısı yardımıyla balon içeriği kuruluğa kadar buharlaştırılır.

- Kurumuş olan özüt 2 ml. metanol ilave edilerek ultrasonik banyosunda çözdürülür.
- Özüt PTFE filtreden geçirilerek GC-MS vialine alınır ve cihaza enjekte edilir.

7.3.2. Analiz sonucunun değerlendirilmesi

Cihazın analizi bitirmesinden sonra hafızasındaki kütüphanelere tarama yaptırılır. Numunede % 70 ve üzerinde benzerlik tespit edilen pestisit bileşiklerine ait pikler dikkate alınır. İlgili bileşik laboratuvarımızda daha önceden tespit edilen bileşiklerden ise standartla karşılaştırılarak sonuç “tespit edildi” ya da “tespit edilebilir düzeyde bulunamadı” olarak raporlanır. İlgili bileşik laboratuvarımızda daha önceden tespit edilen bileşiklerden değilse ilgili bileşik standardı değişik konsantrasyonlarda cihaza enjekte edilerek bileşiğin alıkonulma zamanı ve tespit limiti belirlenir. Numunede tespit edilen bileşiğin alıkonulma zamanı, saf standardın alıkonulma zamanı uyumlu ise, sonuç “tespit edildi”, uyumsuz ise “tespit edilebilir düzeyde bulunamadı” olarak raporlanır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Mills, P.A.(1959) *Detection and semiquantitative estimation of chlorinated organic pesticide residues in food by paper chromatography*. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 42: 734-740.
2. Pelosi, P., Stefanelli, P., Attard Barbini, D., Generalli, T., Amendola, G., Girolimetti, S., Vanni, F., Di Muccio, A. (2002) *Methods for organochlorine, organophosphorus, pyrethroid and carbamate pesticide residues in foods of animal origin*. The Italian National Reference Laboratory (Pesticide Residues Section of the ISS-Istituto Superiore di Sanita (National Institute of Health)-Roma.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

HAYVANSAL DOKULAR, YEM VE SUDA BAZI ELEMENTLERİN ICP-MS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Zehirlenme şüphesi ile laboratuara gönderilen hayvanlara ait iç organ, yem, su ve zehirlenmeye neden olduğu düşünülen şüpheli maddelerde metallerin Inductively Coupled Plasma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) yöntemi ile kantitatif tespitini amaçlamaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, zehirlenme şüphesi ile gelen materyallerde arsenik (As), kadmiyum (Cd), civa (Hg), kurşun (Pb), bakır (Cu), alüminyum (Al), çinko (Zn), nikel (Ni), selenyum (Se), demir (Fe), krom (Cr), kalsiyum (Ca) magnezyum (Mg), mangan (Mn), talyum (Tl), kobalt (Co) metallerinin ICP-MS sisteminde kantitatif tespiti için uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR:

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

- Kimyasallar hazırlanırken ağızla çekilmemeli ve pipetör kullanılmalıdır.
- Eldiven, laboratuvar önlüğü ve gözlükle çalışma yapılmalıdır.
- Atıklar, kimyasal atık şişesine atılmalıdır.
- Çeker ocak içinde çalışılmalıdır.
- Basınçlı kapların kapakları üst kapak sabit tutularak alt hazneden çevrilerek kapatılmalıdır.
- Basınçlı kaplar belirli bir süre bekletildikten sonra üst kapak sabit tutularak alt hazneden çevrilerek çeker ocak içerisinde açılmalıdır.
- Sıvı ve katı laboratuvar atıkları biyolojik tehlike olarak önem arz ettiği için, ihrak fırınında imha edilmelidir.

5. KISALTMALAR / TANIMLAR

ICP-MS: Inductively Coupled Plasma-Kütle Spektrometresi

Metal - Element: Hayvanlarda akut, subakut ve kronik zehirlenme ile önemli

ölçüde çevre ve besin kirlenmesine yol açabilen arsenik (As), kadmiyum (Cd), civa (Hg), kurşun (Pb), bakır (Cu), alüminyum (Al), çinko (Zn), nikel (Ni), selenyum (Se), demir (Fe), krom (Cr), kalsiyum (Ca) magnezyum (Mg), mangan (Mn), talyum (Tl), kobalt (Co) vb. metallerdir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Test metodu, laboratuvara gönderilen numunenin mikrodalga yakma sisteminde yüksek basınç ve sıcaklıkta organik kısımlarının yakılarak, elde edilen inorganik özütte metallerin ICP-MS cihazında kütle dedektörde kantitatif olarak tanımlanmasıdır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Zehirlenme olayı ile ilgili hayvan organ ve dokuları ile mide-bağırsak içeriği, yem örneği, su, şüpheli katı veya sıvı gıda maddesi, enjektör içeriği, toz vb. materyal olarak kullanılır.

7.1.1. Kullanılan Ekipman

1. Parçalayıcı
2. Hassas Terazî
3. Polipropilen tüp; 15 ml, 50 ml
4. Mikropipet; 1 ml, 5 ml, 100 µl, 10 µl.
5. Pipet ucu; 1 ml, 5 ml, 250 µl.
6. Mikrodalga yakma ünitesi ve basınçlı kapları (Berghof speedwave MWS-3 ve DAP 60)
7. ICP-MS ve ekipmanları
8. Balon joje; 100 ml, 1000 ml

7.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanması

7.1.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler (Analitik saflıkta);

1. Hidroklorik asit (HCl) %30
2. Nitrik asit(HNO_3) %65
3. Seyreltme çözeltisi (%2 HNO_3 +% 0.5 HCL)
4. Dahili standart stok çözeltisi (ISTD): Radyum (Rh), germanyum (Ge), lutesyum (Lu), Skandinyum (Sc)
5. Çoklu element kalibrasyon çözeltisi (AccuTrace MES-21-1): Arsenik (As), kadmiyum (Cd), civa (Hg), kurşun (Pb), bakır (Cu), aliminyum (Al), çinko (Zn), nikel (Ni), selenyum (Se), demir (Fe), krom (Cr), kalsiyum (Ca) magnezyum (Mg), mangan (Mn), talyum (Tl) ,cobalt (Co).
6. Hg kalibrasyon çözeltisi (AccuTrace MES-21-HG-1)

7.1.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Seyreltme çözeltisi (%2 HNO_3 +% 0.5 HCL) : Hacmi 1 litre olan balon jøjeye bir miktar saf su konularak üzerine 22 ml HNO_3 , 11.4 ml HCl ilave edilir, hacmi saf su ile 1 litreye tamamlanır.

Dahili Standart: Hacmi 100 ml olan balon jøjeye dahili standart stok çözeltisinden 1 ml alınarak saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır.

Kalibrasyon çözeltisi Hazırlanması: Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için çoklu element kalibrasyon çözeltisi (AccuTrace MES-21-1)'nden 1 ml ve civa kalibrasyon çözeltisi (AccuTrace MES-21-HG-1)'nden 0.1ml alınarak seyreltme çözeltisi ile hacmi 10 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltiden 0, 5, 10, 50, 100 ve 200 µg/kg yoğunlukta çözeltiler hazırlanır.

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

7.2.1. Numune Analize Hazırlanması

1. Analiz edilecek örnekten numunenin cinsine göre 200-500 mg tartılarak mikrodalga yakma sistemine ait olan DAP-60 kap sistemine konulur.
2. Üzerine 6 ml nitrik asit (%65 suprapur) ve 2 ml HCl (%30) ilave edilir.
3. Kapağı kapatılan kap mikrodalga yakma ünitesine yerleştirilir.
4. Organik kısımları basınç ve sıcaklık etkisiyle yakılarak sıvı hale getirilir.
5. Yakma işlemi bittikten sonra numuneler tüplere alınır.
6. Seyreltme çözeltisi (%2 NH_3 + % 0.5 HCL) ile hacmi 50 ml'ye tamamlanır.
7. ICP- MS cihazına kalibrasyon eğrisi oluşturmak üzere farklı yoğunluklarda hazırlanan standart çözeltileri ardından numuneler verilir.

Tablo 1. Mikrodalga yakma ünitesi programı

Aşama	1	2	3	4
T (sıcaklık, °C)	155	200	50	50
P (basınç, psi)	30	30	0	0
Ta (geçiş zamanı, dk)	2	10	1	1
Zaman (dk)	15	30	15	1

Tablo 2. ICP-MS cihaz koşulları

Radyo frekans gücü	1550 W
RF matching	2.1 V
Örnek derinliği	8 mm
Taşıyıcı gaz	0.85 L/min
Dilüsyon gazı	0.13 L/min
S/C sıcaklığı	2°C
Nebulizer tipi	MicroMist

7.2.2. Analiz Sonucunun değerlendirilmesi

Cihaz önce kalibrasyon eğrisi hazırlamak üzere hazırlanan farklı element yoğunlukları içeren kalibrasyon çözeltilerindeki (0, 5, 10, 50, 100, 200 ppb ve civa için 0, 0.5, 1, 5, 10 ve 20 ppb) iyonları sayar ve software' e gönderir. Software belirtilen yoğunluk için sayılan iyon sayısına göre kalibrasyon eğrisi çizer. Numunede sayılan iyon sayısı kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırarak numunedeki miktarı mg/kg cinsinden verir.

7.3. Validasyon ve ölçüm belirsizliği hesaplamaları Eurachem ve NMKL Literatürleri kullanarak yapılır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Environmental Protection Agency, EPA 3052 (December 1996). Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices
2. Türka Standartları Enstitüsü, TS EN 13804 (Mart 2004). Gıdalar-Eser Elementlerin Tayini-Performans Ölçütleri, Genel Hususlar ve Numune Hazırlama.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

**Ulusal Kalıntı
İzleme Projesi**



BALDA NİTROFURAN İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1 AMAÇ

Balda nitrofuran grubu ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizlerinin yapılması.

2 UYGULAMA ALANI

Bu metot, balda toplam nitrofuran metaboliti kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

Furazolidone metaboliti : (AOZ) 3-amino-2-oxazolidinone,

Furaladone metaboliti: (AMÖZ) 5-methyl-morpholino-3-amino-2-oxazolidinone,

Nitrofurazone metaboliti: (SEM) semicarbazide,

Nitrofurantion metaboliti: (AHD) 1-aminohydantoin,

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
3. Her analizden önce cihaza 6 ng/mL'lik standart enjeksiyonu yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilir.
4. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanır. Kalite Kontrol Grafiğinin hazırlanması ve Kullanılması (P.19) Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.
5. Türevlendirme işlemi 16 saatten az olmamalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS: Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

IS : Internal standart (İç standart)

ES: Eksternal standart

2-NP-AOZ, 2-NP-AMAZ, 2-NP-AHD, 2-NP-SCA: Türevlendirilmiş nitrofuran metabolitleri

MRPL: (Minimum Requirement Performance Level) Gerekli minimum performans seviyesi

LOD: Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ: Ölçüm limiti (Limit of quantitation)

CC α : Karar limiti

CC β : Tespit limiti

CV: Tekraredilebilirlik (Repeatability)

PP: Polipropilen

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 4 aşamayı içermektedir;

1. Asidik ortamda seberst ve dokuya bağlı nitrofuran kalıntılarının 2-nitrobenzaldehit ile türevlendirilmesi,
2. Baz ilavesi ile türevlendirme reaksiyonunun durdurulması,
3. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
4. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- 1 PP Santrifüj tüpü 50 mL'lik
- 2 Cam tüp 15 mL'lik
- 3 Enjektör 2 mL'lik
- 4 0.45 mikron filtre
- 5 Pipet ucu (200–1000–5000 μ L'lik)
- 6 Ayarlanabilir pipet 20–200 μ L
- 7 Ayarlanabilir pipet 100–1000 μ L
- 8 Ayarlanabilir pipet 1000–5000 μ L
- 9 Hassas terazi
- 10 Çalkalamalı etüv

- 11 Multireaks vorteks
- 12 Soğutmalı santrifüj
- 13 Numune yoğunlaştırıcı
- 14 ZIVAK Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS
- 15 Kromatografik program: Tandem Gold Workstation

7.2. Kullanılan Kimyasallar

- S1: Balda nitrofuran analizi için ES (-20 °C'de saklanmalıdır).
- SNitrofuran standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/kg (ppb)
AMAZ	201,2	20
AOZ	102,1	20
AHD	151,5	20
SEM	111,5	20

- R1: Balda nitrofuran analizi için IS (-20 °C'de saklanmalıdır)
- R1 iç standart ve konsantrasyonu (Anaiz kiti bilgileri ekte yer almaktadır).

Analit	MW	Konsantrasyon µg/kg (ppb)
AMAZ-D5	206,2	40
AOZ-D5	106,1	40
SEM-13C15N2	114,5	100

- R2: Balda nitrofuran analizi için -%1 Asetik asit (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R3: Balda nitrofuran analizi için -DMSO (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R4: Balda nitrofuran analizi için -50 mmol Amonyum Format (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R5: Balda nitrofuran analizi için -Etil Asetat (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R6: Balda nitrofuran analizi için -Hekzan (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R7: Balda nitrofuran analizi için -Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- Mobil Faz A: Nitrofuran analizi için -%20 Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- Mobil Faz B: Nitrofuran analizi için -Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

7.3. Numunenin Analizi

- 2.0 g bal numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- 100 µL R1 ve 5 mL R2 ilave edilir, çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika karıştırılır.
- 300 µL R3 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 1 dakika karıştırılır.
- 50 rpm hıza ve 37 °C'ye ayarlı çalkalamalı etüvde 16 saat bekletilir.
- Türevlendirmeden sonra örnekler etüvden alınarak oda sıcaklığına gelmesi için beklenir.
- 700 µL R4 ilave edilir. Çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika karıştırılır.
- Üzerine 5 mL R5 ilave edilir. Çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 2 dakika karıştırılır.
- 3 mL R6 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 2 dakika karıştırılır.
- 4000 g'de 15°C' ye ayarlı santrifüjde 10 dk santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda, üstteki çözüldüden pipet ile 6 mL (2x3 mL) alınıp 15 mL'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında 42 °C sıcaklıkta ve 5,0 psi basınçta kurutulur.
- Kurutma işleminden sonra tüpe 1 mL R6 ilave edilir. Multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır. 750 µL R7 ilave edilir. Multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır. 2500 g'de 15°C' ye ayarlı santrifüjde 10 dakika santrifüj edilir, 5 dakika ortam sıcaklığında bekletilir.
- Enjektör yardımıyla alt fazdan dikkatlice numune alınır ve enjektöre takılan 0.45 mm filtreden geçirilerek polipropilen vialde alınır. LC-MS/MS sistemine 75 µL enjeksiyon yapılır.
- 3 adet 2.0 g blank bal numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- Üzerine aşağıdaki tabloya uygun S1 ilave edilir.

Dokudaki Konsantrasyon	0,5 µg/kg (0,5MRPL)	1 µg/kg (1MRPL)	1,5 µg/kg (1,5MRPL)
Eklenecek Standart Hacmi	50 µL	100 µL	150 µL

7.4. LC-MS/MS İLE DOĞRULAMA ANALİZİ

- HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	85	15	0.20
03:00	50	50	0.20
07:00	30	70	0.20
09:30	25	75	0.20
09:31	0	100	0.20
12:00	0	100	0.20
12:06	85	15	0.25
17:00	85	15	0.25
17:06	85	15	0.20
20:00	85	15	0.20

Kolon: Nitrofuran grubu HPLC kolonu 150x2,0 mm 4 μ .

Akış hızı: 0.20 mL/dak

Enjeksiyon hacmi: 50 μ L

Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 15:85 MeOH: Su karışımı (h/h)

- MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	400 °C
Drying gas pressure	40si
Scan Time	0.725 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 500V
Capillary	30V
Detector	+ 1700 V

CID Gas Pressure 2.00 mTorr

Spray Chamber T 65°C

Mass peak width in amu Q1=1.0 Q3=1.0

• MS-MS tarama parametreleri

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
2-NP-SEM	209,00	166,00	30	7	0,118
		134,00	30	9	0,118
		192,00	30	11	0,118
2-NP-AHD	249,00	134,00	30	9	0,059
		104,00	30	11	0,059
		178,00	30	9	0,059
2-NP-AOZ	236,00	134,00	30	9	0,059
		104,00	30	12	0,059
2-NP-AMÖZ	335,00	291,00	30	9	0,059
		262,00	30	7	0,059
		128,00	30	6	0,059
2-NP-AOZ-D4	240,00	134,00	30	9	0,059
2-NP-AMÖZ-D5	340,00	296,00	30	9	0,059
2-NP-SEM-13C15N2	212,00	168,00	30	7	0,059

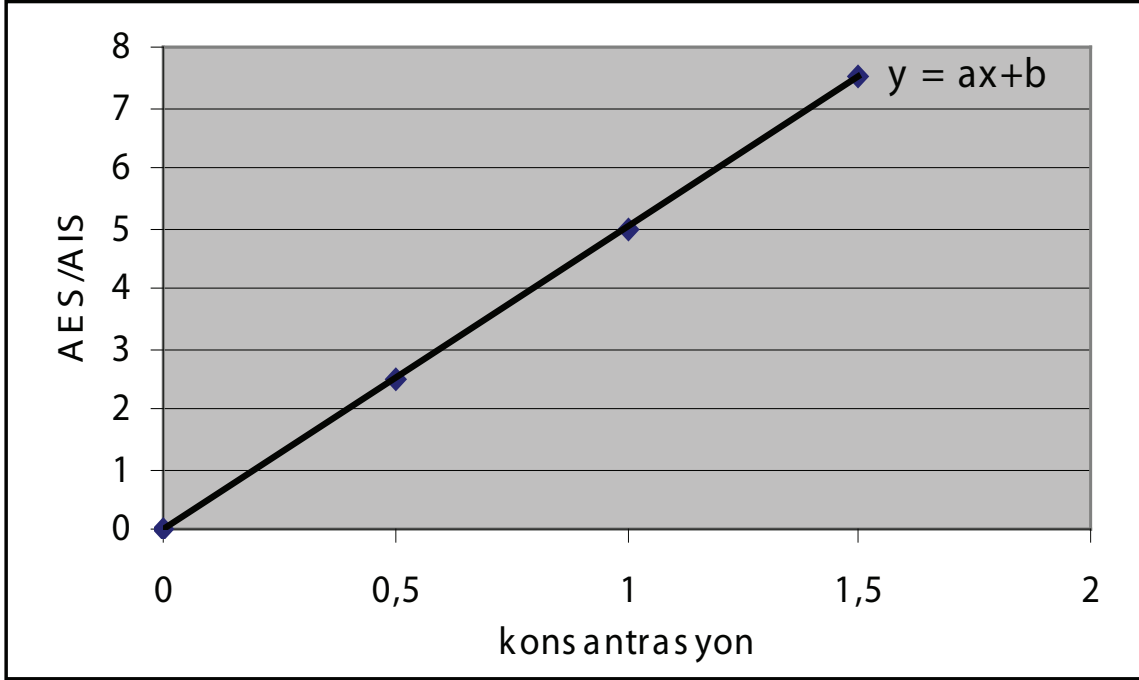
7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi Ve Hesaplanması

Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analiz edilir. Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamamıştır.” şeklinde raporlanır.

Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa doğrulama metodu (MS-MS tarama parametreleri aşağıdaki tabloda verilmiştir) ile cihaza enjeksiyon yapılır. Standartlardaki iyonların oranı ile numunedeki iyonların oranı karşılaştırılarak analiz sonucu değerlendirilir. Pozitif sonuçlar için hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır

Sonuçlar cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Her pik alanının iç standart pik alanına oranları hesaplanır. Hesaplanan bu değer konsantrasyona karşılık grafiğe geçirilir.



AES: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili nitrofuran pikinin alanı

AIS: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı Numune analizi sonucunda numunede tespit edilen nitrofuran pikinin alanı ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. ZİVAK ZV-1015-0200-45 LC-MS/MS Analiz Seti Bal Matrisinde Nitrofuran Grubu Antibiyotikler Kalıntı Analizi Talimatı (ZV-1015-0200-45-KK-T Rev.01)

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALIK KAS DOKUSUNDA TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ CHARM II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF ANALİZİ

1.AMAÇ

Bu test metodu, hayvansal gıda maddelerinde sınırlı düzeyde bulunmasına izin verilen antibiyotiklerden tetrasiklin türevi 4 etkin maddenin (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, doksisiklin) balık kas dokusunda Charm II yöntemi ile kalitatif tespitini amaçlamaktadır.

2.UYGULAMA ALANI

Bu metot, hayvansal gıda maddelerinden balık kas dokusunda tetrasiklin türevi (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin , doksisiklin) ilaçlara ait kalıntıların kalitatif tespiti için uygulanır.

Balık kas doku için tespit limitleri :

Tetrasiklin Bileşikleri	Balık Kas Dokusunda Tespit Limiti (µg/kg)	Balık Kas Dokusunda Maksimum Kalıntı Limiti (µg/kg)
Oksitetrasiklin	100	100
Tetrasiklin	20	100
Klortetrasiklin	100	100
Doksisiklin	100	Bulunmamalı

3.TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR ve ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
3. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
4. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin (numunenin) özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.

5. Kimyasallar hazırlanırken ağızla çekilmemeli ve pipetör kullanılmalıdır. Eldiven ve gözlükle çalışma yapılmalıdır. Atıklar, kimyasal atık şişesine doldurulmalıdır.

Charm- II testinin [3H] içeriği Nuclear Regulatory Commission ve Agreement State Regulations tarafından muaf tutulacak kadar düşüktür. Radyoaktif materyallere dokunduğunuz zaman aşağıdaki önlemleri alınız.

5.1. Pipetleme ağızla yapılmamalıdır.

5.2. Radyoaktif materyallere dokunurken sigara içmeyiniz, bir şey yemeyiniz ve kozmetik kullanmayınız. Bu esnada yemek sağlığı ciddi bir şekilde tehdit eder.

5.3. Radyoaktif materyallere dokunduktan sonra ellerinizi iyice yıkayınız.

5.4. Dökülen materyalleri hemen ve iyice siliniz.

5.5. Katı atıklar [³H] ya da [¹⁴C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller etiketlenerek karartıldıktan ya da uzaklaştırıldıktan sonra normal çöpe atılabilir.

5.6. Sıvı atıklar [³H] ya da [¹⁴C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller ya tıbbi atık çukurlarına konulmalı ya da bol su ile yıkanmalıdır. Belirtilen özel hususların dışında analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. TANIMLAR /KISALTMALAR

Analizör: Charm II 7600 analizörü. Cihaz örneklerin analizini yapar ve sayısal bir sonuç vererek yorumlar.

Bağlayıcı: Beyaz tablet. Bütün tetrasiklin türevi ilaçlara bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

Santrifüj Tüpü: 50 ml'lik konik tüpler. Örnek hazırlama ve ekstraksiyon aşamalarında kullanılır.

Kontrol Noktası: Negatif ve şüpheli pozitif sonuçların arasındaki kesişme noktasını gösteren sayıdır. Test sonuçlarının kontrol noktasından büyük olması örneğin negatif olduğunu, kontrol noktasından küçük veya eşit olması ise muhtemel pozitif olduğunu gösterir ve örneğin tekrar test edilmesi gerekebilir. Her yeni reaktif için yeni bir kontrol noktası oluşturulur ve bu kontrol noktası kitin son kullanma tarihine kadar geçerlidir.

CPM: Dakika sayıcısının kısaltmasıdır. Sonuç ölçüm birimi.

MRL Multi-Antimikrobiyal Standart: Amber şişe içerisinde toz halinde bulunan çeşitli antimikrobiyal ilaçlar içeren standart. 10 ml saf su ile çözüldüğünde 4000 ppb klortetrasiklin standardı içeren bir sıvı elde edilir. Bu standart örnek yüklemelerinde ve dilüe edilmiş pozitif kontrol yapmak için kullanılır.

Negatif Kontrol Standart: Antimikrobiyal ilaç içermeyen saf doku tozu. 10 ml saf su ile çözülür ve kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur..

Negatif Kontrol Ortalaması: 3 Negatif Kontrol CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Balık için kontrol noktası belirlenmesi esnasında kullanılır.

Optifluor : Radyoaktiviteyi açığa çıkaran sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [³H] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

Performans İzleme: Her çalışma gününde test prosedürünün doğrulanması ve ekipmanların fonksiyonlarını yerine getirebildiğinin görülmesi ve kontrol noktasının doğrulanmasıdır.

Pozitif Kontrol Ortalaması: 6 adet yüklü numunenin CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Kontrol noktası belirlenmesinde kullanılır.

ppb: Milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, µg/kg'a tekabül eder.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Tracer (Taşıyıcı) : Kit tableti üzerinde işaretlenmiş olan renkli tablet. Bu tablet [³H] ile işaretlenmiş olan klortetrasiklin standardı içerir.

Tipik Sayım Sayfası: kit için pozitif ve negatif kontrol noktalarının hesaplanacağı bir tablo içeren kit ile beraber verilen sayfa.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Balık kas dokusunda tetrasiklin türevi antibiyotiklerin test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip Charm-II cihazı ile tanımlanmasına yarayan hızlı bir immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1.Kullanılan Ekipman

1. Parçalayıcı
2. Hassas Terazî
3. Dereceli pipet: 2 ml, 5 ml ve 25 ml.
4. Santrifüj tüpü: Polipropilen 50 ml.
5. Balon joje: 50 ml,100 ml ve 1000 ml
6. Cam huni: 5cm ve 10 cm Ø.
7. Otomatik pipet: 1ml ve 5ml
8. Hassas terazi: CP 423 S (Sartorius, 1 mg hassasiyette)
9. Vorteks: Velp Scientetic, 0.0176
10. Soğutmalı santrifüj: Rotina 35 R (Hettich)
11. Charm-II inkübatör
12. Charm 7600 okuyucu
13. Otomatik pipet ucu: 1ml ve 5 ml

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tetrasiklin Standartları; Oksitetrasiklin , Tetrasiklin , Klortetrasiklin , Doksisisiklin

2. Negatif Kontrol Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml saf su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6 °C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

3. MRL Multi-Antimikrobiyal Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml saf su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6°C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

4. MSU Buffers

2-6 °C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. MSU Extraction Buffer 1 litre saf suda çözülür ve iyice karıştırılır.M2 Buffer ise 50 ml saf suda çözülerek hazırlanır. Çözülerek hazırlanmış olan tamponlar 2-6 °C'de 2 ay saklanabilir.

5. Optifluor

Radyoaktiviteyi açığa çıkaran sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [³H] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

6. Beyaz Tablet

Bütün tetrasiklin türevi ilaçlara bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

7. Renkli Tablet

Kit tableti üzerinde işaretle belirtilmiş olan renkli tablet. Bu tablet [³H] ile işaretlenmiş olan tetrasiklin standardı içerir.

7.3. Numune Analizi

Kontrol Noktasının Oluşturulması

1. 6 adet tetrasiklin türevi antibiyotiklerden biri olduğu bilinen balık kas dokusunda 100 ppb Klortetrasiklin içerecek şekilde yükleme yapılır.(Kontrol Noktasını oluşturmada kullanılan balık numunelerinin CPM değeri negatif kontrol ortalamasının + % 25 aralığında olması gerekir.)
2. Hazırlanan 6 adet yüklü numune analiz edilir.
3. Ortalama CPM değeri bulunur.
4. Ortalamaya %20 eklenerek kontrol noktası tespit edilir.

Numunelerin Hazırlanması

1. Numuneler derin dondurucuda saklanmalı ve 15 gün içinde analiz edilmelidir. Dondurulmuş örnekler bu şekilde 2 ay saklanabilir.

2. Donmuş numuneler çözüldükten sonra işleme tabi tutulur.
3. Çözünmüş olan numuneler mikser yardımıyla parçalanır ve homojen edilir.
4. Test, 4-35°C'de hava sirkülasyonu olan bir yerde yapılmalıdır. 12 örneğe kadar aynı anda test edilebilir.
5. Parçalanmış numuneden 50 ml santrifüj tüpüne 10 gr tartılır. Üzerine 30 ml MSU buffer konur ve 10 dakika karıştırıcıda karıştırılır.
6. 45 dakika 80+2°C'de sıcak su banyosuna konur. Daha sonra buradan alınıp buz banyosunda bekletilerek soğutulur. 4000 RPM'de ve 0-1°C'de 10 dakika santrifüj edilir.
7. Santrifüjden alınarak hemen üst sıvı fazdan 10 ml alınıp M2 buffer ile pH=7.5'a ayarlanır.

Numune Analizi Yapılması

1. Boş test tüpüne beyaz tablet eklenir.
2. 0.3 ± 0.1 ml (300 µl ± 100 µl) saf su eklenir.
3. Tablet parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
4. Test tüpünün içine 4.0 ± 0.25 ml örnek ya da standart eklenir (her bir örnek için yeni uç kullanılır).
5. Turuncu tablet test tüpüne ilave eklenir.
6. Test tüpünü mikserde 15 saniye alt üst ederek karıştırılır.
7. 35 + 1°C'de 5 dakika inkubasyona bırakılır.
8. 3300 rpm'de 5 dakika santrifüj eklenir.
9. Hemen üstteki ekstrakt dökülür (Santrifüj durduktan sonraki herhangi bir gecikme dipteki çökeltinin de ekstraktla birlikte dökülmesine neden olabilir). Test tüpünün kenarları emici bir kağıt havlu ile silinir.
10. Yağ tabakası swap yardımıyla uzaklaştırılır. Çökeltinin dağılmamasına dikkat edilmelidir.
11. 300 µl ± 100 µl saf su eklenir. Tablet parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
12. 3.0 ± 0.5 ml optiflour eklenir. Bulutumsu görüntü uniform bir şekilde dağılıncaya değin karıştırılır.
13. Analizörün içinde 60 saniye saydırılır. [³H] kanalındaki CPM değerini okuyunur. Pozitif ya da negatif belirlemeye göre kontrol noktası ile karşılaştırılır.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

1. Negatif kontrol, negatif kontrol ortalamasının + 20 % aralığında olmalıdır.
2. Pozitif kontrol, kontrol noktasından düşük olmalıdır.
3. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden büyükse örnek "negatiftir".
4. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden küçükse örnek "şüpheli pozitifdir".
5. Negatif olarak değerlendirilen örneklerin analiz sonucu negatif olarak raporlanır. Örnek 'şüpheli pozitif' olarak değerlendirildi ise örneğin konfirmasyon analizine alınması gerekir.
6. Ulusal Kalıntı İzleme Genelgesine göre belirli sayıda negatif örneği temsilen bir örnek konfirmasyon analizine alınır.

Şüpheli Pozitif Örneğin Analizi:

1. Bir adet negatif kontrol, bir adet pozitif kontrol ve şüpheli pozitif numune tekrar analiz edilir (negatif kontrol, 2 ml Tissue Performance Negative Concentrate ve 6 ml MSU Extraction Buffer

karıştırılarak ; pozitif kontrol ise 300 ml MSU Multi – Antimicrobial Concentrated Standart ve 6 ml MSU Extraction Buffer karıştırılarak hazırlanır).

2. Eğer bu koşullar sağlanamamışsa test tekrar edilir. Eğer hala sağlanamamışsa ilgili teknik servis ile kontak kurulur.
3. Eğer bu koşullar sağlanmışsa ve dilüe edilen örneklerin tekrar edilen test sonuçları kontrol noktasından düşük ya da kontrol noktasına eşitse örnekler “pozitifdir”.
4. Her çalışmadan önce bir adet negatif ve bir adet de pozitif kontrol hazırlanıp test edilmelidir. Bu, kontrol noktasını ve prosedürleri valide etmemizi sağlar.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
2. Bornova VKELaboratuvar Güvenliği Prosedürü
3. Bornova VKE Deney Metotları ve Deney Metotlarının Geçerli Kılınması Prosedürü
4. II Tetracycline Test for Maximum Residue Limits (MRL) Competitive Assay
5. Charm II Test for Tetracycline Drugs in Tissue 07/06
6. Charm Control Point Setup worksheets

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALIK DOKUSUNDA NİTROİMİDAZOL İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Balık dokusunda Nitroimidazol grubu ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizlerinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, balık dokusunda toplam Nitroimidazollerin ve metabolitlerinin kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

1. Metronidazol (MNZ), 1-(2-hidroksietil)-2-metil-5-nitroimidazol
2. Ronidazol (RNZ), 1-Metil-2-metil-5-nitroimidazol
3. Dimetridazol (DMZ), 1,2-Dimetil-5-nitroimidazol
4. Ipronidazol (IPZ), 2-İzopropil-1-metil-5-nitroimidazol
5. Metronidazol Hidroksit (MNZ-OH),
6. Ipronidazol Hidroksit (IPZ-OH),
7. 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazol (HMMNI),

Nitroimidazoller ve hidroksi metabolitleri, kimyasal yapı olarak Lewis-Base özelliğine sahip bileşiklere kapalı olan bileşiklerdir. Bu bileşikler ve metabolitleri karsinojenik ve mutajenik etkilidirler. Ronidazol, Metronidazol ve Dimetridazol, yasaklı ilaçlar (Annex IV of Concuil Regulation (EEC) No.2377/90) kapsamındadır (1).

Nitroimidazoller, özellikle kanatlı sektöründe koksidiyozis ve histomoniazisin tedavisi ve kontrolünde kullanılan antibiyotiklerdir. Ayrıca sığırların trikomoniazis ve domuzların hemorajik enteritlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. (1)

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
3. Her analizden önce cihaza 6 ng/ml'lik standart enjeksiyon yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilir.
4. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanmalı, grafiğinin hazırlanması ve kullanılması, Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmelidir.
5. Türevlendirme işlemi 16 saatten az olmamalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HPLC : Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS : Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI : Elektro sprey iyonizasyon

İS : İnternal standart (İç standart)

ES: Eksternal standart

DMZ-d3, HMMNI-d3, IPZ-d3, MNZ-¹³C₂¹⁵N₂, IPZOH-d3, MNZOH-d2, RNZ-d3: nitroimidazol metabolitleri

MNZ : Metronidazol, 1-(2-hidroksietil)-2-metil-5-nitroimidazol

RNZ : Ronidazol , 1-Metil-2-metil-5-nitroimidazol

DMZ : Dimetridazol , 1,2-Dimetil-5-nitroimidazol

IPZ : Ipronidazol, 2-İzopropil-1-metil-5-nitroimidazol

MNZ-OH:Metronidazol Hidroksit ,

IPZ-OH : Ipronidazol Hidroksit,

HMMNI: 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazol,

MRPL : (Minimum Required Performance Level) Gerekli minimum performans seviyesi

LOD : Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ : Ölçüm limiti (Limit of quantitation)

CC_α : Karar limiti

CC_β : Saptama yeteneği

CV : Tekraredilebilirlik (Repeatibility)

PP : Polipropilen

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 3 aşamayı içermektedir.

1. Proteinlerin çöktürülmesi ve uzaklaştırılması,
2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
3. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

- 1 Santrifüj tüpü 50 mL'lik,
- 2 Cam tüp 15 mL'lik,
- 3 Enjektör 2 mL'lik,
- 4 Filtre 0.45 µ,
- 5 Pipet ucu (200–1000–5000 µL'lik),
- 6 Ayarlanabilir pipet 20–200 µL (Medispec, Seri No:06102637),
- 7 Ayarlanabilir pipet 100–1000 µL (Medispec, Seri No:08114606),
- 8 Ayarlanabilir pipet 1000–5000 µL (Medispec, Seri No:08121266),
- 9 Hassas terazi (GB 10288),
- 10 Multireaks vorteks (253030604010507000009),
- 11 Soğutmalı santrifüj (GB 9969 ve GB 10439)
- 12 Numune yoğunlaştırıcı (GB 10378)
- 13 Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS
- 14 Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1)

7.2. Kullanılan Kimyasallar

1. S1: Balıkta nitroimidazol analizi için ES . (-20 °C'de saklanmalıdır).

S1 Nitroimidazol standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
DMZ	141	400
HMMNI	157	400
IPZ	169	400
MNZ	171	400

IPZOH	185	400
MNZOH	187	400
RNZ	200	400

2. R1: Balıkta nitroimidazol analizi için IS . (-20 °C'de saklanmalıdır).

R1 iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
DMZ-d3	144	400
HMMNI-d3	160	1200
IPZ-d3	172	400
MNZ- ¹³ C ₂ ¹⁵ N ₂	175	400
IPZOH-d3	188	400
MNZOH-d2	189	400
RNZ-d3	203	400

R2: Balık da nitroimidazol analizi için Etil Asetat . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

R3: Balık da nitroimidazol analizi için Hegzan . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

R4: Balık da nitroimidazol analizi için Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

Mobil Faz A: Nitroimidazol analizi için %50 Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

Mobil Faz B: Nitroimidazol analizi için Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

7.3. Numunenin Analizi

Kas Dokusunun Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyon

- 4.0 g balık numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- 100 µL R1 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 1 dakika karıştırılır.
- 10 mL R2 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 3 dakika karıştırılır.
- 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda, üstteki çözüldüden pipet ile 7 mL (2x3,5 mL) alınıp 15 mL'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında 37 °C sıcaklıkta ve 10.0 psi basınçta kurutulur.
- Kurutma işleminden sonra tüpe 1,5 mL R3 (2x750 µL) ilave edilir ve multireaks vorteksin 10. hızında 1 dakika karıştırılır.
- Üzerine 1 mL R4 ilave edilir ve multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır.
- Altta kalan fazdan enjektör yardımıyla dikkatlice numune alınır ve enjektöre takılan 0.45 mm filtreden geçirilerek polipropilen vialle alınır. LC-MS/MS sistemine 50 µL enjeksiyon yapılır.

Matris Standardının Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyon

- 3 adet 4.0 g blank doku numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- Üzerine aşağıdaki tabloya uygun S1 ilave edilir.

Dokudaki Konsantrasyon	0,5 µg/L (0,5MRPL)	1 µg/L (1MRPL)	1,5 µg/L (1,5MRPL)
Eklenecek Standart Hacmi	25 µL	50 µL	75 µL

7.4.LC-MS-MS ile Analiz

- HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	80	20	0.20
01:50	50	50	0.20
06:00	30	70	0.20
06:01	80	20	0.20
12:00	80	20	0.20

Kolon: Nitroimidazol grubu HPLC kolonu 150x2,0 mm 4µ .

Akış hızı: 0.20 mL/dak

Enjeksiyon hacmi: 50 µL

Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 15:85 MeOH: Su karışımı (h/h)

- MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	350 °C
Drying gas pressure	36 psi
Scan Time	0.700 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 500V
Capillary	30V
Detector	+ 1750 V

CID Gas Pressure 2.00 mTorr

Spray Chamber T 65°C

Mass peak width in amu Q1=1.0 Q3=1.0

□ MS-MS tarama parametreleri

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
DMZ	142	96	20 V	15	0,05
DMZ-d3	145	99	20 V	15	0,05
HMMNI	158	140	20 V	9	0,05
HMMNI-d3	161	143	20 V	9	0,05
IPZ	170	124	20 V	13	0,05
MNZ	172	128	20 V	9	0,05
IPZ-d3	173	127	20 V	15	0,05
MNZ- ¹³ C ₂ ¹⁵ N ₂	176	132	20 V	9	0,05
IPZOH	186	168	20 V	11	0,05
MNZOH	188	123	20 V	9	0,05
IPZOH-d3	189	171	20 V	11	0,05
MNZOH-d2	190	125	20 V	9	0,05
RNZ	201	140	20 V	9	0,05
RNZ-d3	204	143	20 V	11	0,05

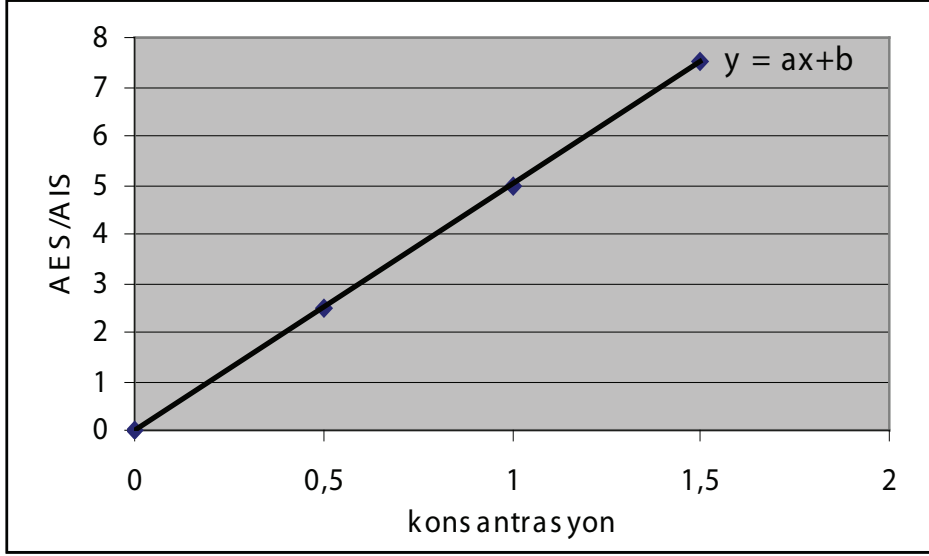
7.5. Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analiz edilir. Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamadı.” şeklinde raporlanır.

Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu pozitif olarak değerlendirilir ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır.

Sonuçlar cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Her pik alanının iç standart pik alanına oranları hesaplanır. Hesaplanan bu değer konsantrasyona karşılık grafiğe geçirilir.



AES: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili nitroimidazol pikinin alanı

AIS: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı Numune analizi sonucunda numunede tespit edilen nitrofuran pikinin alanı ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denklemde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Pendik VKE Doküman Veri Kontrol Prosedürü
2. Pendik VKE Metot Validasyonu Prosedürü
3. Pendik VKE Kalite Kontrol Prosedürü
4. ZİVAK ZV-1016-0200-35 LC-MS/MS Analiz Seti Doku Matrisinde Nitroimidazole Grubu Antibiyotikler Kalıntı Analizi Talimatı (ZV-1016-0200-35-KK-T Rev.01)

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan revizyonlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALIKTA NİTROFURAN İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1 AMAÇ

Balık dokusunda nitrofuran grubu ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizlerinin yapılması.

2 UYGULAMA ALANI

Bu metot, balık dokusunda toplam nitrofuran metaboliti kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

Furazolidone metaboliti : (AOZ) 3-amino-2-oxazolidinone,

Furaltadone metaboliti: (AMÖZ) 5-methyl-morpholino-3-amino-2-oxazolidinone,

Nitrofurazone metaboliti: (SEM) semicarbazide,

Nitrofurantion metaboliti: (AHD) 1-aminohydantoin,

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
3. Her analizden önce cihaza 6 ng/mL'lik standart enjeksiyonu yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilir.
4. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanır. Kalite Kontrol Grafiğinin hazırlanması ve Kullanılması (P.19) Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.
5. Türevlendirme işlemi 16 saatten az olmamalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 TANIMLAR

HPLC : Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS : Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI : Elektro sprey iyonizasyon

IS : Internal standart (İç standart)

ES : Eksternal standart

2-NP-AOZ, 2-NP-AMOZ, 2-NP-AHD, 2-NP-SCA: Türevlendirilmiş nitrofuran metabolitleri

MRPL: (Minimum Required Performance Level) Gerekli minimum performans seviyesi

LOD: Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ: Tespit limiti (Limit of quantitation)

CC α : Karar limiti

CC β : Tespit Limiti

CV: Tekraredilebilirlik (Repeatability)

PP: Polipropilen

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 4 aşamayı içermektedir;

- Asidik ortamda seberst ve dokuya bağlı nitrofuran kalıntılarının 2-nitrobenzaldehit ile türevlendirilmesi,
- Baz ilavesi ile türevlendirme reaksiyonunun durdurulması,
- Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
- LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- 1 PP Santrifüj tüpü 50 mL'lik
- 2 Cam tüp 15 mL'lik
- 3 Enjektör 2 mL'lik
- 4 0.45 mikron filtre
- 5 Pipet ucu (200–1000–5000 μ L'lik)
- 6 Ayarlanabilir pipet 20–200 μ L
- 7 Ayarlanabilir pipet 100–1000 μ L
- 8 Ayarlanabilir pipet 1000–5000 μ L
- 9 Hassas terazi
- 10 Çalkalamalı etüv
- 11 Multireaks vorteks
- 12 Soğutmalı santrifüj
- 13 Numune yoğunlaştırıcı

14 Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS**15** Kromatografik program: Tandem Gold Workstation**7.2. Kullanılan Kimyasallar**

S1: Dokuda nitrofuran analizi için ES . (-20 °C'de saklanmalıdır).

S1 Nitrofuran standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/kg (ppb)
AMÖZ	201,2	20
AOZ	102,1	20
AHD	151,5	20
SEM	111,5	20

R1: Dokuda nitrofuran analizi için İS . (-20 °C'de saklanmalıdır)

R1 iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/kg (ppb)
AMÖZ-D5	206,2	40
AOZ-D5	106,1	40
SEM-13C15N2	114,5	100

R2:Dokuda nitrofuran analizi için -%1 Asetik asit . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

R3: Dokuda nitrofuran analizi için -DMSO . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

R4: Dokuda nitrofuran analizi için -50 mmol Amonyum Format . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

R5: Dokuda nitrofuran analizi için -Etil Asetat . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

R6: Dokuda nitrofuran analizi için -Hekzan . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

R7: Dokuda nitrofuran analizi için -Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

Mobil Faz A:Nitrofuran analizi için -%20 Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

Mobil Faz B: Nitrofuran analizi için -Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

7.3. Numunenin Analizi

□ 2 g balık numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.

□ 100 µL R1 ve 5 mL R2 ilave edilir, çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika karıştırılır.

- 300 µL R3 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 1 dakika karıştırılır.
- 50 pm hıza ve 37 °C'ye ayarlı çalkalamalı etüvde 16 saat bekletilir.
- Türevlendirmeden sonra örnekler etüvden alınarak oda sıcaklığına gelmesi için beklenir.
- 700 µL R4 ilave edilir. Çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika karıştırılır.
- Üzerine 5 mL R5 ilave edilir. Çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 2 dakika karıştırılır.
- 3 mL R6 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 2 dakika karıştırılır.
- 4000 g'de 15°C'ye ayarlı santrifüjde 10 dk santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda, üstteki çözeltilerden pipet ile 6 mL (2x3 mL) alınıp 15 mL'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında 42 °C sıcaklıkta ve 5,0 psi basınçta kurutulur.
- Kurutma işleminden sonra tüpe 1 mL R6 ilave edilir. Multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır. 750 µL R7 ilave edilir. Multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır. 2500 g'de 15°C'ye ayarlı santrifüjde 10 dakika santrifüj edilir, 5 dakika ortam sıcaklığında bekletilir.
- Enjektör yardımıyla alt fazdan dikkatlice numune alınır ve enjektöre takılan 0.45 mm filtreden geçirilerek polipropilen vial alınır. LC-MS/MS sistemine 75 µL enjeksiyon yapılır.
- 3 adet 2.0 g blank balık numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- Üzerine aşağıdaki tabloya uygun S1 ilave edilir.

Dokudaki Konsantrasyon	0,5 µg/kg (0,5MRPL)	1 µg/kg (1MRPL)	1,5 µg/kg (1,5MRPL)
Eklenecek Standart Hacmi	50 µL	100 µL	150 µL

- Hazırlanan bu dokulara 7.2.1.2–7.2.1.12 numaralı işlemler uygulanır.

7.4. LC-MS/MS İle Doğrulama Analizi

- HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	85	15	0.20
03:00	50	50	0.20
07:00	30	70	0.20
09:30	25	75	0.20
09:31	0	100	0.20
12:00	0	100	0.20
12:06	85	15	0.25
17:00	85	15	0.25
17:06	85	15	0.20
20:00	85	15	0.20

Kolon: Nitrofuran grubu HPLC kolonu 150x2,0 mm 4 μ .

Akış hızı: 0.20 mL/dak

Enjeksiyon hacmi: 75 μ L

Otomatik örnekleme yıkama solventi: 15:85 MeOH: Su karışımı (h/h)

• MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	400 °C
Drying gas pressure	40si
Scan Time	0.725 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 500V
Capillary	30V
Detector	+ 1700 V

CID Gas Pressure

2.00 mTorr

Spray Chamber T

65°C

Mass peak width in amu

Q1=1.0

Q3=1.0

• MS-MS tarama parametreleri

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
2-NP-SEM	209,00	166,00	30	7	0,118
		134,00	30	9	0,118
		192,00	30	11	0,118
2-NP-AHD	249,00	134,00	30	9	0,059
		104,00	30	11	0,059
		178,00	30	9	0,059
2-NP-AOZ	236,00	134,00	30	9	0,059
		104,00	30	12	0,059
2-NP-AMAZ	335,00	291,00	30	9	0,059
		262,00	30	7	0,059
		128,00	30	6	0,059
2-NP-AOZ-D4	240,00	134,00	30	9	0,059
2-NP-AMAZ-D5	340,00	296,00	30	9	0,059
2-NP-SEM-13C15N2	212,00	168,00	30	7	0,059

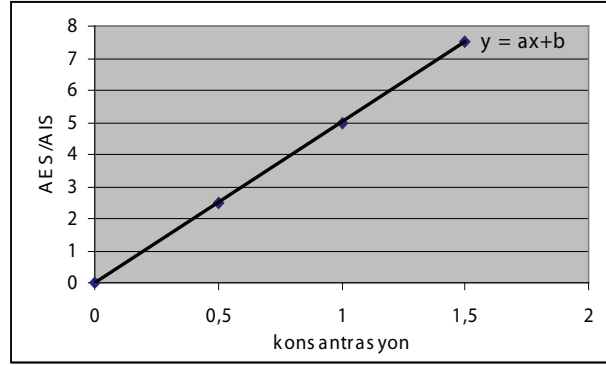
7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi Ve Hesaplanması

Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analiz edilir. Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamadı.” şeklinde raporlanır.

Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa doğrulama metodu (MS-MS tarama parametreleri aşağıdaki tabloda verilmiştir) ile cihaza enjeksiyon yapılır. Standartlardaki iyonların oranı ile numunedeki iyonların oranı karşılaştırılarak analiz sonucu değerlendirilir. Pozitif sonuçlar için hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır.

Sonuçlar cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Her pik alanının iç standart pik alanına oranları hesaplanır. Hesaplanan bu değer konsantrasyona karşılık grafiğe geçirilir.



AES: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili nitrofuran pikinin alanı

AIS: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı

Numune analizi sonucunda numunedeki tespit edilen nitrofuran pikinin alanı ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

7.6. 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. ZİVAK ZV-1015-0200-30 LC-MS/MS Analiz Seti Doku Matrisinde Nitrofuran Grubu Antibiyotikler Kalıntı Analizi Talimatı (ZV-1015-0200-30-KK-T Rev.01)

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI KARACİĞER DOKUSUNDA TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ CHARM II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF ANALİZİ

1.AMAÇ

Bu test metodu, hayvansal gıda maddelerinde sınırlı düzeyde bulunmasına izin verilen antibiyotiklerden tetrasiklin grubu 4 etkin maddenin (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin) kanatlı karaciğer dokusunda Charm II yöntemi ile kalitatif tespitini amaçlamaktadır.

2.UYGULAMA ALANI

Bu metot, hayvansal gıda maddelerinden kanatlı karaciğer dokusunda tetrasiklin grubu (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin , doksisisiklin) ilaçlara ait kalıntıların kalitatif tespiti için uygulanır.

Kanatlı karaciğer dokusu için tespit limitleri :

Tetrasiklin Bileşikleri	Kanatlı Karaciğer Dokusunda Tespit Limiti (µg/kg)	Kanatlı Karaciğer Dokuda Maksimum Kalıntı Limiti (µg/kg)
Oksitetrasiklin	100	300
Tetrasiklin	20	300
Klortetrasiklin	100	300
Doksisisiklin	100	300

3.TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
3. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
4. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin (numunenin) özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.

5. Kimyasallar hazırlanırken ağızla çekilmemeli ve pipetör kullanılmalıdır. Eldiven ve gözlükle çalışma yapılmalıdır. Atıklar, kimyasal atık şişesine doldurulmalıdır.

Charm- II testinin [3H] içeriği Nuclear Regulatory Commission ve Agreement State Regulations tarafından muaf tutulacak kadar düşüktür. Radyoaktif materyallere dokunduğunuz zaman aşağıdaki önlemleri alınız.

5.1. Pipetleme ağızla yapılmamalıdır.

5.2. Radyoaktif materyallere dokunurken sigara içmeyiniz, bir şey yemeyiniz ve kozmetik kullanmayınız. Bu esnada yemek sağlığı ciddi bir şekilde tehdit eder.

5.3. Radyoaktif materyallere dokunduktan sonra ellerinizi iyice yıkayınız.

5.4. Dökülen materyalleri hemen ve iyice siliniz.

5.5. Katı atıklar [³H] ya da [¹⁴C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller etiketlenerek karartıldıktan ya da uzaklaştırıldıktan sonra normal çöpe atılabilir.

5.6. Sıvı atıklar [³H] ya da [¹⁴C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller ya tıbbi atık çukurlarına konulmalı ya da bol su ile yıkanmalıdır. Belirtilen özel hususların dışında analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. TANIMLAR /KISALTMALAR

Analizör: Charm II 7600 analizörü. Cihaz örneklerin analizini yapar ve sayısal bir sonuç vererek yorumlar.

Bağlayıcı: Beyaz tablet. Bütün tetrasiklin türevi ilaçlara bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

Santrifüj Tüpü: 50 ml'lik konik tüpler. Örnek hazırlama ve ekstraksiyon aşamalarında kullanılır.

Kontrol Noktası: Negatif ve şüpheli pozitif sonuçların arasındaki kesişme noktasını gösteren sayıdır. Test sonuçlarının kontrol noktasından büyük olması örneğin negatif olduğunu, kontrol noktasından küçük veya eşit olması ise muhtemel pozitif olduğunu gösterir ve örneğin tekrar test edilmesi gerekebilir. Her yeni reaktif için yeni bir kontrol noktası oluşturulur ve bu kontrol noktası kitin son kullanma tarihine kadar geçerlidir.

CPM: Dakika sayıcısının kısaltmasıdır. Sonuç ölçüm birimi.

MRL Multi-Antimikrobiyal Standart: Amber şişe içerisinde toz halinde bulunan çeşitli antimikrobiyal ilaçlar içeren standart. 10 ml saf su ile çözüldüğünde 4000 ppb klortetrasiklin standardı içeren bir sıvı elde edilir. Bu standart örnek yüklemelerinde ve dilüe edilmiş pozitif kontrol yapmak için kullanılır.

Negatif Kontrol Standart: Antimikrobiyal ilaç içermeyen saf doku tozu. 10 ml saf su ile çözülür ve kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur.

Negatif Kontrol Ortalaması: 6 Negatif Kontrol CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Kontrol noktası belirlenmesi esnasında kullanılır.

Optifluor: Radyoaktiviteyi açığa çıkaran sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [³H] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

Performans İzleme: Her çalışma gününde test prosedürünün doğrulanması ve ekipmanların fonksiyonlarını yerine getirebildiğinin görülmesi ve kontrol noktasının doğrulanmasıdır.

Pozitif Kontrol Ortalaması: 3 adet pozitif kontrolün CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Alternatif kontrol noktası belirlenmesi çalışmaları esnasında kullanılır.

ppb: Milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, µg/kg'a tekabül eder.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Tracer (Taşıyıcı) : Kit tableti üzerinde işaretlenmiş olan renkli tablet. Bu tablet [³H] ile işaretlenmiş olan klortetrasiklin standardı içerir.

Tipik Sayım Sayfası: Her kit için pozitif ve negatif kontrol noktalarının hesaplanacağı bir tablo içeren kit ile beraber verilen sayfa.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kanatlı karaciğer dokusunda tetrasiklin grubu antibiyotiklerin test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip Charm-II cihazı ile tanımlanmasına yarayan hızlı bir immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

- Parçalayıcı
- Hassas Terazi
- Dereceli pipet: 2 ml, 5 ml ve 25 ml.
- Santrifüj tüpü: Polipropilen 50 ml.
- Balon joje: 50 ml,100 ml ve 1000 ml
- Cam huni: 5cm ve 10 cm Ø.
- Otomatik pipet: 1ml ve 5ml
- Hassas terazi: CP 423 S (Sartorius, 1 mg hassasiyette)
- Vorteks: Velp Scientetic, 0.0176
- Soğutmalı santrifüj: Rotina 35 R (Hettich)
- Charm-II inkübatör
- Charm 7600 okuyucu
- Otomatik pipet ucu: 1ml ve 5 ml

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tetrasiklin Standartları; Oksitetrasiklin , Tetrasiklin , Klortetrasiklin , Doksisiklin

2. Negatif Kontrol Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml saf su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6 °C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

3. MRL Multi-Antimikrobiyal Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml saf su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6°C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

4. MSU Buffers

2-6 °C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. MSU Extraction Buffer 1 litre saf suda çözülür ve iyice

kariştirilir. M2 Buffer ise 50 ml saf suda çözümlenerek hazırlanır. Çözümlenerek hazırlanmış olan tamponlar 2-6 °C'de 2 ay saklanabilir.

5. Optifluor

Radyoaktiviteyi açığa çıkaran sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [³H] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

6. Beyaz Tablet

Bütün tetrasiklin türevi ilaçlara bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

7. Renkli Tablet

Kit tableti üzerinde işaretle belirtilmiş olan renkli tablet. Bu tablet [³H] ile işaretlenmiş olan tetrasiklin standardı içerir.

7.3. Numune Analizi

Kontrol Noktasının Oluşturulması için;

1. 2 ml negatif kontrol standardı 6 ml MSU ekstraksiyon buffer ile kariştirilir (Bu karişım oda sıcaklığında 6 saat kadar dayanır).
2. 6 adet hazırlanan negatif kontrol karişımını analiz edilir.
3. Ortalama CPM değeri bulunur.
4. Ortalamadan %40 çıkarılarak kontrol noktası tespit edilir.

Numunelerin Hazırlanması

1. Numuneler derin dondurucuda saklanmalı ve 15 gün içinde analiz edilmelidir. Dondurulmuş örnekler bu şekilde 2 ay saklanabilir.
2. Donmuş numuneler çözüldükten sonra işleme tabi tutulur.
3. Çözünmüş olan numuneler mikser yardımıyla parçalanır ve homojen edilir.
4. Test, 4-35°C'de hava sirkülasyonu olan bir yerde yapılmalıdır. 12 örneğe kadar aynı anda test edilebilir.
5. Parçalanmış numunedan 50 ml santrifüj tüpüne 10 gr tartılır. Üzerine 30 ml MSU buffer konur ve 10 dakika kariştiricida kariştirilir.
6. 45 dakika 80+2°C'de sıcak su banyosuna konur. Daha sonra buradan alınıp buz banyosunda bekletilerek soğutulur. 4000 RPM'de ve 0-1°C'de 10 dakika santrifüj edilir.
7. Santrifüjden alınarak hemen üst sıvı fazdan 10 ml alınıp M2 buffer ile pH=7.5'a ayarlanır.

Analizin Yapılması

1. Boş test tüpüne beyaz tablet eklenir.
2. 0.3 ± 0.1 ml (300 µl ± 100 µl) saf su eklenir.
3. Tabletın parçalanması için 10 saniye kariştirilir (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
4. Test tüpünün içine 4.0 ± 0.25 ml örnek ya da standart eklenir (her bir örnek için yeni uç kullanılır).
5. Turuncu tablet test tüpüne ilave eklenir.
6. Test tüpünü mikserde 15 saniye alt üst ederek kariştirilir.
7. 35 + 1°C'de 5 dakika inkubasyona bırakılır.

8. 3300 rpm'de 5 dakika santrifüj eklenir.
9. Hemen üstteki ekstrakt dökülür (Santrifüj durduktan sonraki herhangi bir gecikme dipteki çökeltinin de ekstraktla birlikte dökülmesine neden olabilir). Test tüpünün kenarları emici bir kağıt havlu ile silinir.
10. Yağ tabakası swap yardımıyla uzaklaştırılır. Çökeltinin dağılmamasına dikkat edilmelidir.
11. 300 µl ± 100 µl saf su eklenir. Tablet in parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tablet in iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
12. 3.0 ± 0.5 ml optiflour eklenir. Bulutumsu görüntü uniform bir şekilde dağılıncaya değ in karıştırılır.
13. Analizörün içinde 60 saniye saydırılır. [³H] kanalındaki CPM değerini okuyunur. Pozitif ya da negatif belirlemeye göre kontrol noktası ile karşılaştırılır.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

1. Negatif kontrol, negatif kontrol ortalamasının ± 20 % aralığında olmalıdır.
2. Pozitif kontrol, kontrol noktasından düşük olmalıdır.
3. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden büyükse örnek “negatiftir”.
4. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden küçükse örnek “şüpheli pozitifdir”.
5. Negatif olarak değerlendirilen örneklerin analiz sonucu negatif olarak raporlanır. Örnek ‘şüpheli pozitif’ olarak değerlendirildi ise örneğin konfirmasyon analizine alınması gerekir.
6. Ulusal Kalıntı İzleme Genelgesine göre belirli sayıda negatif örneği temsilen bir örnek konfirmasyon analizine alınır.

Şüpheli Pozitif Örneğin Analizi:

1. Bir adet negatif kontrol, bir adet pozitif kontrol ve şüpheli pozitif numune tekrar analiz edilir (negatif kontrol, 2 ml Tissue Performance Negative Concentrate ve 6 ml MSU Extraction Buffer karıştırılarak; pozitif kontrol ise 300 ml MSU Multi – Antimicrobial Concentrated Standart ve 6 ml MSU Extraction Buffer karıştırılarak hazırlanır).
2. Eğer bu koşullar sağlanamamışsa test tekrar edilir. Eğer hala sağlanamamışsa ilgili teknik servis ile kontak kurulur.
3. Eğer bu koşullar sağlanmışsa ve dilüe edilen örneklerin tekrar edilen test sonuçları kontrol noktasından düşük ya da kontrol noktasına eşitse örnekler “pozitifdir”.
4. Her çalışmadan önce bir adet negatif ve bir adet de pozitif kontrol hazırlanıp test edilmelidir. Bu, kontrol noktasını ve prosedürleri valide etmemizi sağlar.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
2. Bornova VKE Laboratuvar Güvenliği Prosedürü
3. Bornova VKE Deney Metotları ve Deney Metotlarının Geçerli Kılınması Prosedürü
4. II Tetracycline Test for Maximum Residue Limits (MRL) Competitive Assay
5. Charm II Test for Tetracycline Drugs in Tissue 07/06
6. Charm Control Point Setup worksheets

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI KARACİĞERİNDE KLORAMFENİKOL KALINTILARININ ELISA YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu test metodu, gıda değeri olan hayvanlarda kullanımı yasaklanmış olan kloramfenikolün hindi ve tavuk karaciğerinde Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile kalitatif tespitini amaçlamaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, hayvansal gıda maddelerinden hindi ve tavuk karaciğeri numunelerinde kloramfenikolün kalitatif tespiti için uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Kanatlı Karaciğeri: Hindi karaciğeri, tavuk karaciğeri.

Absorbans: Bir ışık demeti bir maddeden geçerken ışığın madde tarafından emilen kısmı, geçirgenliğin negatif logaritması, optik yoğunluk, soğurganlık, OD.

ELISA: Enzym Linked Immuno Sorbent Assay. Belli bir enzimle işaretlenmiş test maddesi olan antijen veya antikor kullanılarak spesifik antijen veya antikoru belirleme amacıyla uygulanan, çok duyarlı bir laboratuvar yöntemi.

Kromojen: Pigment hâline dönüşebilen öncü madde; renk verici maddeyi oluşturan kendisi rensiz herhangi bir madde.

Substrat: Belirli bir enzimin özgün olarak etkilediği bir bileşik veya reaksiyona giren madde.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Blank: Negatif numune

Spayk: Standart yüklü numune

MRPL: Minimum Required Performance Limit, Gerekli En Az Performans Limiti

ppm: Parts per milion. Milyonda bir tanımlamasının kısaltmasıdır. mg/kg'a tekabül eder.

nm: Nanometre

ppb: milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, µg/kg'a tekabül eder.

ppt: Parts per trillion, trilyonda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, ng/kg'a tekabül eder.

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

N: Normal

OD: Optik dansite

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot hindi ve tavuk karaciğeri numunelerinde kloramfenikolün test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip ELISA yöntemi ile 450 nm dalga boyuna sahip spektrofotometrede (ELISA okuyucu) absorbansının ölçülmesine dayanan immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. Dereceli pipetler (1 ml, 5 ml ve 10 ml'lik)
2. Santrifüj tüpleri (Polipropilen 50 ml'lik)
3. Cam tüpler (vida kapaklı, 10 ml'lik)
4. Mezür (25 ml'lik)
5. Balon joje (10 ml, 50 ml, 100 ml ve 1000 ml'lik)
6. Cam huni (5cm ve 10 cm çapında)
7. Filtre (0,45 µm)
8. Otomatik pipetler (1ml ve 5ml'lik)
9. Mikropipet: 100µl ve 1000 µl
10. Otomatik ve mikropipet uçları
11. Blender
12. Karıştırıcı
13. Hassas terazi (1 mg hassasiyette)
14. Vorteks

15. Çoklu vorteks
16. Soğutmalı santrifüj
17. Çoklu uçurucu
18. ELISA plate okuyucu (Bio-Tek, EL808)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Etil Asetat, analitik saflıkta
2. N-Hekzan, analitik saflıkta
3. Methanol, analitik saflıkta
4. Referans Standart: Chloramphenicol (Sigma Aldrich, 31667, CAS:56-75-7)
5. Kloramfenikol Enzim Konjugatı,
6. Kromojen,
7. Stop Solüsyon,
8. Buffer
9. Mirotiterplatte (96' lık)
10. Kloramfenikol Standart Solüsyonları,
Standart 1: 0 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 2: 25 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 3: 50 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 4: 100 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 5: 250 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 6: 750 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
11. Yıkama Çözeltisi-PBST: Kit ile birlikte gelen yıkama solüsyonu bidistile su ile çözündürülüp son hacim 1000 ml' ye tamamlanır.1 ay buzdolabında saklanarak kullanılabilir
12. Kloramfenikol Enzim Konjugatı: Bir kısım kloramfenikol enzim konjugatı, on kısım buffer ile 1:11 oranında dilüe edilir.
13. Kloramfenikol Ana Stok Standardı (0,1 mg / ml-100 ppm): 10 ± 01 mg Kloramfenikol standardı, metanol ile 100 ml hacimli balonda çizgisine kadar dilüe edilir (karanlıkta -20 °C ile -30 °C arasındaki derin dondurucuda 3 ay saklanabilir).
14. Kloramfenikol Ara Stok Standardı (1 µg / ml-1 ppm): 100 µl Kloramfenikol Ana Stok solüsyonu, metanol ile 10 ml'lik ölçülü balonda ölçü çizgisine kadar dilüe edilir (karanlıkta -20 °C ile -30 °C arasındaki derin dondurucuda 1 ay saklanabilir).
15. Kloramfenikol Spayk Standardı (0.010µg/ml-10 ppb): 100 µl Kloramfenikol ara stok solüsyonu, saf su ile 10 ml'lik ölçülü balonda çizgisine kadar dilüe edilir (buzdolabında ve karanlıkta 1 hafta saklanabilir).

Not: Kitler kullanılmadan önce 2-8°C'ler arasında saklanmalıdır. Son kullanma tarihi geçen kitler kesinlikle kullanılmamalıdır. Kit içerisinden çıkan aynı lot numaralı solüsyonlar ile kullanılmalıdır; lot numarası farklı kitler ile solüsyonlar bir arada kullanılmamalıdır. Kullanımı tamamlanan tüm

solüsyonlar derhal buzdolabına konulmalıdır. Kitin kullanılmamış kısmı, orijinal ambalajında ve buzdolabında saklanmalıdır.

Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yönteminin tekrarlanabilirliği büyük ölçüde yıkama işlemi yapılan kuyucukların bir örnekliliğine bağlı olup, ELISA test prosedürü sıranın dikkatli bir şekilde takip edilerek uygulanması gerekmektedir. Test prosedürü aşamasında kit kuyucuklarının kurumasına asla izin verilmemelidir. Çalışmalar esnasında hazırlanan reagentlar el ile karıştırılmalı, kesinlikle vortex kullanılmamalıdır. İnkübasyon sırasında kuyucukların direk gün ışığına maruz kalmaması için, kuyucukların üzeri örtülmelidir. Kromojen ışığa duyarlı olduğundan, kuyucuklara kromojen ilave edildikten sonra inkübasyon sırasında karanlıkta bekletilmelidir. Renk bozukluğu şekillenen kromojen kullanılmamalıdır. 1 N sülfürik asit içeren stop solüsyonun kullanımı esnasında deri ile temasından kaçınılmalıdır. Yapılan kontrol sonucunda standartlar arasındaki korelasyonu uygun olmayan kitler kullanılmamalıdır. Standart 1 (0 ppt) solüsyonunda herhangi bir bozulma meydana geldiğinde, 0.6 absorbans ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) değerinden daha düşük bir absorbans değeri verdiği göz önünde bulundurulmalıdır. Standart 1 ve standart 4 absorbans değerleri arasında belirgin bir farklılık bulunmalıdır.

7.3. Numune Analizi

Analizin ana basamakları; Numunenin homojen hale getirilmesi, etil asetat ile ekstrakte edilmesi, azot gazı altında uçurularak bufer ile son hacmin elde edilmesi, uygun bir konjugat ve spesifik substrat aracılığı ile inkübasyona bırakılması, ELISA okuyucuda 450 nanometrede tespit edilmesi.

Analiz için;

1. Karaciğer numuneleri blendır yardımıyla parçalanır ve homojen hale getirilir.
2. Karaciğer numunesinden 50 ml'lik santrifüj tüpüne $4,0 \pm 0,1$ g tartılır.
3. Üzerine 4 ml saf su eklenir.
4. 10 ml etil asetat eklenerek 15 dk otomatik vorteks ile karıştırılır.
5. 15 dakika 20°C de 4000 rpm'de santrifüj edilir.
6. Üst fazdan 5 ml cam tüpe alınır. 55°C 'de azot gazı ile uçurulur.
7. 1 ml buffer ve 3ml n-heksan eklenir ve 15 dakika vortekslenerek çözülür.
8. 15 dakika 20°C de 4000 rpm'de santrifüj edilir.
9. Alt fazdan 0,5 ml mikropipet ile alınır.
10. 0,45 nm filtreden süzülerek 10 ml'lik cam tüplere alınır.

Homojenize edilmiş kontrol ve standart yüklü (10 ppb kloramfenikol spayk standardından her 1 gr örnek için 30 µl ilave edilir) örneklerle yukarıdaki ekstraksiyon işlemleri aynen tekrarlanır.

7.4. Mikroplate Uygulama

1. Kit içerisindeki plate ve tüm solüsyonlar analiz öncesinde, karanlık ortamda oda ısısına (20 – 25 °C) gelinceye kadar bekletilir.
2. Kullanılacak standart ve numune sayıları düşünülerek gerekli sayıda kuyucuk başka bir mikroplate alınır. Mikroplate yerleşim planı standartlar, kontrol örnekleri, spayk örnekleri, numuneler şeklinde olmalıdır (Tablo.2). Günlük laboratuvar çalışmalarında Std 1, 5 ve 6 kullanılır. Mikroplate yerleşim planı kullanılan standartlara uygun şekilde hazırlanır.

Tablo.1. Mikroplate Yerleşim Planı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	N1	N9	“	“	“	“	“	“	“	“	“
B	Std 2	N2	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
C	Std 3	N3	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
D	Std 4	N4	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
E	Std 5	N5	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
F	Std 6	N6	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
G	Blk	N7	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
H	Spk	N8	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“

Std: Kloramfenikol Standart Solüsyonu

Blk: Kontrol Örneği

Spk: Spayk Örneği

N: Numune

3. Tüm kuyucuklara ilgili standartlar ve örneklerden 50 µl eklenir.
4. Kuyucuklara 50'şer ml dilue edilmiş enzim konjugatı ilave edilir.
5. Mikroplate, karanlık bir ortamda, oda ısısında (20 – 25 °C) 1 saat süre ile inkübasyona bırakılır.
6. İnkübasyon süresi biten mikroplateye oda ısısına gelmiş yıkama solüsyonundan her bir kuyucuk için 250 µl olacak şekilde çoklu mikropipet yardımı ile eklenir, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırılır ve dökülür. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edilir.
7. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 100'er µl kromojen solüsyonundan ilave edilir.
8. Kromojen ilave edilmiş plate, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırılır.
9. Mikroplate, karanlık bir ortamda, oda ısısında (20 – 25 °C) 15 dakika süre ile inkübasyona bırakılır.
10. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 100 µl stop solüsyon ilave edilerek, mikroplate dikkatlice karıştırılır.
11. Mikroplate, ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda, 30 dakika içerisinde okutulmalıdır.

7.5. Analiz Sonuçlarının Değerlendirmesi

1. Sonuçların Değerlendirilmesi

Cut-off değerine eşit veya daha düşük absorbans veren örnekler şüpheli pozitif, daha yüksek absorbans veren örnekler negatif olarak değerlendirilir. Şüpheli pozitif olarak değerlendirilen örnekler konfirmasyon testi uygulanır. Kloramfenikol A6 grubunda bulunan yasaklı ilaçlardır. Minimum gerekli performans limiti 0.3 ppb olarak belirlenmiştir.

2. Geri Alım Değeri

1. Kontrol numunesinin ve spaykların absorbansları karşılaştırılarak,
2. Standart 4 ve spayk absorbansları karşılaştırılarak uygun bir geri alım yapıp yapılmadığına karar verilir.

Not: Bu test metodunda geçerlilik için, 2002/657 AB direktifi uygulanır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
2. ANONİM (2002a), 2002/657 AB direktifi Implementing Council Directive 96/23 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
3. Bornova VKE Laboratuvar Güvenliği Prosedürü
4. Bornova VKE Laboratuvarda Güvenli Çalışma Talimatı
5. Bornova VKE Enstitü Atıklarının İmhası Talimatı
6. R-Biopharm RİDESCREEN Chloramphenicol, Enzyme İmmunoassey fort the quantitative analysis of chloramphenicol Art No:R1505

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI KAS DOKUSUNDA TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ CHARM-II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF ANALİZİ

1. AMAÇ

Bu test metodu, hayvansal gıda maddelerinde sınırlı düzeyde bulunmasına izin verilen antibiyotiklerden tetrasiklin grubu 4 etkin maddenin (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin) kanatlı kas dokusunda Charm II yöntemi ile kalitatif tespitini amaçlamaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, hayvansal gıda maddelerinden kanatlı kas dokusunda tetrasiklin grubu (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin) ilaçlara ait kalıntıların kalitatif tespiti için uygulanır.

Kanatlı kas doku için tespit limitleri :

Tetrasiklin Bileşikleri	Kanatlı Kas Dokuda Tespit Limiti (µg/kg)	Kanatlı Kas Dokuda Maksimum Kalıntı Limiti (µg/kg)
Oksitetrasiklin	100	100
Tetrasiklin	20	100
Klortetrasiklin	100	100
Doksisisiklin	100	100

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
3. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
4. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin (numunenin) özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
5. Kimyasallar hazırlanırken ağızla çekilmemeli ve pipetör kullanılmalıdır. Eldiven ve gözlükle çalışma yapılmalıdır. Atıklar, kimyasal atık şişesine doldurulmalıdır.

Charm- II testinin [³H] içeriği Nuclear Regulatory Commission ve Agreement State Regulations tarafından muaf tutulacak kadar düşüktür. Radyoaktif materyallere dokunduğunuz zaman aşağıdaki önlemleri alınız.

5.1. Pipetleme ağızla yapılmamalıdır.

5.2. Radyoaktif materyallere dokunurken sigara içmeyiniz, bir şey yemeyiniz ve kozmetik kullanmayınız. Bu esnada yemek sağlığı ciddi bir şekilde tehdit eder.

5.3. Radyoaktif materyallere dokunduktan sonra ellerinizi iyice yıkayınız.

5.4. Dökülen materyalleri hemen ve iyice siliniz.

5.5. Katı atıklar [³H] ya da [¹⁴C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller etiketlenerek karartıldıktan ya da uzaklaştırıldıktan sonra normal çöpe atılabilir.

5.6. Sıvı atıklar [³H] ya da [¹⁴C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller ya tıbbi atık çukurlarına konulmalı ya da bol su ile yıkanmalıdır. Belirtilen özel hususların dışında analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Analizör: Charm II LSC7600 analizörü. Cihaz örneklerin analizini yapar ve sayısal bir sonuç vererek yorumlar.

Bağlayıcı: Beyaz tablet. Bütün tetrasiklin türevi ilaçlara bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

Santrifüj Tüpü: 50 ml'lik konik tüpler. Örnek hazırlama ve ekstraksiyon aşamalarında kullanılır.

Kontrol Noktası: Negatif ve şüpheli pozitif sonuçların arasındaki kesişme noktasını gösteren sayıdır. Test sonuçlarının kontrol noktasından büyük olması örneğin negatif olduğunu, kontrol noktasından küçük veya eşit olması ise muhtemel pozitif olduğunu gösterir ve örneğin tekrar test edilmesi gerekebilir. Her yeni reaktif için yeni bir kontrol noktası oluşturulur ve bu kontrol noktası kitin son kullanma tarihine kadar geçerlidir.

CPM: Dakika sayıcısının kısaltmasıdır. Sonuç ölçüm birimi.

MRL Multi-Antimikrobiyal Standart: Amber şişe içerisinde toz halinde bulunan çeşitli antimikrobiyal ilaçlar içeren standart. 10 ml saf su ile çözüldüğünde 4000 ppb klortetrasiklin standardı içeren bir sıvı elde edilir. Bu standart örnek yüklemelerinde ve dilüe edilmiş pozitif kontrol yapmak için kullanılır.

Negatif Kontrol Standart: Antimikrobiyal ilaç içermeyen saf doku tozu. 10 ml saf su ile çözülür ve kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur..

Negatif Kontrol Ortalaması: 6 Negatif Kontrol CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Karaciğer için kontrol noktası belirlemesi esnasında kullanılır.

Optifluor: Radyoaktiviteyi açığa çıkaran sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [³H] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

Performans İzleme: Her çalışma gününde test prosedürünün doğrulanması ve ekipmanların fonksiyonlarını yerine getirebildiğinin görülmesi ve kontrol noktasının doğrulanmasıdır.

Pozitif Kontrol Ortalaması: 3 adet pozitif kontrolün CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Alternatif kontrol noktası belirlenmesi çalışmaları esnasında kullanılır.

ppb: Milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, µg/kg'a tekabül eder.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Tracer (Taşıyıcı): Kit tableti üzerinde işaretli belirtilmiş olan renkli tablet. Bu tablet [³H] ile işaretlenmiş olan klortetrasiklin standardı içerir.

Tipik Sayım Sayfası: Her kit için pozitif ve negatif kontrol noktalarının hesaplanacağı bir tablo içeren kit ile beraber verilen sayfa.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kanatlı kas dokusunda tetrasiklin grubu antibiyotiklerin test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip Charm-II cihazı ile tanımlanmasına yarayan hızlı bir immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

- Parçalayıcı
- Hassas Terazî
- Dereceli pipet: 2 ml, 5 ml ve 25 ml.
- Santrifüj tüpü: Polipropilen 50 ml.
- Balon joje: 50 ml,100 ml ve 1000 ml
- Cam huni: 5cm ve 10 cm Ø.
- Otomatik pipet: 1ml ve 5ml
- Hassas terazi: CP 423 S (Sartorius, 1 mg hassasiyette)
- Vorteks: Velp Scientetic, 0.0176
- Soğutmalı santrifüj: Rotina 35 R (Hettich)
- Charm-II inkübatör
- Charm 7600 okuyucu
- Otomatik pipet ucu: 1ml ve 5 ml

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tetrasiklin Standartları; Oksitetrasiklin , Tetrasiklin , Klortetrasiklin , Doksisiklin

2. Negatif Kontrol Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml saf su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6 °C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

3. MRL Multi-Antimikrobiyal Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml saf su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6°C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

4. MSU Buffers

2-6 °C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. MSU Extraction Buffer 1 litre saf suda çözülür ve iyice karıştırılır. M2 Buffer ise 50 ml saf suda çözülerek hazırlanır. Çözülerek hazırlanmış olan tamponlar 2-6 °C'de 2 ay saklanabilir.

5. Optifluor

Radyoaktiviteyi açığa çıkaran sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [³H] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

6. Beyaz Tablet

Bütün tetrasiklin türevi ilaçlara bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

7. Renkli Tablet

Kit tableti üzerinde işaretle belirtilmiş olan renkli tablet. Bu tablet [³H] ile işaretlenmiş olan tetrasiklin standardı içerir.

7.3. Numune Analizi

Kontrol Noktasının Oluşturulması için;

1. 2 ml negatif kontrol standardı 6 ml MSU ekstraksiyon buffer ile karıştırılır (Bu karışım oda sıcaklığında 6 saat kadar dayanır).
2. 6 adet hazırlanan negatif kontrol karışımı analiz edilir.
3. Ortalama CPM değeri bulunur.
4. Ortalamadan %40 çıkarılarak kontrol noktası tespit edilir.

Numunelerin Hazırlanması

1. Numuneler derin dondurucuda saklanmalı ve 15 gün içinde analiz edilmelidir. Charm Sciences numunelerin -15°C'de veya daha altında saklanmasını önerir.
2. Dondurulmuş örnekler bu şekilde 2 ay saklanabilir.
3. Donmuş numuneler çözüldükten sonra işleme tabi tutulur.
4. Çözünmüş olan numuneler mikser yardımıyla parçalanır ve homojen edilir.
5. Test, 4-35°C'de hava sirkülasyonu olan bir yerde yapılmalıdır. 12 örneğe kadar aynı anda test edilebilir.
6. Parçalanmış numunedan 50 ml santrifüj tüpüne 10 gr tartılır. Üzerine 30 ml MSU buffer konur ve 10 dakika karıştırıcıda karıştırılır.
7. 45 dakika 80+2°C'de sıcak su banyosuna konur. Daha sonra buradan alınıp buz banyosunda bekletilerek soğutulur. 4000 RPM'de ve 0-1°C'de 10 dakika santrifüj edilir.
8. Santrifüjden alınarak hemen üst sıvı fazdan 10 ml alınıp M2 buffer ile pH=7.5'a ayarlanır.

Analizin Yapılması

1. Boş test tüpüne beyaz tablet eklenir.
2. 0.3 ± 0.1 ml (300 µl ± 100 µl) saf su eklenir.
3. Tabletten parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).

4. Test tüpünün içine 4.0 ± 0.25 ml örnek ya da standart eklenir (her bir örnek için yeni uç kullanılır).
5. Turuncu tablet test tüpüne ilave eklenir.
6. Test tüpünü mikserde 15 saniye alt üst ederek karıştırılır.
7. $35 + 1^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika inkubasyona bırakılır.
8. 3300 rpm'de 5 dakika santrifüj eklenir.
9. Hemen üstteki ekstrakt dökülür (Santrifüj durduktan sonraki herhangi bir gecikme dipteki çökeltinin de ekstraktla birlikte dökülmesine neden olabilir). Test tüpünün kenarları emici bir kağıt havlu ile silinir.
10. Yağ tabakası swap yardımıyla uzaklaştırılır. Çökeltinin dağılmamasına dikkat edilmelidir.
11. $300 \mu\text{l} \pm 100 \mu\text{l}$ saf su eklenir. Tabletın parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
12. 3.0 ± 0.5 ml optiflour eklenir. Bulutumsu görüntü uniform bir şekilde dağılıncaya değin karıştırılır.
13. Analizörün içinde 60 saniye saydırılır. [^3H] kanalındaki CPM değerini okuyunur. Pozitif ya da negatif belirlemeye göre kontrol noktası ile karşılaştırılır.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

1. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden büyükse örnek "negatiftir".
2. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden küçükse örnek "şüpheli pozitifdir".
3. Negatif kontrol, negatif kontrol ortalamasının ± 20 % aralığında olmalıdır.
4. Pozitif kontrol, kontrol noktasından düşük olmalıdır.
5. Negatif olarak değerlendirilen örneklerin analiz sonucu negatif olarak raporlanır. Örnek 'şüpheli pozitif' olarak değerlendirildi ise örneğin konfirmasyon analizine alınması gerekir.
6. Ulusal Kalıntı İzleme Genelgesine göre belirli sayıda negatif örneği temsilen bir örnek konfirmasyon analizine alınır.

Şüpheli Pozitif Örneğin Analizi:

1. Bir adet negatif kontrol, bir adet pozitif kontrol ve şüpheli pozitif numune tekrar analiz edilir (negatif kontrol, 2 ml Tissue Performance Negative Concentrate ve 6 ml MSU Extraction Buffer karıştırılarak ; pozitif kontrol ise 300 ml MSU Multi – Antimicrobial Concentrated Standart ve 6 ml MSU Extraction Buffer karıştırılarak hazırlanır).
2. Eğer bu koşullar sağlanamamışsa test tekrar edilir. Eğer hala sağlanamamışsa ilgili teknik servisle bağlantı kurulur.
3. Eğer bu koşullar sağlanmışsa ve dilüe edilen örneklerin tekrar edilen test sonuçları kontrol noktasından düşük ya da kontrol noktasına eşitse örnekler "pozitifdir".
4. Her çalışmadan önce bir adet negatif ve bir adet de pozitif kontrol hazırlanıp test edilmelidir. Bu, kontrol noktasını ve prosedürleri valide etmemizi sağlar.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
2. Bornova VKE Laboratuvar Güvenliği Prosedürü
3. Bornova VKE Deney Metotları ve Deney Metotlarının Geçerli Kılınması Prosedürü
4. II Tetracycline Test for Maximum Residue Limits (MRL) Competitive Assay
5. Charm II Test for Tetracycline Drugs in Tissue 07/06

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KAS DOKUDA KLORAMFENİKOL KALINTILARININ ELISA YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu test metodu, gıda değeri olan hayvanlarda kullanımı yasaklanmış olan kloramfenikolün kas dokuda Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile kalitatif tespitini amaçlamaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, hayvansal gıda maddelerinden kırmızı et, kanatlı eti ve balık eti numunelerinde kloramfenikolün kalitatif tespiti için uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Kas Doku: Kırmızı et, kanatlı eti, balık eti.

Absorbans: Bir ışık demeti bir maddeden geçerken ışığın madde tarafından emilen kısmı, geçirgenliğin negatif logaritması, optik yoğunluk, soğurganlık, OD.

ELISA: Enzym Linked Immuno Sorbent Assay. Belli bir enzimle işaretlenmiş test maddesi olan antijen veya antikor kullanılarak spesifik antijen veya antikoru belirleme amacıyla uygulanan, çok duyarlı bir laboratuvar yöntemi.

Kromojen: Pigment hâline dönüşebilen öncü madde; renk verici maddeyi oluşturan kendisi renksiz herhangi bir madde.

Substrat: Belirli bir enzimin özgün olarak etkilediği bir bileşik veya reaksiyona giren madde.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Blank: Negatif numune

Spayk: Standart yüklü numune

MRPL: Minimum Required Performance Limit, Gerekli En Az Performans Limiti

ppm: Parts per milion. Milyonda bir tanımlamasının kısaltmasıdır. mg/kg'a tekabül eder.

nm: Nanometre

ppb: milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, µg/kg'a tekabül eder.

ppt: Parts per trillion, trilyonda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, ng/kg'a tekabül eder.

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

N: Normal

OD: Optik dansite

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot kırmızı et, kanatlı eti, balık eti numunelerinde kloramfenikolün test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip ELISA yöntemi ile 450 nm dalga boyuna sahip spektrofotometrede (ELISA okuyucu) absorbansının ölçülmesine dayanan immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. Dereceli pipetler (1 ml, 5 ml ve 10 ml'lik)
2. Santrifüj tüpleri (Polipropilen 50 ml'lik)
3. Cam tüpler (vida kapaklı, 10 ml'lik)
4. Mezür (25 ml'lik)
5. Balon joje (10 ml, 50 ml, 100 ml ve 1000 ml'lik)
6. Cam huni (5cm ve 10 cm çapında)
7. Filtre (0,45 µm)
8. Otomatik pipetler (1ml ve 5ml'lik)
9. Mikropipet: 100µl ve 1000 µl
10. Otomatik ve mikropipet uçları
11. Blender
12. Karıştırıcı
13. Hassas terazi (1 mg hassasiyette)
14. Vorteks
15. Çoklu vorteks
16. Soğutmalı santrifüj
17. Çoklu uçurucu
18. ELISA plate okuyucu (Bio-Tek, EL808)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Etil Asetat, gradient saflıkta
2. N-Heksan, gradient saflıkta
3. Methanol, gradient saflıkta
4. Referans Standart: Chloramphenicol (Sigma Aldrich, 31667, CAS:56-75-7)
5. Kloramfenikol Enzim Konjugatı,
6. Kromojen,
7. Stop Solüsyon,
8. Buffer
9. Mirotiterplatte (96' lık)
10. Kloramfenikol Standart Solüsyonları,
Standart 1: 0 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 2: 25 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 3: 50 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 4: 100 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 5: 250 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 6: 750 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
11. **Yıkama Çözeltisi-PBST:** Kit ile birlikte gelen yıkama solüsyonu bidistile su ile çözündürülüp son hacim 1000 ml' ye tamamlanır.1 ay buzdolabında saklanarak kullanılabilir
12. **Kloramfenikol Enzim Konjugatı:** Bir kısım kloramfenikol enzim konjugatı, on kısım buffer ile 1:11 oranında dilüe edilir.
13. **Kloramfenikol Ana Stok Standardı (0,1 mg / ml-100 ppm):** 10 ± 01 mg Kloramfenikol standardı, metanol ile 100 ml hacimli balonda çizgisine kadar dilüe edilir (karanlıkta -20 °C ile -30 °C arasındaki derin dondurucuda 3 ay saklanabilir).
14. **Kloramfenikol Ara Stok Standardı (1 µg / ml-1 ppm):** 100 µl Kloramfenikol Ana Stok solüsyonu, metanol ile 10 ml'lik ölçülü balonda ölçü çizgisine kadar dilüe edilir (karanlıkta -20 °C ile -30 °C arasındaki derin dondurucuda 1 ay saklanabilir).
15. **Kloramfenikol Spayk Standardı (0.010µg/ml-10 ppb):** 100 µl Kloramfenikol ara stok solüsyonu, saf su ile 10 ml'lik ölçülü balonda çizgisine kadar dilüe edilir (buzdolabında ve karanlıkta 1 hafta saklanabilir).

Not: Kitler kullanılmadan önce 2-8°C'ler arasında saklanmalıdır. Son kullanma tarihi geçen kitler kesinlikle kullanılmamalıdır. Kit içerisinde çıkan aynı lot numaralı solüsyonlar ile kullanılmalıdır; lot numarası farklı kitler ile solüsyonlar bir arada kullanılmamalıdır. Kullanımı tamamlanan tüm solüsyonlar derhal buzdolabına konulmalıdır. Kitin kullanılmamış kısmı, orijinal ambalajında ve buzdolabında saklanmalıdır.

Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yönteminin tekrarlanabilirliği büyük ölçüde yıkama işlemi yapılan kuyucukların bir örnekliliğine bağlı olup, ELISA test prosedürü sıranın dikkatli bir şekilde takip edilerek uygulanması gerekmektedir. Test prosedürü aşamasında kit kuyucuklarının kurumasına asla izin verilmemelidir. Çalışmalar esnasında hazırlanan reagentler el

ile karıştırılmalı, kesinlikle vortex kullanılmamalıdır. İnkübasyon sırasında kuyucukların direk gün ışığına maruz kalmaması için, kuyucukların üzeri örtülmelidir. Kromojen ışığa duyarlı olduğundan, kuyucuklara kromojen ilave edildikten sonra inkübasyon sırasında karanlıkta bekletilmelidir. Renk bozukluğu şekillenen kromojen kullanılmamalıdır. 1 N sülfürik asit içeren stop solüsyonun kullanımı esnasında deri ile temasından kaçınılmalıdır. Yapılan kontrol sonucunda standartlar arasındaki korelasyonu uygun olmayan kitler kullanılmamalıdır. Standart 1 (0 ppt) solüsyonunda herhangi bir bozulma meydana geldiğinde, 0.6 absorbans ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) değerinden daha düşük bir absorbans değeri verdiği göz önünde bulundurulmalıdır. Standart 1 ve standart 4 absorbans değerleri arasında belirgin bir farklılık bulunmalıdır.

7.3. Numune Analizi

Analizin ana basamakları; numunenin homojen hale getirilmesi, etil asetat ile ekstrakte edilmesi, azot gazı altında uçurularak bufer ile son hacmin elde edilmesi, uygun bir konjugat ve spesifik substrat aracılığı ile inkübasyona bırakılması, ELISA okuyucuda 450 nanometrede tespit edilmesi.

Analiz için;

1. Kas doku numuneleri yağ ve derilerinden ayrılarak blendır yardımıyla parçalanır ve homojen hale getirilir.
2. Kas doku numunesinden 50 ml'lik santrifüj tüpüne $3,0 \pm 0,1$ g tartılır.
3. Üzerine 3ml saf su eklenir.
4. 6 ml etil asetat eklenerek 15 dk otomatik vorteks ile karıştırılır.
5. 15 dakika $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 4000 rpm'de santrifüj edilir.
6. Üst fazdan 4 ml cam tüpe alınır. 50°C 'de azot gazı ile uçurulur.
7. 1 ml buffer ve 3ml n-heksan eklenir ve 15 dakika vortekslenerek çözülür.
8. 15 dakika $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 4000 rpm'de santrifüj edilir.
9. Alt fazdan 0,5 ml mikropipet ile alınır.
10. 0,45 nm filtreden süzülerek 10 ml'lik cam tüplere alınır.

Homojenize edilmiş kontrol ve standart yüklü (10 ppb kloramfenikol spayk standardından her 1 gr örnek için 30 μl ilave edilir) örneklere yukarıdaki ekstraksiyon işlemleri aynen tekrarlanır.

7.4. Mikroplate Uygulama

1. Kit içerisindeki plate ve tüm solüsyonlar analiz öncesinde, karanlık ortamda oda ısısına ($20 - 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) gelinceye kadar bekletilir.
2. Kullanılacak standart ve numune sayıları düşünülerek gerekli sayıda kuyucuk başka bir mikroplate alınır. Mikroplate yerleşim planı standartlar, kontrol örnekleri, spayk örnekleri, numuneler şeklinde olmalıdır (Tablo.2). Günlük laboratuvar çalışmalarında Std 1, 5 ve 6 kullanılır. Mikroplate yerleşim planı kullanılan standartlara uygun şekilde hazırlanır.

Tablo.1. Mikroplate Yerleşim Planı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	N1	N9	“	“	“	“	“	“	“	“	“
B	Std 2	N2	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
C	Std 3	N3	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
D	Std 4	N4	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
E	Std 5	N5	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
F	Std 6	N6	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
G	Blk	N7	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
H	Spk	N8	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“

Std: Kloramfenikol Standart Solüsyonu

Blk: Kontrol Örneği

Spk: Spayk Örneği

N: Numune

3. Tüm kuyucuklara ilgili standartlar ve örneklerden 50 µl eklenir.
4. Kuyucuklara 50'şer ml dilue edilmiş enzim konjugatı ilave edilir.
5. Mikroplate, karanlık bir ortamda, oda ısısında (20 – 25 °C) 1 saat süre ile inkübasyona bırakılır.
6. İnkübasyon süresi biten mikropleyte oda ısısına gelmiş yıkama solüsyonundan her bir kuyucuk için 250 µl olacak şekilde çoklu mikropipet yardımı ile eklenir, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırılır ve dökülür. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edilir.
7. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 100'er µl kromojen solüsyonundan ilave edilir.
8. Kromojen ilave edilmiş plate, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırılır.
9. Mikroplate, karanlık bir ortamda, oda ısısında (20 – 25 °C) 15 dakika süre ile inkübasyona bırakılır.
10. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 100 µl stop solüsyon ilave edilerek, mikroplate dikkatlice karıştırılır.
11. Mikroplate, ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda, 30 dakika içerisinde okutulmalıdır.

7.5. Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Sonuçların Değerlendirilmesi

Cut-off değerine eşit veya daha düşük absorbans veren örnekler şüpheli pozitif, daha yüksek absorbans veren örnekler negatif olarak değerlendirilir. Şüpheli pozitif olarak değerlendirilen örnekler konfirmasyon testi uygulanır. Kloramfenikol A6 grubunda bulunan yasaklı ilaçlardır. Minimum gerekli performans limiti 0.3 ppb olarak belirlenmiştir.

Geri Alım Değeri

1. Kontrol numunesinin ve spaykların absorbanları karşılaştırılarak,
2. Standart 4 ve spayk absorbanları karşılaştırılarak uygun bir geri alım yapılıp yapılmadığına karar verilir.

Not: Bu test metodunda geçerlilik için, 2002/657 AB direktifi uygulanır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
2. ANONİM (2002a), 2002/657 AB direktifi Implementing Council Directive 96/23 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
3. Bornova VKELaboratuvar Güvenliği Prosedürü
4. Bornova VKE Laboratuvarda Güvenli Çalışma Talimatı
5. Bornova VKE Enstitü Atıklarının İmhası Talimatı
6. R-Biopharm RİDESCREEN Chloramphenicol, Enzyme İmmunoassey fort the quantitative analysis of chloramphenicol Art No:R1505

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KAS DOKUDA NİTROFURAN KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1 AMAÇ

Kas dokusunda nitrofuran grubu ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizlerinin yapılması.

2 UYGULAMA ALANI

Bu metot, kas dokusunda toplam nitrofuran metaboliti kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

- 1 Furazolidone metaboliti : (AOZ) 3-amino-2-oxazolidinone,
- 2 Furaldone metaboliti: (AMOZ) 5-methyl-morpholino-3-amino-2-oxazolidinone,
- 3 Nitrofurazone metaboliti: (SEM) semicarbazide,
- 4 Nitrofurantion metaboliti: (AHD) 1-aminohydantoin,

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

- 1 Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
- 2 Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
- 3 Her analizden önce cihaza 6 ng/mL'lik standart enjeksiyonu yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilir.
- 4 Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanır. Kalite Kontrol Grafiğinin hazırlanması ve Kullanılması Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.
- 5 Türevlendirme işlemi 16 saatten az olmamalıdır.
- 6 Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS: Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprej iyonizasyon

İS : Internal standart (İç standart)

ES: Eksternal standart

2-NP-AOZ, 2-NP-AMOZ, 2-NP-AHD, 2-NP-SCA: Türevlendirilmiş nitrofuran metabolitleri

MRPL: (Minimum Required Performance Level) Gerekli minimum performans seviyesi

LOD: Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ: Ölçüm limiti (Limit of quantitation)

CC α : Karar limiti

CC β : Tespit limiti

CV: Tekraredilebilirlik (Repeatability)

PP:Polipropilen

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 4 aşamayı içermektedir;

- Asidik ortamda seberst ve dokuya bağlı nitrofuran kalıntılarının 2-nitrobenzaldehit ile türevlendirilmesi,
- Baz ilavesi ile türevlendirme reaksiyonunun durdurulması,
- Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
- LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- 1 PP Santrifüj tüpü 50 mL'lik
- 2 Cam tüp 15 mL'lik
- 3 Enjektör 2 mL'lik
- 4 0.45 mikron filtre
- 5 Pipet ucu (200–1000–5000 μ L'lik)
- 6 Ayarlanabilir pipet 20–200 μ L
- 7 Ayarlanabilir pipet 100–1000 μ L
- 8 Ayarlanabilir pipet 1000–5000 μ L

- 9 Hassas terazi
- 10 Çalkalamalı etüv
- 11 Multireaks vorteks
- 12 Soğutmalı santrifüj
- 13 Numune yoğunlaştırıcı
- 14 Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS
- 15 Kromatografik program: Tandem Gold Workstation

7.2. Kullanılan Kimyasallar

S1: Dokuda nitrofuran analizi için ES . (-20 °C'de saklanmalıdır).

S1 Nitrofuran standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/kg (ppb)
AMOZ	201,2	20
AOZ	102,1	20
AHD	151,5	20
SEM	111,5	20

R1: Dokuda nitrofuran analizi için İS . (-20 °C'de saklanmalıdır)

R1 iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/kg (ppb)
AMOZ-D5	206,2	40
AOZ-D5	106,1	40
SEM-13C15N2	114,5	100

R2: Dokuda nitrofuran analizi için -%1 Asetik asit . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

R3: Dokuda nitrofuran analizi için -DMSO . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

R4: Dokuda nitrofuran analizi için -50 mmol Amonyum Format . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

R5: Dokuda nitrofuran analizi için -Etil Asetat . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

R6: Dokuda nitrofuran analizi için -Hekzan . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

R7: Dokuda nitrofuran analizi için -Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

Mobil Faz A:Nitrofuran analizi için -%20 Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

Mobil Faz B: Nitrofuran analizi için -Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

7.3. Numunenin Analizi

1. 2.0 g kas numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
2. 100 µL R1 ve 5 mL R2 ilave edilir, çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika karıştırılır.

3. 300 µL R3 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 1 dakika karıştırılır.
4. 50 rpm hıza ve 37 °C'ye ayarlı çalkalamalı etüvde 16 saat bekletilir.
5. Türevlendirmeden sonra örnekler etüvden alınarak oda sıcaklığına gelmesi için beklenir.
6. 700 µL R4 ilave edilir. Çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika karıştırılır.
7. Üzerine 5 mL R5 ilave edilir. Çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 2 dakika karıştırılır.
8. 3 mL R6 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 2 dakika karıştırılır.
9. 4000 g'de 15°C' ye ayarlı santrifüjde 10 dk santrifüj edilir.
10. Santrifüj sonunda, üstteki çözeltilerden pipet ile 6 mL (2x3 mL) alınıp 15 mL'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında 42 °C sıcaklıkta ve 5,0 psi basınçta kurutulur.
11. Kurutma işleminden sonra tüpe 1 mL R6 ilave edilir. Multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır. 750 µL R7 ilave edilir. Multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır. 2500 g'de 15°C' ye ayarlı santrifüjde 10 dakika santrifüj edilir, 5 dakika ortam sıcaklığında bekletilir.
12. Enjektör yardımıyla alt fazdan dikkatlice numune alınır ve enjektöre takılan 0.45 mm filtreden geçirilerek polipropilen vialer alınır. LC-MS/MS sistemine 75 µL enjeksiyon yapılır.
13. 3 adet 2.0 g blank kas numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.

Üzerine aşağıdaki tabloya uygun S1 ilave edilir.

Dokudaki Konsantrasyon	0,5 µg/kg (0,5MRPL)	1 µg/kg (1MRPL)	1,5 µg/kg (1,5MRPL)
Eklenecek Standart Hacmi	50 µL	100 µL	150 µL

7.4. LC-MS/MS İLE DOĞRULAMA ANALİZİ

□ HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	85	15	0.20
03:00	50	50	0.20
07:00	30	70	0.20
09:30	25	75	0.20
09:31	0	100	0.20
12:00	0	100	0.20
12:06	85	15	0.25
17:00	85	15	0.25
17:06	85	15	0.20
20:00	85	15	0.20

Kolon: Nitrofuran grubu HPLC kolonu 150x2,0 mm 4µ .

Akış hızı: 0.20 mL/dak

Enjeksiyon hacmi: 75µL

Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 15:85 MeOH: Su karışımı (h/h)

□ MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	400 °C
Drying gas pressure	40si
Scan Time	0.725 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 500V
Capillary	30V
Detector	+ 1700 V

CID Gas Pressure

2.00 mTorr

Spray Chamber T

65°C

Mass peak width in amu

Q1=1.0

Q3=1.0

□ MS-MS tarama parametreleri

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
2-NP-SEM	209,00	166,00	30	7	0,118
		134,00	30	9	0,118
		192,00	30	11	0,118
2-NP-AHD	249,00	134,00	30	9	0,059
		104,00	30	11	0,059
		178,00	30	9	0,059
2-NP-AOZ	236,00	134,00	30	9	0,059
		104,00	30	12	0,059
2-NP-AMAZ	335,00	291,00	30	9	0,059
		262,00	30	7	0,059
		128,00	30	6	0,059
2-NP-AOZ-D4	240,00	134,00	30	9	0,059
2-NP-AMAZ-D5	340,00	296,00	30	9	0,059
2-NP-SEM-13C15N2	212,00	168,00	30	7	0,059

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

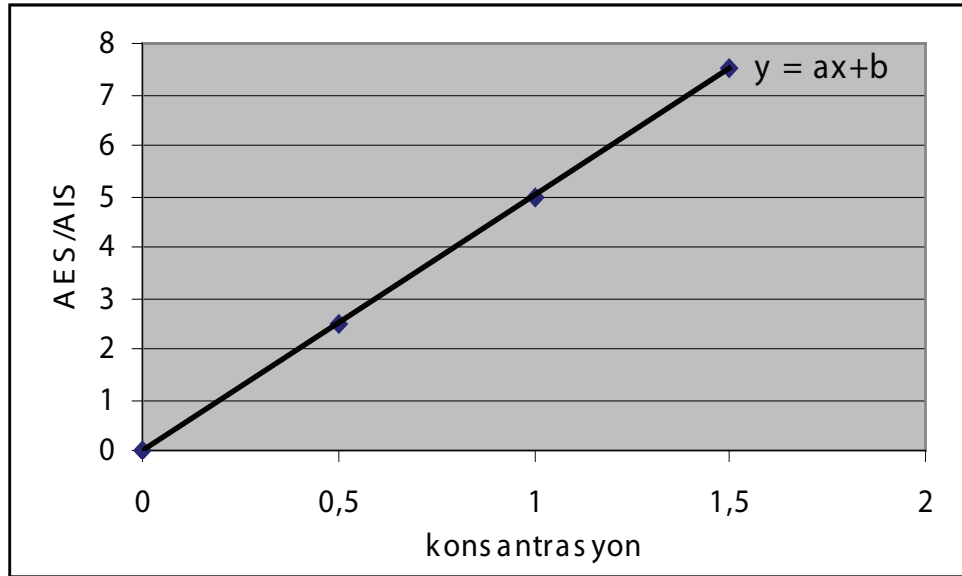
Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analiz edilir. Aksi halde

sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamadı.” şeklinde raporlanır.

Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa doğrulama metodu (MS-MS tarama parametreleri aşağıdaki tabloda verilmiştir) ile cihaza enjeksiyon yapılır. Standartlardaki iyonların oranı ile numunedeki iyonların oranı karşılaştırılarak analiz sonucu değerlendirilir. Pozitif sonuçlar için hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır .

Sonuçlar cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Her pik alanının iç standart pik alanına oranları hesaplanır. Hesaplanan bu değer konsantrasyona karşılık grafiğe geçirilir.



AES: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili nitrofuran pikinin alanı

AIS: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı Numune analizi sonucunda numunede tespit edilen nitrofuran pikinin alanı ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.



8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anonim: 2002/657/EC directive
2. ZİVAK ZV-1015-0200-30 LC-MS/MS Analiz Seti Doku Matrisinde Nitrofuran Grubu Antibiyotikler Kalıntı Analizi Talimatı (ZV-1015-0200-30-KK-T Rev.01)

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KAS DOKUDA NİTROİMİDAZOL KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1 AMAÇ

Kas dokusunda Nitroimidazol grubu ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizlerinin yapılması.

2 UYGULAMA ALANI

Bu metot, kas dokusunda toplam nitroimidazol metaboliti kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

1. Metronidazol (MNZ), 1-(2-hidroksietil)-2-metil-5-nitroimidazol
2. Ronidazol (RNZ), 1-Metil-2-metil-5-nitroimidazol
3. Dimetridazol (DMZ), 1,2-Dimetil-5-nitroimidazol
4. İpronidazol (IPZ), 2-İzopropil-1-metil-5-nitroimidazol
5. Metronidazol Hidroksit (MNZ-OH),
6. İpronidazol Hidroksit (IPZ-OH),
7. 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI),

Nitroimidazoller ve hidroksi metabolitleri, kimyasal yapı olarak Lewis-Base özelliğine sahip bileşiklere kapalı olan bileşiklerdir. Bu bileşikler ve metabolitleri karsinojenik ve mutajenik etkilidirler. Ronidazol, Metronidazol ve Dimetridazol, yasaklı ilaçlar (Annex IV of Concuil Regulation (EEC) No.2377/90) kapsamındadır (1).

Nitroimidazoller, özellikle kanatlı sektöründe koksidiyozis ve histomoniazisin tedavisi ve kontrolünde kullanılan antibiyotiklerdir. Ayrıca sığırların trikomoniazis ve domuzların hemorajik enteritlerinin tedavisinde de kullanılmaktadır (1).

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
3. Her analizden önce cihaza 6 ng/ml'lik standart enjeksiyon yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilmelidir.
4. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanmalı, grafiğinin hazırlanması ve kullanılması, Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmelidir.
5. Türevlendirme işlemi 16 saatten az olmamalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında ulusal/uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS: Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

İS: İnternal standart (İç standart)

ES: Eksternal standart

DMZ-d₃,HMMNI-d₃,IPZ-d₃,

MNZ-¹³C₂¹⁵N₂,IPZOH-d₃,MNZOH-d₂,RNZ-d₃:nitroimidazol metabolitleri

MNZ: Metronidazol, 1-(2-hidroksietil)-2-metil-5-nitroimidazol

RNZ: Ronidazol , 1-Metil-2-metil-5-nitroimidazol

DMZ: Dimetridazol , 1,2-Dimetil-5-nitroimidazol

IPZ: İpronidazol, 2-İzopropil-1-metil-5-nitroimidazol

MNZ-OH :Metronidazol Hidroksit ,

IPZ-OH: İpronidazol Hidroksit,

HMMNI: 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazol,

IPZOH,MNZOH,RNZ Nitroimidazol metabolitleri

DMZ-d₃,HMMNI-d₃,IPZ-d₃,

MNZ-¹³C₂¹⁵N₂,IPZOH-d₃,MNZOH-d₂,RNZ-d₃: nitroimidazol metabolitleri

DMZ, HMMNI, IPZ, MNZ,IPZOH,MNZOH,RNZ: Nitroimidazol metabolitleri

DMZ-d₃,HMMNI-d₃,IPZ-d₃,MNZ-¹³C₂¹⁵N₂,IPZOH-d₃,MNZOH-d₂,RNZ-d₃:nitroimidazol

metabolitleri

MRPL: (Minimum Required Performance Level) Gerekli minimum performans seviyesi

LOD: Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ: Ölçüm limiti (Limit of quantitation)

CC α : Karar limiti

CC β : Tespit limiti

CV: Tekraredilebilirlik (Repeatability)

PP: Polipropilen

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 3 aşamayı içermektedir.

1. Proteinlerin çöktürülmesi ve uzaklaştırılması,
2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
3. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

- 1 Santrifüj tüpü 50 mL'lik,
- 2 Cam tüp 15 mL'lik,
- 3 Enjektör 2 mL'lik,
- 4 Filtre 0.45 μ m,
- 5 Pipet ucu (200–1000–5000 μ L'lik),
- 6 Ayarlanabilir pipet 20–200 μ L ,
- 7 Ayarlanabilir pipet 100–1000 μ L ,
- 8 Ayarlanabilir pipet 1000–5000 μ L ,
- 9 Hassas terazi ,
- 10 Multireaks vorteks ,
- 11 Soğutmalı santrifüj ,
- 12 Numune yoğunlaştırıcı ,
- 13 Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS,
- 14 Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1),

7.2. Kullanılan Kimyasallar

S1: Kasta nitroimidazol analizi için ES . (-20 °C'de saklanmalıdır)

S1 Nitroimidazol standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
DMZ	141	400
HMMNI	157	400
IPZ	169	400
MNZ	171	400
IPZOH	185	400
MNZOH	187	400
RNZ	200	400

R1: Kasta nitroimidazole analizi için İS . (-20 °C'de saklanmalıdır)

R1 iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
DMZ-d3	144	400
HMMNI-d3	160	1200
IPZ-d3	172	400
MNZ- ¹³ C ₂ ¹⁵ N ₂	175	400
IPZOH-d3	188	400
MNZOH-d2	189	400
RNZ-d3	203	400

R2: Kasta nitroimidazol analizi için Etil Asetat. (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

R3: Kasta nitroimidazol analizi için Hexan. (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

R4: Kasta nitroimidazol analizi için Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

Mobil Faz A: Nitroimidazol analizi için %50 Metanol. (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

Mobil Faz B: Nitroimidazol analizi için Metanol . (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

7.3. Numunenin Analizi

Kas Dokusunun Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyonu

- 4.0 g doku numunesi, 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- 100 µL R1 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 1 dakika karıştırılır.

3. 10 mL R2 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 3 dakika karıştırılır.
4. 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilir.
5. Santrifüj sonunda, üstteki çözültiden ayarlanabilir pipet ile 7 mL (2x3,5 mL) alınıp 15 mL'lik cam tüpe aktarılır ve azot akışı altında 37 °C sıcaklıkta ve 10.0 psi basınçta kurutulur.
6. Kurutma işleminden sonra tüpe 1,5 mL R3 (2x750 µL) ilave edilir ve multireaks vorteksin 10. hızında 1 dakika karıştırılır.
7. Üzerine 1 mL R4 ilave edilir ve multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır.
8. Altta kalan fazdan enjektör yardımıyla dikkatlice numune alınır ve enjektöre takılan 0.45 mm filtreden geçirilerek polipropilen vialle alınır. LC-MS/MS sistemine 50 µL enjeksiyon yapılır.

Matriks Standardının Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyon

- 3 adet 4.0 g blank doku numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- Üzerine aşağıdaki tabloya uygun S1 ilave edilir.

Dokudaki Konsantrasyon	0,5 µg/L (0,5MRPL)	1 µg/L (1MRPL)	1,5 µg/L (1,5MRPL)
Eklenecek Standart Hacmi	25 µL	50 µL	75 µL

7.4. LC-MS-MS ile Analiz

HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	80	20	0.20
01:50	50	50	0.20
06:00	30	70	0.20
06:01	80	20	0.20
12:00	80	20	0.20

Kolon: Nitroimidazol grubu HPLC kolonu 150x2,0 mm 4µ .

Akış hızı: 0.20 mL/dak

Enjeksiyon hacmi: 50µL

Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 15:85 MeOH: Su karışımı (h/h)

□ MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	350 °C
Drying gas pressure	36 psi
Scan Time	0.700 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 500V
Capillary	30V
Detector	+ 1750 V

CID Gas Pressure

2.00 mTorr

Spray Chamber T

65°C

Mass peak width in amu

Q1=1.0

Q3=1.0

□ MS-MS tarama parametreleri

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
DMZ	142	96	20 V	15	0,05
DMZ-d3	145	99	20 V	15	0,05
HMMNI	158	140	20 V	9	0,05
HMMNI-d3	161	143	20 V	9	0,05
IPZ	170	124	20 V	13	0,05
MNZ	172	128	20 V	9	0,05
IPZ-d3	173	127	20 V	15	0,05
MNZ- ¹³ C ₂ ¹⁵ N ₂	176	132	20 V	9	0,05
IPZOH	186	168	20 V	11	0,05
MNZOH	188	123	20 V	9	0,05
IPZOH-d3	189	171	20 V	11	0,05
MNZOH-d2	190	125	20 V	9	0,05
RNZ	201	140	20 V	9	0,05
RNZ-d3	204	143	20 V	11	0,05

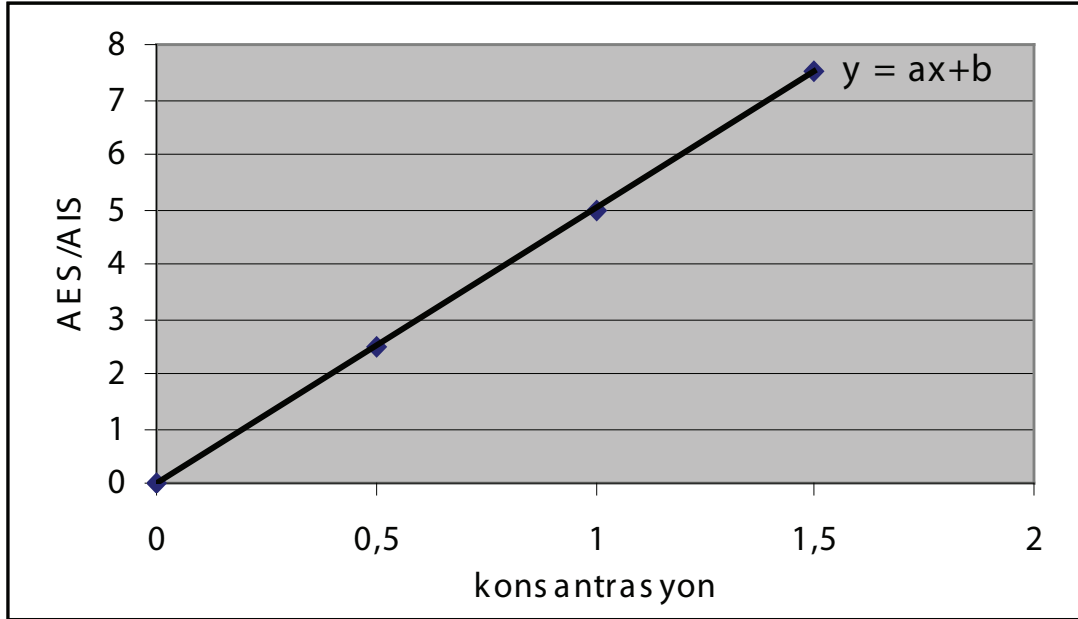
7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analiz edilir . Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamamıştır.” şeklinde raporlanır.

Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu pozitif olarak değerlendirilir ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır .

Analiz sonuçları, cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Her pik alanının iç standart pik alanına oranları hesaplanır. Hesaplanan bu değer konsantrasyona karşılık grafiğe aktarılır.



AES: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili nitroimidazol pikinin alanı

AIS: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı Numune analizi sonucunda numunede tespit edilen nitrofuran pikinin alanı ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Pendik VKE, Dokuman Veri Kontrol Prosedürü
2. Pendik VKE, Metot Validasyonu Prosedürü
3. Pendik VKE, Kalite Kontrol Prosedürü
4. ZİVAK ZV-1016-0200-35 LC-MS/MS Analiz Seti Doku Matrisinde Nitroimidazol Grubu Antibiyotikler Kalıntı Analizi Talimatı (ZV-1016-0200-35-KK-T Rev.01)

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan revizyonlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KIRMIZI ETTE TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ CHARM II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF ANALİZİ

1.AMAÇ

Bu test metodu, hayvansal gıda maddelerinde sınırlı düzeyde bulunmasına izin verilen antibiyotiklerden tetrasiklin grubu 4 etkin maddenin (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin) kırmızı ette Charm II yöntemi ile kalitatif tespitini amaçlamaktadır.

2.UYGULAMA ALANI

Bu metot, hayvansal gıda maddelerinden kırmızı ette tetrasiklin grubu (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin) ilaçlara ait kalıntıların kalitatif tespiti için uygulanır.

Kırmızı ette tespit limitleri :

Tetrasiklin Bileşikleri	Kırmızı Ette Tespit Limiti, µg/ kg	Sığır Etinde Maksimum Kalıntı Limiti, µg/kg	Koyun ve Keçi Etinde Maksimum Kalıntı Limiti, µg/ kg
Oksitetrasiklin	100	100	100
Tetrasiklin	20	100	100
Klortetrasiklin	100	100	100
Doksisisiklin	100	100	Bulunmamalı

3.TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
3. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
4. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin (numunenin) özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.

5. Kimyasallar hazırlanırken ağızla çekilmemeli ve pipetör kullanılmalıdır. Eldiven ve gözlükle çalışma yapılmalıdır. Atıklar, kimyasal atık şişesine doldurulmalıdır.

Charm- II testinin [3H] içeriği Nuclear Regulatory Commission ve Agreement State Regulations tarafından muaf tutulacak kadar düşüktür. Radyoaktif materyallere dokunduğunuz zaman aşağıdaki önlemleri alınız.

5.1. Pipetleme ağızla yapılmamalıdır.

5.2. Radyoaktif materyallere dokunurken sigara içmeyiniz, bir şey yemeyiniz ve kozmetik kullanmayınız. Bu esnada yemek sağlığı ciddi bir şekilde tehdit eder.

5.3. Radyoaktif materyallere dokunduktan sonra ellerinizi iyice yıkayınız.

5.4. Dökülen materyalleri hemen ve iyice siliniz.

5.5. Katı atıklar [3H] ya da [14C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller etiketlenerek karartıldıktan ya da uzaklaştırıldıktan sonra normal çöpe atılabilir.

5.6. Sıvı atıklar [3H] ya da [14C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller ya tıbbi atık çukurlarına konulmalı ya da bol su ile yıkanmalıdır. Belirtilen özel hususların dışında analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR / TANIMLAR

Analizör: Charm II 7600 analizörü. Cihaz örneklerin analizini yapar ve sayısal bir sonuç vererek yorumlar.

Bağlayıcı: Beyaz tablet. Bütün tetrasiklin türevi ilaçlara bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

Santrifüj Tüpü: 50 ml'lik konik tüpler. Örnek hazırlama ve ekstraksiyon aşamalarında kullanılır.

Kontrol Noktası: Negatif ve şüpheli pozitif sonuçların arasındaki kesişme noktasını gösteren sayıdır. Test sonuçlarının kontrol noktasından büyük olması örneğin negatif olduğunu, kontrol noktasından küçük veya eşit olması ise muhtemel pozitif olduğunu gösterir ve örneğin tekrar test edilmesi gerekebilir. Her yeni reaktif için yeni bir kontrol noktası oluşturulur ve bu kontrol noktası kitin son kullanma tarihine kadar geçerlidir.

CPM: Dakika sayısının kısaltmasıdır. Sonuç ölçüm birimi.

MRL Multi-Antimikrobiyal Standart: Amber şişe içerisinde toz halinde bulunan çeşitli antimikrobiyal ilaçlar içeren standart. 10 ml saf su ile çözüldüğünde 4000 ppb klortetrasiklin standardı içeren bir sıvı elde edilir. Bu standart örnek yüklemelerinde ve dilüe edilmiş pozitif kontrol yapmak için kullanılır.

Negatif Kontrol Standart: Antimikrobiyal ilaç içermeyen saf doku tozu. 10 ml saf su ile çözülür ve kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur.

Negatif Kontrol Ortalaması: 6 Negatif Kontrol CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Kontrol noktası belirlenmesi esnasında kullanılır.

Optifluor: Radyoaktiviteyi açığa çıkaran sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [3H] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

Performans İzleme: Her çalışma gününde test prosedürünün doğrulanması ve ekipmanların fonksiyonlarını yerine getirebildiğinin görülmesi ve kontrol noktasının doğrulanmasıdır.

Pozitif Kontrol Ortalaması: 3 adet pozitif kontrolün CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Alternatif kontrol noktası belirlenmesi çalışmaları esnasında kullanılır.

ppb: Milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, µg/kg'a tekabül eder.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Tracer (Taşıyıcı) : Kit tableti üzerinde işaretli belirtilmiş olan renkli tablet. Bu tablet [³H] ile işaretlenmiş olan klortetrasiklin standardı içerir.

Tipik Sayım Sayfası: Her kit için pozitif ve negatif kontrol noktalarının hesaplanacağı bir tablo içeren kit ile beraber verilen sayfa.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kırmızı ette tetrasiklin türevi antibiyotiklerin test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip Charm-II cihazı ile tanımlanmasına yarayan hızlı bir immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

- Parçalayıcı
- Hassas Teraziler
- Dereceli pipet: 2 ml, 5 ml ve 25 ml.
- Santrifüj tüpü: Polipropilen 50 ml.
- Balon joje: 50 ml, 100 ml ve 1000 ml
- Cam huni: 5cm ve 10 cm Ø.
- Otomatik pipet: 1ml ve 5ml
- Hassas terazi: CP 423 S (Sartorius, 1 mg hassasiyette)
- Vorteks: Velp Scientetic, 0.0176
- Soğutmalı santrifüj: Rotina 35 R (Hettich)
- Charm-II inkübatör
- Charm 7600 okuyucu
- Otomatik pipet ucu: 1ml ve 5 ml

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tetrasiklin Standartları ; Oksitetrasiklin , Tetrasiklin , Klortetrasiklin , Doksisisiklin

2. Negatif Kontrol Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml saf su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6 °C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

3. MRL Multi-Antimikrobiyal Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml saf su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika 2-4 °C'de tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6°C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

4. MSU Buffers

2-6 °C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. MSU Extraction Buffer 1 litre saf suda çözülür ve iyice karıştırılır. M2 Buffer ise 50 ml saf suda çözülerek hazırlanır. Çözülerek hazırlanmış olan tamponlar 2-6 °C'de 2 ay saklanabilir.

5. Optifluor

Radyoaktiviteyi açığa çıkarıcı sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [³H] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

6. Beyaz Tablet

Bütün tetrasiklin türevi ilaçlara bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

7. Renkli Tablet

Kit tableti üzerinde işaretli belirtilmiş olan renkli tablet. Bu tablet [³H] ile işaretlenmiş olan tetrasiklin standardı içerir.

7.3. Numune Analizi

Kontrol Noktasının Oluşturulması için;

1. 2 ml negatif kontrol standardı 6 ml MSU ekstraksiyon buffer ile karıştırılır (Bu karışım oda sıcaklığında 6 saat kadar dayanır).
2. 6 adet hazırlanan negatif kontrol karışımı analiz edilir.
3. Ortalama CPM değeri bulunur.
4. Ortalamadan %40 çıkarılarak kontrol noktası tespit edilir.

Numunelerin Hazırlanması

1. Numuneler derin dondurucuda saklanmalı ve 15 gün içinde analiz edilmelidir. Charm Sciences numunelerin -15°C'de veya daha altında saklanması önerir.
2. Dondurulmuş örnekler bu şekilde 2 ay saklanabilir.
3. Donmuş numuneler çözüldükten sonra işleme tabi tutulur.
4. Çözünmüş olan numuneler mikser yardımıyla parçalanır ve homojen edilir.
5. Test, 4-35°C'de hava sirkülasyonu olan bir yerde yapılmalıdır. 12 örneğe kadar aynı anda test edilebilir.
6. Parçalanmış numuneden 50 ml santrifüj tüpüne 10 gr tartılır. Üzerine 20 ml MSU buffer konur ve 10 dakika karıştırıcıda karıştırılır.
7. 45 dakika, 80+2°C'de sıcak su banyosuna konur. Daha sonra buradan alınıp buz banyosunda bekletilerek soğutulur. 4000 RPM'de ve 0-1°C'de 10 dakika santrifüj edilir.
8. Santrifüjden alınarak hemen üst sıvı fazdan 10 ml alınıp M2 buffer ile pH=7.5'a ayarlanır.

Analizinin Yapılması

1. Boş test tüpüne beyaz tablet eklenir.
2. 0.3 ± 0.1 ml (300 µl ± 100 µl) saf su eklenir.
3. Tabletten parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).

4. Test tüpünün içine 4.0 ± 0.25 ml örnek ya da standart eklenir (her bir örnek için yeni uç kullanılır).
5. Turuncu tablet test tüpüne ilave eklenir.
6. Test tüpünü mikserde 15 saniye alt üst ederek karıştırılır.
7. $35 + 1^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika inkubasyona bırakılır.
8. 3300 rpm'de 5 dakika santrifüj eklenir.
9. Hemen üstteki ekstrakt dökülür (Santrifüj durduktan sonraki herhangi bir gecikme dipteki çökeltinin de ekstraktla birlikte dökülmesine neden olabilir). Test tüpünün kenarları emici bir kağıt havlu ile silinir.
10. Yağ tabakası swap yardımıyla uzaklaştırılır. Çökeltinin dağılmamasına dikkat edilmelidir.
11. $300 \mu\text{l} \pm 100 \mu\text{l}$ saf su eklenir. Tabletten parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
12. 3.0 ± 0.5 ml optiflour eklenir. Bulutumsu görüntü uniform bir şekilde dağılıncaya değin karıştırılır.
13. Analizörün içinde 60 saniye saydırılır. [^3H] kanalındaki CPM değerini okuyunur. Pozitif ya da negatif belirlemeye göre kontrol noktası ile karşılaştırılır.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

1. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden büyükse örnek "negatiftir".
2. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden küçükse örnek "şüpheli pozitifdir".
3. Negatif kontrol, negatif kontrol ortalamasının ± 20 % aralığında olmalıdır.
4. Pozitif kontrol, kontrol noktasından düşük olmalıdır.
5. Negatif olarak değerlendirilen örneklerin analiz sonucu negatif olarak raporlanır. Örnek 'şüpheli pozitif' olarak değerlendirildi ise örneğin konfirmasyon analizine alınması gerekir.
6. Ulusal Kalıntı İzleme Genelgesine göre belirli sayıda negatif örneği temsilen bir örnek konfirmasyon analizine alınır.

Şüpheli Pozitif Örneğin Analizi:

1. Bir adet negatif kontrol, bir adet pozitif kontrol ve şüpheli pozitif numune tekrar analiz edilir (negatif kontrol, 2 ml Tissue Performance Negative Concentrate ve 6 ml MSU Extraction Buffer karıştırılarak; pozitif kontrol ise 300 ml MSU Multi – Antimicrobial Concentrated Standart ve 6 ml MSU Extraction Buffer karıştırılarak hazırlanır).
2. Eğer bu koşullar sağlanamamışsa test tekrar edilir. Eğer hala sağlanamamışsa ilgili teknik servis ile bağlantı kurulur.
3. Eğer bu koşullar sağlanmışsa ve dilüe edilen örneklerin tekrar edilen test sonuçları kontrol noktasından düşük ya da kontrol noktasına eşitse örnekler "pozitifdir".
4. Her çalışmadan önce bir adet negatif ve bir adet de pozitif kontrol hazırlanıp test edilmelidir. Bu, kontrol noktasını ve prosedürleri valide etmemizi sağlar.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
2. Bornova VKE ,Laboratuvar Güvenliği Prosedürü
3. Bornova VKE, Deney Metotları ve Deney Metotlarının Geçerli Kılınması Prosedürü
4. II Tetracycline Test for Maximum Residue Limits (MRL) Competitive Assay
5. Charm II Test for Tetracycline Drugs in Tissue 07/06
6. Charm Control Point Setup worksheets

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SÜTTE MAKROLİT GRUBU ANTİBİYOTİK KALINTILARININ CHARM-II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF ANALİZİ

1. AMAÇ

Bu test metodu, hayvansal gıda maddelerinde sınırlı düzeyde bulunmasına izin verilen antibiyotiklerden makrolit grubu 4 etkin maddenin (eritromisin, spiramisin, tilmikosin, tilosin) sütte Charm II yöntemi ile tespitini amaçlamaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, hayvansal gıda maddelerinden sütte makrolit grubu (eritromisin, spiramisin, tilmikosin, tilosin) ilaçlara ait kalıntıların kalitatif tespiti için uygulanır.

Süt için tespit limitleri :

Makrolit Grubu Bileşikler	Sütteki Tespit Limitleri, µg/kg	Sığır Sütünde Maksimum Kalıntı Limitleri, µg/kg	Koyun ve Keçi Sütünde Maksimum Kalıntı Limitleri, µg/kg
Eritromisin	40	40	40
Spiramisin	50	200	Bulunmamalı
Tilmikosin	40	50	50
Tilosin	50	50	50

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK UYARILARI ve ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
3. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
4. Numuneler, analizi yapılan kadar analit ve matriksin (numunenin) özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.

5. Kimyasallar hazırlanırken ağızla çekilmemeli ve pipetör kullanılmalıdır. Eldiven ve gözlükle çalışma yapılmalıdır. Atıklar, kimyasal atık şişesine doldurulmalıdır.

Charm- II testinin [3H] içeriği Nuclear Regulatory Commission ve Agreement State Regulations tarafından muaf tutulacak kadar düşüktür. Radyoaktif materyallere dokunduğunuz zaman aşağıdaki önlemleri alınız.

5.1. Pipetleme ağızla yapılmamalıdır.

5.2. Radyoaktif materyallere dokunurken sigara içmeyiniz, bir şey yemeyiniz ve kozmetik kullanmayınız. Bu esnada yemek sağlığı ciddi bir şekilde tehdit eder.

5.3. Radyoaktif materyallere dokunduktan sonra ellerinizi iyice yıkayınız.

5.4. Dökülen materyalleri hemen ve iyice siliniz.

5.5. Katı atıklar [³H] ya da [¹⁴C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller etiketlenerek karartıldıktan ya da uzaklaştırıldıktan sonra normal çöpe atılabilir.

5.6. Sıvı atıklar [³H] ya da [¹⁴C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller ya tıbbi atık çukurlarına konulmalı ya da bol su ile yıkanmalıdır. Belirtilen özel hususların dışında analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Analizör: Charm II LSC7600 analizörü. Cihaz örneklerin analizini yapar ve sayısal bir sonuç vererek yorumlar.

Bağlayıcı: Beyaz tablet. Bütün Makrolit ilaçlarına bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

Santrifüj Tüpü: 50 ml'lik konik tüpler. Örnek hazırlama ve ekstraksiyon aşamalarında kullanılır.

Kontrol Noktası: Negatif ve şüpheli pozitif sonuçların arasındaki kesişme noktasını gösteren sayıdır. Test sonuçlarının Kontrol Noktasından büyük olması örneğin negatif olduğunu, kontrol noktasından küçük veya eşit olması ise muhtemel pozitif olduğunu gösterir ve örneğin tekrar test edilmesi gerekebilir. Her yeni reaktif için yeni bir kontrol noktası oluşturulur ve bu kontrol noktası kitin son kullanma tarihine kadar geçerlidir.

CPM: Dakika sayıcısının kısaltmasıdır. Sonuç ölçüm birimi.

MRL Multi-Antimikrobiyal Standart: Amber şişe içerisinde toz halinde bulunan çeşitli antimikrobiyal ilaçlar içeren standart. 10 ml saf su ile çözüldüğünde 10 ppm eritromisin standardı içeren bir sıvı elde edilir. Bu standart örnek yüklemelerinde ve dilüe edilmiş pozitif kontrol yapmak için kullanılır.

Negatif Kontrol Standart: Antimikrobiyal ilaçlardan saf doku tozu. 10 ml saf su ile çözülür ve

kullanmadan önce 15 dk. 4 ± 2 derecede tutulur.

Negatif Kontrol Ortalaması: 6 Negatif Kontrol CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Doku için kontrol noktası belirlemesi esnasında kullanılır.

Optifluor: Radyoaktiviteyi açığa çıkaran sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [^{14}C] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

Performans İzleme: Her çalışma gününde test prosedürünün doğrulanması ve ekipmanların fonksiyonlarını yerine getirebildiğinin görülmesi ve kontrol noktasının doğrulanmasıdır.

Pozitif Kontrol Ortalaması: 3 adet Pozitif Kontrolün CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Alternatif kontrol noktası belirlenmesi çalışmaları esnasında kullanılır.

ppb: Milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, $\mu\text{g}/\text{kg}$ 'a tekabül eder.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltilisidir.

Tracer (Taşıyıcı): Kit tableti üzerinde işaretle belirtilmiş olan renkli tablet. Bu tablet [^{14}C] ile işaretlenmiş olan Makrolit standardı içerir.

Tipik Sayım Sayfası: Herbir kit için pozitif ve negatif kontrol noktalarının hesaplanacağı bir tablo içeren kit ile beraber verilen sayfa.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Sütte Makrolit grubu antibiyotiklerin test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip Charm-II cihazı ile tanımlanmasına yarayan hızlı bir immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. Dereceli Pipetler, 2 ml, 5 ml ve 25 ml.
2. Santrifüj Tüpleri (polipropilen), 50 ml.
3. Balon joje, 50 ml ve 100 ml, 1000 ml
4. Cam Huniler, 5cm ve 10 cm Ø.
5. Otomatik Pipet, 1ml ve 5ml
6. Hassas terazi, CP 423 S (Sartorius, 1 mg hassasiyette).
7. Karıştırıcı, Vorteks (Velp Scientetic, 0.0176).
8. Soğutmalı santrifüj, Rotina 35 R (Hettich).
9. Charm-II inkübatör
10. Charm 6600 okuyucu
11. Otomatik Pipet Ucu, 1ml ve 5 ml

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Negatif Kontrol Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml saf su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dk. 4 + 2 derecede tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6 °C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

2. MRL Multi-Antimikrobiyal Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml saf su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dk. 4 + 2 derecede tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6°C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

3. Optifluor:

Radyoaktiviteyi açığa çıkarıcı sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [¹⁴C] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

4. Beyaz Tablet:

Bütün Makrolit ilaçlarına bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

5. Renkli (Yeşil) Tablet:

Kit tableti üzerinde işaretle belirtilmiş olan renkli tablet. Bu tablet [¹⁴C] ile işaretlenmiş olan Makrolit standardı içerir.

7.3. Numune Analizi

Kontrol Noktasının Oluşturulması için;

1. Kontrol noktası, negatif ile muhtemel pozitif sonuç (şüpheli) arasındaki sınır noktasıdır. Her yeni kit için bir Kontrol Noktası ve Kontrol ortalaması belirlenmelidir.
2. Makrolit içermeyen 6 negatif numuneye (% 25 negatif kontrol ortalaması içerisinde olmalıdır) istenilen tarama seviyesinde süt için 40 ppb, Eritromisin olacak şekilde yükleme yapılarak analiz edilir. Ortalama CPM değeri bulunur. Ortalamaya %35 çıkarılarak kontrol noktası tespit edilir.

Analizin Yapılması

1. Numuneler buzdolabında saklanmalı ve 15 gün içinde analiz edilmelidir. Dondurulmuş örnekler bu şekilde 2 ay saklanabilir.
2. Donmuş numuneler çözüldükten sonra işleme tabi tutulur.
3. Test, 4-35°C'de hava sirkülasyonu olan bir yerde yapılmalıdır. 12 örneğe kadar aynı anda test edilebilir.
4. Numuneden 50 ml santrifüj tüpüne 30-40 ml eklenir. 1°C'de 4000 devirde 15 dk santrifüj yapılır.
5. Santrifüjden alınarak üst kısımdaki yağ tabakası temizlenir.
6. Test Prosedürü
7. Boş test tüpüne beyaz tableti ekleyiniz.
8. 0.3 + 0.1 ml (300 µl + 100 µl) saf su ekleyiniz.
9. Tabletten parçalanması için 10 saniye karıştırınız (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa

- ek süre tanınabilir).
10. Test tüpünün içine 5.0 + 0.25 ml örnek ya da standart ekleyiniz (her bir örnek için yeni uç kullanınız).
 11. 65 + 1°C'de 2 dakika inkübe ediniz.
 12. Yeşil tableti test tüpüne ilave ediniz.
 13. Test tüpünü mikserde 15 saniye alt üst ederek karıştırın.
 14. Tekrar 65 + 1°C'de 2 dakika inkübe ediniz.
 15. 3300 rpm'de 3 dakika santrifüj ediniz.
 16. Hemen üstteki ekstraktı dökünüz. (Santrifüj durduktan sonraki herhangi bir gecikme dipteki çökeltinin de ekstraktla birlikte dökülmesine neden olabilir). Test tüpünün kenarlarını emici bir kağıt havlu ile siliniz.
 17. Yağ tabakası swap yardımıyla uzaklaştırılır. Çökeltinin dağılmamasına dikkat edilmelidir.
 18. 300 µl + 100 µl saf su ekleyiniz. Tablet parçalanması için 10 saniye karıştırınız (tablet iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
 19. 3.0 + 0.5 ml optiflour ekleyiniz. Kapağını kapatınız. Bulutumsu görüntü uniform bir şekilde dağılıncaya değin karıştırınız.
 20. Analizörün içinde 60 saniye saydırınız. [¹⁴C] kanalındaki CPM değerini okuyunuz. Pozitif ya da negatif belirlemeye göre kontrol noktası ile karşılaştırınız.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

1. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden büyükse örnek negatiftir” (not found). Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden küçükse örnek “şüpheli pozitifdir”.
2. Negatif Kontrol, Negatif Kontrol Ortalamasının + 30 % aralığında olmalıdır.
3. Pozitif Kontrol Standart Kontrol Noktasından düşük olmalıdır.
4. Eğer bu koşullar sağlanamamışsa tekrar test edin. Eğer hala sağlanamamışsa lütfen Charm Sciences ile kontak kurun.
5. Eğer bu koşullar sağlanmışsa ve dilüe edilen örneklerin tekrar edilen test sonuçları Kontrol Noktasından düşük ya da Kontrol Noktasına eşitse örnekler “pozitifdir”.
6. Negatif olarak değerlendirilen örneklerin analiz sonucu negatif olarak raporlanır. Örnek ‘şüpheli pozitif’ olarak değerlendirildi ise örneğin konfirmasyon analizine alınması gerekir.
7. Ulusal Kalıntı İzleme Genelgesine göre belirli sayıda negatif örneği temsilen bir örnek konfirmasyon analizine alınır.
8. Her çalışmadan önce bir tane negatif ve bir tane de pozitif kontrol hazırlanıp test edilmelidir. Bu, kontrol noktasını ve prosedürleri valide etmemizi sağlar.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik



Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.

2. Bornova VKE Laboratuvar Güvenliği Prosedürü
3. Bornova VKE Deney Metotları ve Deney Metotlarının Geçerli Kılınması Prosedürü
4. Charm II Sulfonamide Competitive Assay
5. Charm II Test For Sulfonamides in Tissue, Serum and Urine (Beef, Swine, Poultry and Fish) 07/06
6. Control Point Set-up worksheets

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SÜTTE KLORAMFENİKOL KALINTILARININ ELISA YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu test metodu, gıda değeri olan hayvanlarda kullanımı yasaklanmış olan kloramfenikolün sütte Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile kalitatif tespiti amaçlamaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, süt numunelerinde kloramfenikolün kalitatif tespiti için uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK UYARILARI ve ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Absorbans: Bir ışık demeti bir maddeden geçerken ışığın madde tarafından emilen kısmı, geçirgenliğin negatif logaritması, optik yoğunluk, soğurganlık, OD.

ELISA: Enzym Linked Immuno Sorbent Assay. Belli bir enzimle işaretlenmiş test maddesi olan antijen veya antikor kullanılarak spesifik antijen veya antikoru belirleme amacıyla uygulanan, çok duyarlı bir laboratuvar yöntemi.

Kromojen: Pigment hâline dönüşebilen öncü madde; renk verici maddeyi oluşturan kendisi renksiz herhangi bir madde.

Substrat: Belirli bir enzimin özgün olarak etkilediği bir bileşik veya reaksiyona giren madde.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Blank: Negatif numune

Spayk: Standart yüklü numune

MRPL: Minimum Required Performance Limit, Gerekli En Az Performans Limiti

ppm: Milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, $\mu\text{g}/\text{kg}$ 'a tekabül eder.

nm: Nanometre

ppb: milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, $\mu\text{g}/\text{kg}$ 'a tekabül eder.

ppt: Trilyonda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, ng/kg 'a tekabül eder.

ml: Mililitre

μl : Mikrolitre

N: Normal

OD: Optik dansite

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot süt numunelerinde kloramfenikolün test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip ELISA yöntemi ile 450 nm dalga boyuna sahip spektrofotometrede (ELISA okuyucu) absorbansının ölçülmesine dayanan immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. Dereceli pipetler (1 ml, 5 ml ve 10 ml'lik)
2. Santrifüj tüpleri (Polipropilen 50 ml'lik)
3. Cam tüpler (vida kapaklı, 10 ml'lik)
4. Mezür (25 ml'lik)
5. Balon joje (10 ml, 50 ml, 100 ml ve 1000 ml'lik)
6. Cam huni (5cm ve 10 cm çapında)
7. Filtre (0,45 μm)
8. Otomatik pipetler (1ml ve 5ml'lik)
9. Mikropipet: 100 μl ve 1000 μl
10. Otomatik ve mikropipet uçları
11. Blender
12. Karıştırıcı
13. Hassas terazi (1 mg hassasiyette)
14. Vorteks
15. Çoklu vorteks
16. Soğutmalı santrifüj
17. Çoklu uçurucu
18. ELISA plate okuyucu (Bio-Tek, EL808)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanması

Kimyasal Maddeler

1. Etil Asetat, gradient saflıkta
2. N-Heksan, gradient saflıkta
3. Methanol, gradient saflıkta
4. Referans Standart: Chloramphenicol (Sigma Aldrich, 31667, CAS:56-75-7)
5. Kloramfenikol Enzim Konjugatı, (Ridascreen)
6. Kromojen, (Ridascreen)
7. Stop Solüsyon, (Ridascreen)
8. Buffer (Ridascreen)
9. Mirotiterplatte (96' lık)
10. Kloramfenikol Standart Solüsyonları,
Standart 1: 0 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 2: 25 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 3: 50 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 4: 100 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 5: 250 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
Standart 6: 750 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,
11. **Yıkama Çözeltisi-PBST**: Kit ile birlikte gelen yıkama solüsyonu bidistile su ile çözündürülüp son hacim 1000 ml' ye tamamlanır.1 ay buzdolabında saklanarak kullanılabilir
12. **Kloramfenikol Enzim Konjugatı**: Bir kısım kloramfenikol enzim konjugatı, on kısım buffer ile 1:11 oranında dilüe edilir.
13. **Kloramfenikol Ana Stok Standardı (0,1 mg / ml-100 ppm)**: 10 ± 01 mg Kloramfenikol standardı, metanol ile 100 ml hacimli balonda çizgisine kadar dilüe edilir (karanlıkta -20 °C ile -30 °C arasındaki derin dondurucuda 3 ay saklanabilir).
14. **Kloramfenikol Ara Stok Standardı (1 µg / ml-1 ppm)**: 100 µl Kloramfenikol Ana Stok solüsyonu, metanol ile 10 ml'lik ölçülü balonda ölçü çizgisine kadar dilüe edilir (karanlıkta -20 °C ile -30 °C arasındaki derin dondurucuda 1 ay saklanabilir).
15. **Kloramfenikol Spayk Standardı (0.010µg/ml-10 ppb)**: 100 µl Kloramfenikol ara stok solüsyonu, saf su ile 10 ml'lik ölçülü balonda çizgisine kadar dilüe edilir (buzdolabında ve karanlıkta 1 hafta saklanabilir).

Not: Kitler kullanılmadan önce 2-8°C'ler arasında saklanmalıdır. Son kullanma tarihi geçen kitler kesinlikle kullanılmamalıdır. Kit içerisinden çıkan aynı lot numaralı solüsyonlar ile kullanılmalıdır; lot numarası farklı kitler ile solüsyonlar bir arada kullanılmamalıdır. Kullanımı tamamlanan tüm solüsyonlar derhal buzdolabına konulmalıdır. Kitin kullanılmamış kısmı, orijinal ambalajında ve buzdolabında saklanmalıdır.

Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yönteminin tekrarlanabilirliği büyük ölçüde yıkama işlemi yapılan kuyucukların bir örnekliliğine bağlı olup, ELISA test prosedürü sıranın dikkatli bir şekilde takip edilerek uygulanması gerekmektedir. Test prosedürü aşamasında kit kuyucuklarının kurumasına asla izin verilmemelidir. Çalışmalar esnasında hazırlanan reagentlar el

ile karıştırılmalı, kesinlikle vortex kullanılmamalıdır. İnkübasyon sırasında kuyucukların direk gün ışığına maruz kalmaması için, kuyucukların üzeri örtülmelidir. Kromojen ışığa duyarlı olduğundan, kuyucuklara kromojen ilave edildikten sonra inkübasyon sırasında karanlıkta bekletilmelidir. Renk bozukluğu şekillenen kromojen kullanılmamalıdır. 1 N sülfürik asit içeren stop solüsyonun kullanımı esnasında deri ile temasından kaçınılmalıdır. Yapılan kontrol sonucunda standartlar arasındaki korelasyonu uygun olmayan kitler kullanılmamalıdır. Standart 1 (0 ppt) solüsyonunda herhangi bir bozulma meydana geldiğinde, 0.6 absorbans ($A_{450\text{nm}} < 0.6$) değerinden daha düşük bir absorbans değeri verdiği göz önünde bulundurulmalıdır. Standart 1 ve standart 4 absorbans değerleri arasında belirgin bir farklılık bulunmalıdır.

7.3. Numune Analizi

Analizin ana basamakları; numunenin yağlarının alınması ve homojen hale getirilmesi, proteinlerinin çöktürülmesi, etil asetat ile ekstrakte edilmesi, azot gazı altında uçurularak bufer ile son hacmin elde edilmesi, uygun bir konjugat ve spesifik substrat aracılığı ile inkübasyona bırakılması, ELISA okuyucuda 450 nanometrede tespit edilmesi.

Analiz için;

1. Süt numuneleri 50 ml'lik santirüfuj tüplerine alınır. 15 dk 4000 rpm de 4 derecede santirüfuj edilerek üstte biriken yağ fazı uzaklaştırılır.
2. Yağları uzaklaştırılan süt numunesinden 50 ml'lik santrifuj tüpüne $10,0 \pm 0,1$ ml alınır.
3. 0.5 ml carez-1 ve 0.5 ml carez-2 eklenir.
4. 15 dk otomatik vorteks ile karıştırılır.
5. 15 dakika 4°C de 4000 rpm'de santrifuj edilerek,proteinlerinin çökmesi sağlanır.
6. Sıvı fazdan 4.4 ml 50 ml'lik santirüfuj tüpene alınır.
7. 8 ml etil asetat eklenir ve 15 dakika vortekslenir.
8. 15 dk 4000rpm de 20 derecede santirüfuj edilir.
9. Etil asetat fazından 4 ml cam tüplere alınır.
10. 50 derecede azot gazı altında etil asetat fazı uçurulur.
11. 0.4 ml buffer eklenir. 15 dk vortekslenir.
12. 0,45 nm filtreden süzülerek 10 ml'lik cam tüplere alınır.

Homojenize edilmiş kontrol ve standart yüklü (10 ppb kloramfenikol spayk standardından her 1 gr örnek için 30 µl ilave edilir) örneklere yukarıdaki ekstraksiyon işlemleri aynen tekrarlanır.

7.4. Mikroplate Uygulama

1. Kit içerisindeki plate ve tüm solüsyonlar analiz öncesinde, karanlık ortamda oda ısısına ($20 - 25^{\circ}\text{C}$) gelinceye kadar bekletilir.
2. Kullanılacak standart ve numune sayıları düşünülerek gerekli sayıda kuyucuk başka bir mikroplate alınır. Mikroplate yerleşim planı standartlar, kontrol örnekleri, spayk örnekleri, numuneler şeklinde olmalıdır (Tablo.2). Günlük laboratuvar çalışmalarında Std 1 ve 6 kullanılır. Mikroplate yerleşim planı kullanılan standartlara uygun şekilde hazırlanır.

Tablo.1. Mikroplate Yerleşim Planı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	N1	N9	“	“	“	“	“	“	“	“	“
B	Std 2	N2	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
C	Std 3	N3	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
D	Std 4	N4	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
E	Std 5	N5	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
F	Std 6	N6	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
G	Blk	N7	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
H	Spk	N8	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“

Std: Kloramfenikol Standart Solüsyonu

Blk: Kontrol Örneği

Spk: Spayk Örneği

N: Numune

3. Tüm kuyucuklara ilgili standartlar ve örneklerden 50 µl eklenir.
4. Kuyucuklara 50'şer ml dilue edilmiş enzim konjugatı ilave edilir.
5. Mikroplate, karanlık bir ortamda, oda ısısında (20 – 25 °C) 1 saat süre ile inkübasyona bırakılır.
6. İnkübasyon süresi biten mikroplyte oda ısısına gelmiş yıkama solüsyonundan her bir kuyucuk için 250 µl olacak şekilde çoklu mikropipet yardımı ile eklenir, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırılır ve dökülür. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edilir.
7. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 100'er µl kromojen solusyonundan ilave edilir.
8. Kromojen ilave edilmiş plate, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırılır.
9. Mikroplate, karanlık bir ortamda, oda ısısında (20 – 25 °C) 15 dakika süre ile inkübasyona bırakılır.
10. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 100 µl stop solüsyon ilave edilerek, mikroplate dikkatlice karıştırılır.
11. Mikroplate, ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda, 30 dakika içerisinde okutulmalıdır.

7.5. Analiz Sonuçlarının Değerlendirmesi

1. Sonuçların Değerlendirilmesi

Cut-off değerine eşit veya daha düşük absorbans veren örnekler şüpheli pozitif, daha yüksek absorbans veren örnekler negatif olarak değerlendirilir. Şüpheli pozitif olarak değerlendirilen örnekler konfirmasyon testi uygulanır. Kloramfenikol A6 grubunda bulunan yasaklı ilaçlardır. Minimum gerekli performans limiti 0.3 ppb olarak belirlenmiştir.

2. Geri Alım Değeri

1. Kontrol numunesinin ve spaykların absorbansları karşılaştırılarak,
2. Standart ve spayk absorbansları karşılaştırılarak uygun bir geri alım yapılıp yapılmadığına karar verilir.

Not: Bu test metodunda geçerlilik için, 2002/657 AB direktifi uygulanır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
2. ANONİM (2002a), 2002/657 AB direktifi Implementing Council Directive 96/23 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
3. Bornova VKE Laboratuvar Güvenliği Prosedürü
4. Bornova VKE Laboratuvarda Güvenli Çalışma Talimatı
5. Bornova VKE Enstitü Atıklarının İmhası Talimatı
6. R-Biopharm RİDESCREEN Chloramphenicol, Enzyme İmmunoassey fort the quantitative analysis of chloramphenicol Art No:R1505

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SÜTTE NİTROFURAN İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Sütte nitrofuran grubu ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizlerinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, sütte toplam nitrofuran metaboliti kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

Furazolidone metaboliti : (AOZ) 3-amino-2-oxazolidinone,

Furaltadone metaboliti: (AMÖZ) 5-methyl-morpholino-3-amino-2-oxazolidinone,

Nitrofurazone metaboliti: (SEM) semicarbazide,

Nitrofurantion metaboliti: (AHD) 1-aminohydantoin,

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
3. Her analizden önce cihaza 6 ng/mL'lik standart enjeksiyonu yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilir.
4. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanır. Kalite Kontrol Grafiğinin hazırlanması ve Kullanılması (P.19) Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.
5. Türevlendirme işlemi 16 saatten az olmamalıdır.
6. R5 ve R6 ilavesinden sonra uygulanan karıştırma işlemleri mümkün olduğunca yavaş yapılmalıdır. Aksi takdirde jelleşme meydana geldiğinden oluşan üst faz sağlıklı bir şekilde ayrılamaz.(R5 ve R6 Eklerde kit bilgilerinde verilmektedir).
7. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS: Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

İS: İnternal standart (İç standart)

ES: Eksternal standart

2-NP-AOZ, 2-NP-AMÖZ, 2-NP-AHD, 2-NP-SCA: Türevlendirilmiş nitrofuran metabolitleri

MRPL: (Minimum Required Performance Level) Gerekli minimum performans seviyesi

LOD: Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ: Ölçüm limiti (Limit of quantitation)

CC α : Karar limiti

CC β : Tespit Limiti

CV: Tekraredilebilirlik (Repeatibility)

PP: Polipropilen

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 4 aşamayı içermektedir;

- Asidik ortamda seberst ve dokuya bağlı nitrofuran kalıntılarının 2-nitrobenzaldehit ile türevlendirilmesi,
- Baz ilavesi ile türevlendirme reaksiyonunun durdurulması,
- Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
- LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- PP Santrifüj tüpü 50 mL'lik
- Cam tüp 15 mL'lik
- Enjektör 2 mL'lik
- 0.45 mikron filtre
- Pipet ucu (200–1000–5000 μ L'lik)
- Ayarlanabilir pipet 20–200 μ L

- Ayarlanabilir pipet 100–1000 µL
- Ayarlanabilir pipet 1000–5000 µL
- Hassas terazi
- Çalkalamalı etüv
- Multireaks vorteks
- Soğutmalı santrifüj
- Numune yoğunlaştırıcı
- Zivak Tandem Gold Triple Quadrupole LC-MS-MS
- Kromatografik program: Tandem Gold Workstation

7.2. Kullanılan Kimyasallar

- S1: Sütte nitrofuran analizi için ES (-20 °C'de saklanmalıdır).
- S1 Nitrofuran standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/kg (ppb)
AMÖZ	201,2	20
AOZ	102,1	20
AHD	151,5	20
SEM	111,5	20

- R1: Sütte nitrofuran analizi için İS (-20 °C'de saklanmalıdır)

R1 iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/kg (ppb)
AMÖZ-D5	206,2	40
AOZ-D5	106,1	40
SEM-13C15N2	114,5	100

- R2: Sütte nitrofuran analizi için -%1 Asetik asit (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R3: Sütte nitrofuran analizi için -DMSO (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R4: Sütte nitrofuran analizi için -50 mmol Amonyum Format (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R5: Sütte nitrofuran analizi için -Etil Asetat (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R6: Sütte nitrofuran analizi için -Hekzan (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R7: Sütte nitrofuran analizi için -Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- Mobil Faz A: Nitrofuran analizi için -%20 Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- Mobil Faz B: Nitrofuran analizi için -Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

7.3. Numunenin Analizi

1. 2.0 g süt numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
2. 100 µL R1 ve 5 mL R2 ilave edilir, çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika karıştırılır.
3. 300 µL R3 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 1 dakika karıştırılır.
4. 50 rpm hıza ve 37 °C'ye ayarlı çalkalamalı etüvde 16 saat bekletilir.
5. Tüvelendirmeden sonra örnekler etüvden alınarak oda sıcaklığına gelmesi için beklenir.
6. 700 µL R4 ilave edilir. Çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika karıştırılır.
7. Üzerine 5 mL R5 ilave edilir. Çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 2 dakika karıştırılır.
8. 3 mL R6 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 2 dakika karıştırılır.
9. 4000 g'de 15°C' ye ayarlı santrifüjde 10 dk santrifüj edilir.
10. Santrifüj sonunda, üstteki çözeltiden pipet ile 6 mL (2x3 mL) alınıp 15 mL'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında 42 °C sıcaklıkta ve 5,0 psi basınçta kurutulur.
11. Kurutma işleminden sonra tüpe 1 mL R6 ilave edilir. Multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır. 750 µL R7 ilave edilir. Multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır. 2500 g'de 15°C' ye ayarlı santrifüjde 10 dakika santrifüj edilir, 5 dakika ortam sıcaklığında bekletilir.
12. Enjektör yardımıyla alt fazdan dikkatlice numune alınır ve enjektöre takılan 0.45 mm filtreden geçirilerek polipropilen vial alınır. LC-MS/MS sistemine 75 µL enjeksiyon yapılır.
13. 3 adet 2.0 g blank süt numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
14. Üzerine aşağıdaki tabloya uygun S1 ilave edilir.

Dokudaki Konsantrasyon	0,5 µg/kg (0,5MRPL)	1 µg/kg (1MRPL)	1,5 µg/kg (1,5MRPL)
Eklenecek Standart Hacmi	50 µL	100 µL	150 µL

7.4. LC-MS/MS ile Doğrulama Analizi

□ HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	85	15	0.20
03:00	50	50	0.20
07:00	30	70	0.20
09:30	25	75	0.20
09:31	0	100	0.20
12:00	0	100	0.20
12:06	85	15	0.25
17:00	85	15	0.25
17:06	85	15	0.20
20:00	85	15	0.20

Kolon: Nitrofuran grubu HPLC kolonu 150x2,0 mm 4 μ (ZİVAK)

Akış hızı: 0.20 mL/dak

Enjeksiyon hacmi: 75 μ L

Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 15:85 MeOH: Su karışımı (h/h)

MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	400 °C
Drying gas pressure	40si
Scan Time	0.725 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 500V
Capillary	30V
Detector	+ 1700 V

CID Gas Pressure 2.00 mTorr

Spray Chamber T 65°C

Mass peak width in amu Q1=1.0 Q3=1.0

MS-MS tarama parametreleri

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
2-NP-SEM	209,00	166,00	30	7	0,118
		134,00	30	9	0,118
		192,00	30	11	0,118
2-NP-AHD	249,00	134,00	30	9	0,059
		104,00	30	11	0,059
		178,00	30	9	0,059
2-NP-AOZ	236,00	134,00	30	9	0,059
		104,00	30	12	0,059
2-NP-AMAZ	335,00	291,00	30	9	0,059
		262,00	30	7	0,059
		128,00	30	6	0,059
2-NP-AOZ-D4	240,00	134,00	30	9	0,059
2-NP-AMAZ-D5	340,00	296,00	30	9	0,059
2-NP-SEM-13C15N2	212,00	168,00	30	7	0,059

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

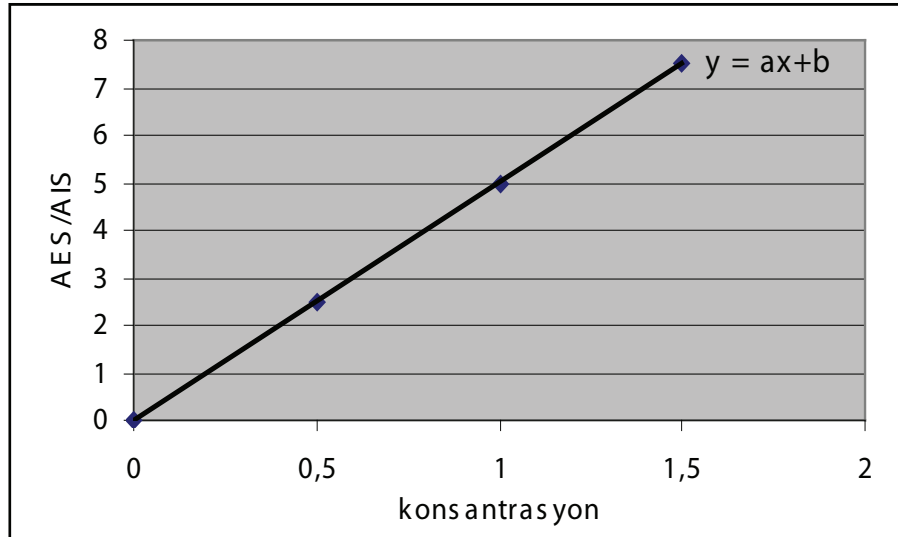
Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analiz edilir.

Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamamıştır.” şeklinde raporlanır.

Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa doğrulama metodu (MS-MS tarama parametreleri aşağıdaki tabloda verilmiştir) ile cihaza enjeksiyon yapılır. Standartlardaki iyonların oranı ile numunedeki iyonların oranı karşılaştırılarak analiz sonucu değerlendirilir. Pozitif sonuçlar için hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır.

Sonuçlar cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Her pik alanının iç standart pik alanına oranları hesaplanır. Hesaplanan bu değer konsantrasyona karşılık grafiğe geçirilir.



AES: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili nitrofuran pikinin alanı

AIS: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı

Numune analizi sonucunda numunedeki tespit edilen nitrofuran pikinin alanı ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. ZİVAK ZV-1015-0200-35 LC-MS/MS Analiz Seti Süt Matrisinde Nitrofuran Grubu Antibiyotikler Kalıntı Analizi Talimatı (ZV-1015-0200-35-KK-T Rev.01)

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SÜTTE NİTROİMİDAZOL İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1 AMAÇ

Sütte nitroimidazol grubu ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizlerinin yapılması.

2 UYGULAMA ALANI

Bu metot, sütte nitroimidazole metaboliti kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

Metronidazol (MNZ), 1-(2-hidroksietil)-2-metil-5-nitroimidazol

Ronidazol (RNZ), 1-Metil-2-metil-5-nitroimidazol

Dimetridazol (DMZ), 1,2-Dimetil-5-nitroimidazol

Ipronidazol (IPZ), 2-İzopropil-1-metil-5-nitroimidazol

Metronidazol Hidroksit (MNZ-OH),

Ipronidazol Hidroksit (IPZ-OH),

2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazol (HMMNI),

Nitroimidazoller ve hidroksi metabolitleri, kimyasal yapı olarak Lewis-Base özelliğine sahip bileşiklere kapalı olan bileşiklerdir. Bu bileşikler ve metabolitleri karsinojenik ve mutajenik etkilidirler. Ronidazol, Metronidazol ve Dimetridazol, yasaklı ilaçlar (Annex IV of Concuil Regulation (EEC) No.2377/90) kapsamındadır (1).

Nitroimidazoller, özellikle kanatlı sektöründe koksidiyozis ve histomoniazisin tedavisi ve kontrolünde kullanılan antibiyotiklerdir. Ayrıca sığırların trikomoniazis ve domuzların hemorajik enteritlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. (1)

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.

2. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.

3. Her analizden önce cihaza 10 ng/ml'lik standart enjeksiyon yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilir.
4. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanmalı, grafiğinin hazırlanması ve kullanılması, (P.19)Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmelidir.
5. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS: Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

İS : Internal standart (İç standart)

ES: Eksternal standart

DMZ-d3,HMMNI-d3,IPZ-d3,

MNZ-¹³C₂¹⁵N₂,IPZOH-d3,MNZOH-d2,RNZ-d3:nitroimidazol metabolitleri

MNZ: Metronidazol, 1-(2-hidroksietil)-2-metil-5-nitroimidazol

RNZ: Ronidazol , 1-Metil-2-metil-5-nitroimidazol

DMZ: Dimetridazol , 1,2-Dimetil-5-nitroimidazol

IPZ: Ipronidazol, 2-İzopropil-1-metil-5-nitroimidazol

MNZ-OH :Metronidazol Hidroksit ,

IPZ-OH: Ipronidazol Hidroksit,

HMMNI: 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazol,

DMZ, HMMNI, IPZ, MNZ,IPZOH,MNZOH,RNZ: Nitroimidazol metabolitleri

DMZ-d3,HMMNI-d3,IPZ-d3,

MNZ-¹³C₂¹⁵N₂,IPZOH-d3,MNZOH-d2,RNZ-d3: nitroimidazol metabolitleri

MRPL: (Minimum Required Performance Level) Gerekli minimum performans seviyesi

LOD: Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ: Ölçüm limiti (Limit of quantitation)

CC_α: Karar limiti

CC_β: Tespit Limiti

CV: Tekraredilebilirlik (Repeatability)

PP: Polipropilen

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 3 aşamayı içermektedir.

1. Proteinlerin çöktürülmesi ve uzaklaştırılması,
2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
3. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

- Santrifüj tüpü 50 mL'lik
- Cam tüp 15 mL'lik
- Enjektör 2 mL'lik
- 0.45 mikron filtre
- Pipet ucu (200–1000–5000 mL'lik)
- Ayarlanabilir pipet 20–200 µL,
- Ayarlanabilir pipet 100–1000 µL,
- Ayarlanabilir pipet 1000–5000 µL
- Hassas terazi (GB 10288),
- Multireaks vorteks
- Soğutmalı santrifüj
- Numune yoğunlaştırıcı
- Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS
- Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1)

7.2. Kullanılan Kimyasallar

- S1: Sütte nitroimidazol analizi için ES (-20 °C'de saklanmalıdır)

S1 Nitroimidazole standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
DMZ	141	400
HMMNI	157	400
IPZ	169	400
MNZ	171	400
IPZOH	185	400

MNZOH	187	400
RNZ	200	400

R1: Sütte nitroimidazole analizi için İS (-20 °C'de saklanmalıdır)

R1 iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
DMZ-d3	144	400
HMMNI-d3	160	1200
IPZ-d3	172	400
MNZ- ¹³ C ₂ ¹⁵ N ₂	175	400
IPZOH-d3	188	400
MNZOH-d2	189	400
RNZ-d3	203	400

R2: Sütte nitroimidazol analizi için Etil Asetat (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

R3: Sütte nitroimidazol analizi için Hegzan (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

R4: Sütte nitroimidazol analizi için Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

Mobil Faz A: Nitroimidazol analizi için %50 Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

Mobil Faz B: Nitroimidazol analizi için Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

7.3. Numunenin Analizi

Sütün Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyonu

- Yağı alınmış (Süt numunesi 3500 g'de 4 °C sıcaklıkta 15 dakika santrifüj edildikten sonra üstte biriken yağlı kısım atılır) 4.0 mL süt numunesi, 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- 100 µL R1 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 1 dakika karıştırılır.
- 10 mL R2 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 3 dakika karıştırılır.
- 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda, üstteki çözeltilerden pipet ile 7 mL (2x3,5 mL) alınıp 15 mL'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında 37 °C sıcaklıkta ve 10.0 psi basınçta kurutulur.
- Kurutma işleminden sonra tüpe 1,5 mL R3 (2x750 µL) ilave edilir ve multireaks vorteksin 10. hızında 1 dakika karıştırılır.
- Üzerine 1 mL R4 ilave edilir ve multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır.
- Altta kalan fazdan enjektör yardımıyla dikkatlice numune alınır ve enjektöre takılan 0.45 mm filtreden geçirilerek polipropilen vialer alınır. LC-MS/MS sistemine 50 µL enjeksiyon yapılır.

Matris Standardının Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyon

3 adet 4.0 ml yağlı alınmış blank süt numunesi 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınır.

Üzerine aşağıdaki tabloya uygun S1 ilave edilir.

Sütteki Konsantrasyon	0,5 µg/L (0,5MRPL)	1 µg/L (1MRPL)	1,5 µg/L (1,5MRPL)
Eklenecek Standart Hacmi	25 µL	50 µL	75 µL

7.4. LC-MS-MS ile Analiz

HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	80	20	0.20
01:50	50	50	0.20
06:00	30	70	0.20
06:01	80	20	0.20
12:00	80	20	0.20

Kolon: Nitroimidazol grubu HPLC kolonu 150x2,0 mm 4µ

Akış hızı: 0.20 mL/dakika

Enjeksiyon hacmi: 50µL

Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 15:85 MeOH: Su karışımı (h/h)

MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	350 °C
Drying gas pressure	36 psi
Scan Time	0.700 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 500V
Capillary	30V
Detector	+ 1750 V

CID Gas Pressure

2.00 mTorr

Spray Chamber T

65°C

Mass peak width in amu

Q1=1.0

Q3=1.0

□ MS-MS tarama parametreleri

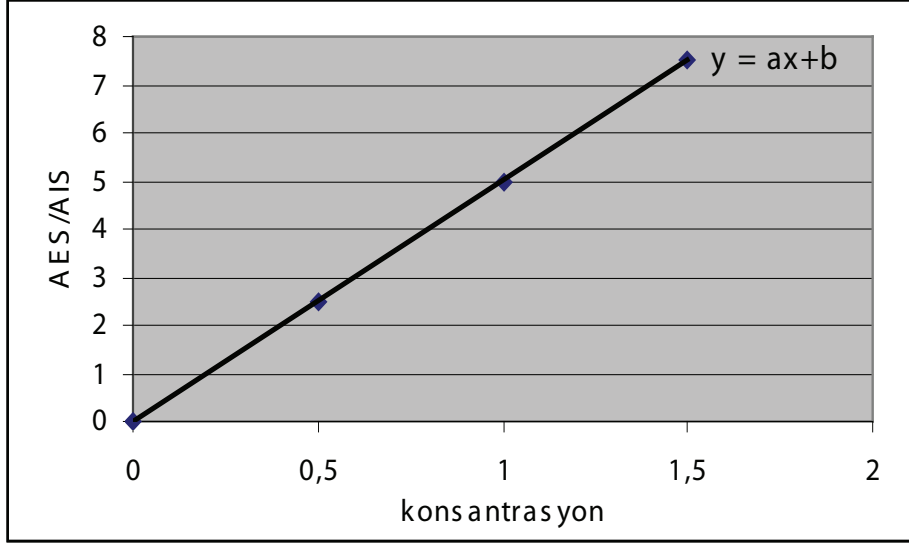
Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
DMZ	142	96	20 V	15	0,05
DMZ-d3	145	99	20 V	15	0,05
HMMNI	158	140	20 V	9	0,05
HMMNI-d3	161	143	20 V	9	0,05
IPZ	170	124	20 V	13	0,05
MNZ	172	128	20 V	9	0,05
IPZ-d3	173	127	20 V	15	0,05
MNZ- ¹³ C ₂ ¹⁵ N ₂	176	132	20 V	9	0,05
IPZOH	186	168	20 V	11	0,05
MNZOH	188	123	20 V	9	0,05
IPZOH-d3	189	171	20 V	11	0,05
MNZOH-d2	190	125	20 V	9	0,05
RNZ	201	140	20 V	9	0,05
RNZ-d3	204	143	20 V	11	0,05

7.5. Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analiz edilir (7.2.1.1–7.2.2.3). Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamadı.” şeklinde raporlanır.

Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu pozitif olarak değerlendirilir ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır. Sonuçlar cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matriks standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Her pik alanının iç standart pik alanına oranları hesaplanır. Hesaplanan bu değer konsantrasyona karşılık grafiğe aktarılır.



AES: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili nitroimidazol pikinin alanı

AIS: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı Numune analizi sonucunda numunede tespit edilen nitrofuran pikinin alanı ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g/L}$) : $x=(y-b)/a$

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Pendik VKE Doküman Veri Kontrol Prosedürü
2. Pendik VKE Metot Validasyonu Prosedürü
3. Pendik VKE Kalite Kontrol Prosedürü
4. ZİVAK ZV-1016-0200-35 LC-MS/MS Analiz Seti Süt Matrisinde Nitroimidazol Grubu Antibiyotikler Kalıntı Analizi Talimatı (ZV-1016-0200-35-KK-T Rev.01)

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan revizyonlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SÜTTE TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN CHARM-II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu test metodu, sütte sınırlı düzeyde bulunmasına izin verilen tetrasiklin türevi antibiyotiklerden oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin ve doksisisiklinin Charm II yöntemi ile kalitatif tespitini amaçlamaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, hayvansal kökenli gıda maddelerinden sütte tetrasiklin türevi (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin ve doksisisiklin) ilaçlara ait kalıntıların kalitatif tespiti için uygulanır.

Süt için tespit limitleri :

Tetrasiklin Türevleri	Sütte Tespit Limiti (ppb)	Sütte Maksimum Kalıntı limiti (ppb)
Oksitetrasiklin	100	100
Tetrasiklin	100	100
Klortetrasiklin	100	100
Doksisisiklin	100	Bulunmamalı

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR / ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
3. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
4. Numuneler, analizi yapılan kadar analit ve matriksin (numunenin) özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
5. Kimyasallar hazırlanırken ağızla çekilmemeli ve pipetör kullanılmalıdır. Eldiven ve gözlükle çalışma yapılmalıdır. Atıklar, kimyasal atık şişesine doldurulmalıdır.

6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

Charm- II testinin [³H] içeriği Nuclear Regulatory Commission ve Agreement State Regulations tarafından muaf tutulacak kadar düşüktür. Radyoaktif materyallere dokunduğunuz zaman aşağıdaki önlemleri alınız.

5.1. Pipetleme ağızla yapılmamalıdır.

5.2. Radyoaktif materyallere dokunurken sigara içmeyiniz, bir şey yemeyiniz ve kozmetik kullanmayınız. Bu esnada yemek sağlığı ciddi bir şekilde tehdit eder.

5.3. Radyoaktif materyallere dokunduktan sonra ellerinizi iyice yıkayınız.

5.4. Dökülen materyalleri hemen ve iyice siliniz.

5.5. Katı atıklar [³H] ya da [¹⁴C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller etiketlenerek karartıldıktan ya da uzaklaştırıldıktan sonra normal çöpe atılabilir.

5.6. Sıvı atıklar [³H] ya da [¹⁴C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller ya tıbbi atık çukurlarına konulmalı ya da bol su ile yıkanmalıdır. Belirtilen özel hususların dışında analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR / TANIMLAR

Analizör: Charm II 6600 analizörü. Cihaz örneklerin analizini yapar ve sayısal bir sonuç vererek yorumlar.

Bağlayıcı (Beyaz tablet): Bütün tetrasiklin türevi ilaçlara bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

Santrifüj Tüpü: 50 ml'lik konik tüpler. Örnek hazırlama ve ekstraksiyon aşamalarında kullanılır.

Kontrol Noktası: Negatif ve şüpheli pozitif sonuçların arasındaki kesişme noktasını gösteren sayıdır. Test sonuçlarının kontrol noktasından büyük olması örneğin negatif olduğunu, kontrol noktasından küçük veya eşit olması ise muhtemel pozitif olduğunu gösterir ve örneğin tekrar test edilmesi gerekebilir. Her yeni reaktif için yeni bir kontrol noktası oluşturulur ve bu kontrol noktası kitin son kullanma tarihine kadar geçerlidir.

CPM: Dakika sayıcısının kısaltmasıdır. Sonuç ölçüm birimi.

MRL Multi-Antimikrobiyal Standart: Amber şişe içerisinde toz halinde bulunan çeşitli antimikrobiyal ilaçlar içeren standart. 10 ml saf su ile çözüldüğünde 4000 ppb klortetrasiklin standardı içeren bir sıvı elde edilir. Bu standart örnek yüklemelerinde ve dilüe edilmiş pozitif kontrol yapmak için kullanılır.

Negatif (Zero) Kontrol Standart: Antimikrobiyal ilaç içermeyen süt tozu.

Negatif Kontrol Ortalaması: 3 Negatif Kontrol CPM sonuçlarının ortalamasıdır.

Optifluor: Radyoaktiviteyi açığa çıkaran sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [³H] moleküllerinden elde edilecek ışınlarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

Performans İzleme: Her çalışma gününde test prosedürünün doğrulanması ve ekipmanların fonksiyonlarını yerine getirebildiğinin görülmesi ve kontrol noktasının doğrulanmasıdır.

Pozitif Kontrol Ortalaması: 6 adet pozitif kontrolün CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Alternatif kontrol noktası belirlenmesi çalışmaları esnasında kullanılır.

ppb: Milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, µg/kg'a tekabül eder.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Tracer (Renkli Tablet): Kit tableti üzerinde işaretlerle belirtilmiş olan renkli tablet. Bu tablet [³H] ile işaretlenmiş olan klortetrasiklin standardı içerir.

Tipik Sayım Sayfası: Her kit için pozitif ve negatif kontrol noktalarının hesaplanacağı bir tablo içeren kit ile beraber verilen sayfa.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Sütte tetrasiklin türevi antibiyotiklerin test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip Charm-II cihazı ile tanımlanmasına yarayan hızlı bir immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. Dereceli pipet: 2 ml, 5 ml ve 25 ml.
2. Santrifüj tüpü: Polipropilen 50 ml.
3. Balon joje: 50 ml, 100 ml ve 1000 ml
4. Cam huni: 5cm ve 10 cm Ø.
5. Otomatik pipet: 1ml ve 5ml
6. Hassas terazi: CP 423 S (Sartorius, 1 mg hassasiyette)
7. Vorteks: Velp Scientetic, 0.0176
8. Soğutmalı santrifüj: Rotina 35 R (Hettich)
9. Charm-II inkübatör
10. Charm 6600 okuyucu
11. Otomatik pipet ucu: 1ml ve 5 ml

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tetrasiklin Standartları ; Oksitetrasiklin, Tetrasiklin, Klortetrasiklin ve Doksisklin

Negatif (Zero) Kontrol Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. Antimikrobiyal ilaçlardan arı süt tozu. 100 ml 40°C'deki şebeke suyu çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 4±2 °C'ye kadar soğutulur. Çözünmüş olan standart 2-6 °C'de 3 gün, -15 °C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

MSU Multi-Antimikrobiyal Standart (MSU-MA)

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 100 ml antibiyotik bulunmayan süt yada negatif kontrol standart ile çözülüp iyice çalkalanır.(Çözündükten sonra 30 ppb OTC ihtiva etmektedir.) Kullanmadan önce 15 dakika 4±2 °C'de tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6°C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

7.3. Numune Analizi

Kontrol Noktasının Oluşturulması için;

1. 6 adet pozitif kontrol standardı analiz edilir ve ortalaması alınır.
2. Ortalama CPM değeri bulunur.
3. Ortalamaya %23 eklenerek kontrol noktası tespit edilir.
4. Üç adet negatif kontrol standardı analiz edilir ve ortalaması bulunur. Bu Negatif Kontrol Ortalamasıdır.

Numunelerin Hazırlanması

1. Süt sağımdan sonra buzdolabında saklanmalı ve 5 gün içerisinde analiz edilmelidir.
2. Numune hemen analiz edilemeyecekse derin dondurucuda -15°C 'de veya altında 2 ay saklanabilir. Dondurulmuş numuneler çözündükten sonra santrifüjlenir. Çökelti oluşursa numuneler test uygulanmaz.
3. Test $4-35^{\circ}\text{C}$ 'de hava sirkülasyonu olan bir yerde yapılmalıdır. 12 örneğe kadar aynı anda test yapılabilir.
4. Numuneden 50 ml'lik santrifüj tüpüne 30 ml süt konur.
5. 4000 RPM'de $0-1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edilir.
6. Santrifüjden alınan sütün üzerindeki yağ tabakası uzaklaştırılır.

Analizin Yapılması

1. Boş test tüpüne beyaz tablet eklenir.
2. 0.3 ± 0.1 ml ($300 \mu\text{l} \pm 100 \mu\text{l}$) saf su eklenir.
3. Tabletın parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
4. Test tüpünün içine 5.0 ± 0.25 ml örnek ya da standart eklenir (her bir örnek için yeni uç kullanılır).
5. Süt 10 kez altüst olacak şekilde karıştırılır.
6. Turuncu tablet test tüpüne ilave edilir.
7. Test tüpü mikserde 15 saniye 15 kez tablet tamamen çözününceye değin karıştırılır. Tabletın eklenmesi karıştırılması işlemi 40 saniye içerisinde tamamlanmalıdır.
8. $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 3 dakika inkubasyona bırakılır.
9. 3300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
10. Üstteki ekstrakt dökülür (Santrifüj durduktan sonraki herhangi bir gecikme dipteki çökeltinin de ekstraktla birlikte dökülmesine neden olabilir). Test tüpünün kenarları emici bir kağıt havlu ile silinir.
11. Yağ tabakası swap yardımıyla uzaklaştırılır. Çökeltinin dağılmamasına dikkat edilmelidir.
12. $300 \mu\text{l} \pm 100 \mu\text{l}$ saf su eklenir. Tabletın parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
13. 3.0 ± 0.5 ml optiflour eklenir. Bulutumsu görüntü uniform bir şekilde dağılıncaya değin karıştırılır.
14. Analizörün içinde 60 saniye saydırılır. [^3H] kanalındaki CPM değerini okunur. Pozitif ya da negatif belirlemeye göre kontrol noktası ile karşılaştırılır.

7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

1. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden büyükse örnek “negatiftir”.
2. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden küçükse örnek “şüpheli pozitifdir”.
3. Negatif kontrol, negatif kontrol ortalamasının ± 20 % aralığında olmalıdır.
4. Pozitif kontrol, kontrol noktasından düşük olmalıdır.
5. Negatif olarak değerlendirilen örneklerin analiz sonucu negatif olarak raporlanır. Örnek ‘şüpheli pozitif’ olarak değerlendirildi ise örneğin konfirmasyon analizine alınması gerekir.
6. Ulusal Kalıntı İzleme Genelgesine göre belirli sayıda negatif örneği temsilen bir örnek konfirmasyon analizine alınır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLE

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
2. Bornova VKE Laboratuvar Güvenliği Prosedürü
3. Bornova VKE Deney Metotları ve Deney Metotlarının Geçerli Kılınması Prosedürü
4. Charm II Tetracycline Test for Maximum Residue Limits (MRL) Competitive Assay Operator’s Manuel for Milk
5. Charm II Test for Tetracycline Drugs in Tissue 06/07
6. Charm Control Point Setup worksheets

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

YUMURTADA KLORAMFENİKOL KALINTILARININ ELISA YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu test metodu, gıda değeri olan hayvanlarda kullanımı yasaklanmış olan kloramfenikolün yumurtada Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile kalitatif tespitini amaçlamaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, yumurta numunelerinde kloramfenikolün kalitatif tespiti için uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Absorbans: Bir ışık demeti bir maddeden geçerken ışığın madde tarafından emilen kısmı, geçirgenliğin negatif logaritması, optik yoğunluk, soğurganlık, OD.

ELISA: Enzym Linked Immuno Sorbent Assay. Belli bir enzimle işaretlenmiş test maddesi olan antijen veya antikor kullanılarak spesifik antijen veya antikoru belirleme amacıyla uygulanan, çok duyarlı bir laboratuvar yöntemi.

Kromojen: Pigment hâline dönüşebilen öncü madde; renk verici maddeyi oluşturan kendisi renksiz herhangi bir madde.

Substrat: Belirli bir enzimin özgün olarak etkilediği bir bileşik veya reaksiyona giren madde.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Blank: Negatif numune

Spayk: Standart yüklü numune

MRPL: Minimum Required Performance Limit, Gerekli En Az Performans Limiti

ppm: Parts per milion. Milyonda bir tanımlamasının kısaltmasıdır. mg/kg'a tekabül eder.

nm: Nanometre

ppb: Milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, µg/kg'a tekabül eder.

ppt: Parts per trillion, trilyonda bir tanımlamasının kısaltmasıdır, ng/kg'a tekabül eder.

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

N: Normal

OD: Optik dansite

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot yumurta numunelerinde kloramfenikolün test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip ELISA yöntemi ile 450 nm dalga boyuna sahip spektrofotometrede (ELISA okuyucu) absorbansının ölçülmesine dayanan immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. Dereceli pipetler (1 ml, 5 ml ve 10 ml'lik)
2. Santrifüj tüpleri (Polipropilen 50 ml'lik)
3. Cam tüpler (vida kapaklı, 10 ml'lik)
4. Mezür (25 ml'lik)
5. Balon joje (10 ml, 50 ml, 100 ml ve 1000 ml'lik)
6. Cam huni (5cm ve 10 cm çapında)
7. Filtre (0,45 nm)
8. Otomatik pipetler (1ml ve 5ml'lik)
9. Mikropipet: 100µl ve 1000 µl
10. Otomatik ve mikropipet uçları
11. Blender
12. Karıştırıcı
13. Hassas terazi (1 mg hassasiyette)
14. Vorteks
15. Çoklu vorteks
16. Soğutmalı santrifüj
17. Çoklu uçurucu
18. ELISA plate okuyucu (Bio-Tek, EL808)

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Etil Asetat, analitik saflıkta
2. N-Hekzan, analitik saflıkta
3. Methanol, analitik saflıkta
4. Referans Standart: Chloramphenicol (Sigma Aldrich, 31667, CAS:56-75-7)
5. Kloramfenikol Enzim Konjugatı,
6. Kromojen,
7. Stop Solüsyon,
8. Buffer
9. Mirotiterplatte (96' lık)
10. Kloramfenikol Standart Solüsyonları,

Standart 1: 0 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,

Standart 2: 25 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,

Standart 3: 50 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,

Standart 4: 100 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,

Standart 5: 250 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,

Standart 6: 750 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon,

11. Yıkama Çözeltisi-PBST: Kit ile birlikte gelen yıkama solüsyonu bidistile su ile çözündürülüp son hacim 1000 ml' ye tamamlanır. 1 ay buzdolabında saklanarak kullanılabilir

12. Kloramfenikol Enzim Konjugatı: Bir kısım kloramfenikol enzim konjugatı, on kısım buffer ile 1:11 oranında dilüe edilir.

13. Kloramfenikol Ana Stok Standardı (0,1 mg / ml-100 ppm): 10 ± 01 mg Kloramfenikol standardı, metanol ile 100 ml hacimli balonda çizgisine kadar dilüe edilir (karanlıkta -20 °C ile -30 °C arasındaki derin dondurucuda 3 ay saklanabilir).

14. Kloramfenikol Ara Stok Standardı (1 µg / ml-1 ppm): 100 µl Kloramfenikol Ana Stok solüsyonu, metanol ile 10 ml'lik ölçülü balonda ölçü çizgisine kadar dilüe edilir (karanlıkta -20 °C ile -30 °C arasındaki derin dondurucuda 1 ay saklanabilir).

15. Kloramfenikol Spayk Standardı (0.010µg/ml-10 ppb): 100 µl Kloramfenikol ara stok solüsyonu, saf su ile 10 ml'lik ölçülü balonda çizgisine kadar dilüe edilir (buzdolabında ve karanlıkta 1 hafta saklanabilir).

Not: Kitler kullanılmadan önce 2-8°C'ler arasında saklanmalıdır. Son kullanma tarihi geçen kitler kesinlikle kullanılmamalıdır. Kit içerisinden çıkan aynı lot numaralı solüsyonlar ile kullanılmalıdır; lot numarası farklı kitler ile solüsyonlar bir arada kullanılmamalıdır. Kullanımı tamamlanan tüm solüsyonlar derhal buzdolabına konulmalıdır. Kitin kullanılmamış kısmı, orijinal ambalajında ve buzdolabında saklanmalıdır.

Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yönteminin tekrarlanabilirliği büyük ölçüde yıkama işlemi yapılan kuyucukların bir örnekliliğine bağlı olup, ELISA test prosedürü sıranın dikkatli bir şekilde takip edilerek uygulanması gerekmektedir. Test prosedürü aşamasında kit kuyucuklarının kurumasına asla izin verilmemelidir. Çalışmalar esnasında hazırlanan reagentlar el

ile karıştırılmalı, kesinlikle vortex kullanılmamalıdır. İnkübasyon sırasında kuyucukların direk gün ışığına maruz kalmaması için, kuyucukların üzeri örtülmelidir. Kromojen ışığa duyarlı olduğundan, kuyucuklara kromojen ilave edildikten sonra inkübasyon sırasında karanlıkta bekletilmelidir. Renk bozukluğu şekillenen kromojen kullanılmamalıdır. 1 N sülfürik asit içeren stop solüsyonun kullanımını esnasında deri ile temasından kaçınılmalıdır. Yapılan kontrol sonucunda standartlar arasındaki korelasyonu uygun olmayan kitler kullanılmamalıdır. Standart 1 (0 ppt) solüsyonunda herhangi bir bozulma meydana geldiğinde, 0.6 absorbans ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) değerinden daha düşük bir absorbans değeri verdiği göz önünde bulundurulmalıdır. Standart 1 ve standart 4 absorbans değerleri arasında belirgin bir farklılık bulunmalıdır.

7.3. Numune Analizi

Analizin ana basamakları; numunenin homojen hale getirilmesi, etil asetat ile ekstrakte edilmesi, azot gazı altında uçurularak bufer ile son hacmin elde edilmesi, uygun bir konjugat ve spesifik substrat aracılığı ile inkübasyona bırakılması, ELISA okuyucuda 450 nanometrede tespit edilmesi.

Analiz için;

1. Yumurta numuneleri homojen hale getirilir.
2. Yumurta numunesinden 50 ml'lik santrifüj tüpüne $2,0 \pm 0,1$ g tartılır.
3. 12 ml etil asetat eklenerek 15 dk otomatik vorteks ile karıştırılır.
4. 15 dakika 20°C de 4000 rpm'de santrifüj edilir.
5. Etil asetat fazından 6 ml cam tüpe alınır. 55°C 'de azot gazı ile uçurulur.
6. 1 ml buffer ve 3ml n-heksan eklenir ve 15 dakika vortekslenerek çözülür.
7. 15 dakika 4°C de 4000 rpm'de santrifüj edilir.
8. Alt fazdan 0,5 ml mikropipet ile alınır.
9. 0,45 nm filtreden süzülerek 10 ml'lik cam tüplere alınır.

Homojenize edilmiş kontrol ve standart yüklü (10 ppb kloramfenikol spayk standardından her 1 gr örnek için 30 μl ilave edilir) örneklere yukarıdaki ekstraksiyon işlemleri aynen tekrarlanır.

7.4. Mikroplate Uygulama

1. Kit içerisindeki plate ve tüm solüsyonlar analiz öncesinde, karanlık ortamda oda ısısına ($20 - 25^{\circ}\text{C}$) gelinceye kadar bekletilir.
2. Kullanılacak standart ve numune sayıları düşünülerek gerekli sayıda kuyucuk başka bir mikroplate alınır. Mikroplate yerleşim planı standartlar, kontrol örnekleri, spayk örnekleri, numuneler şeklinde olmalıdır (Tablo.2). Günlük laboratuvar çalışmalarında Std 1 ve 6 kullanılır. Mikroplate yerleşim planı kullanılan standartlara uygun şekilde hazırlanır.

Tablo.1. Mikroplate Yerleşim Planı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	N1	N9	“	“	“	“	“	“	“	“	“
B	Std 2	N2	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
C	Std 3	N3	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
D	Std 4	N4	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
E	Std 5	N5	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
F	Std 6	N6	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
G	Blk	N7	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
H	Spk	N8	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“

Std: Kloramfenikol Standart Solüsyonu

Blk: Kontrol Örneği

Spk: Spayk Örneği

N: Numune

3. Tüm kuyucuklara ilgili standartlar ve örneklerden 50 µl eklenir.
4. Kuyucuklara 50'şer ml dilue edilmiş enzim konjugatı ilave edilir.
5. Mikroplate, karanlık bir ortamda, oda ısısında (20 – 25 °C) 1 saat süre ile inkübasyona bırakılır.
6. İnkübasyon süresi biten mikropleyte oda ısısına gelmiş yıkama solüsyonundan her bir kuyucuk için 250 µl olacak şekilde çoklu mikropipet yardımı ile eklenir, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırılır ve dökülür. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edilir.
7. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 100'er µl kromojen solusyonundan ilave edilir.
8. Kromojen ilave edilmiş plate, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırılır.
9. Mikroplate, karanlık bir ortamda, oda ısısında (20 – 25 °C) 15 dakika süre ile inkübasyona bırakılır.
10. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 100 µl stop solüsyon ilave edilerek, mikroplate dikkatlice karıştırılır.
11. Mikroplate, ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda, 30 dakika içerisinde okutulmalıdır.

7.5. Analiz Sonuçlarının Değerlendirmesi

1. Sonuçların Değerlendirilmesi

Cut-off değerine eşit veya daha düşük absorbans veren örnekler şüpheli pozitif, daha yüksek absorbans veren örnekler negatif olarak değerlendirilir. Şüpheli pozitif olarak değerlendirilen örnekler konfirmasyon testi uygulanır. Kloramfenikol A6 grubunda bulunan yasaklı ilaçlardır. Minimum gerekli performans limiti 0.3 ppb olarak belirlenmiştir.

2. Geri Alım Değeri

1. Kontrol numunesinin ve spaykların absorbanları karşılaştırılarak,
2. Standart ve spayk absorbanları karşılaştırılarak uygun bir geri alım yapılıp yapılmadığına karar verilir.

Not: Bu test metodunda geçerlilik için, 2002/657 AB direktifi uygulanır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
1. ANONİM (2002a), 2002/657 AB direktifi Implementing Council Directive 96/23 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Bornova VKE Laboratuvar Güvenliği Prosedürü
2. Bornova VKE Laboratuvarında Güvenli Çalışma Talimatı
3. Bornova VKE Enstitü Atıklarının İmhası Talimatı
4. R-Biopharm RİDESCREEN Chloramphenicol, Enzyme İmmunoassey fort the quantitive analysis of chloramphenicol Art No:R1505

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

YUMURTADA NİTROFURAN GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1 AMAÇ

Yumurtada nitrofuran grubu ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizlerinin yapılması.

2 UYGULAMA ALANI

Bu metot, yumurtada toplam nitrofuran metaboliti kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

Furazolidone metaboliti : (AOZ) 3-amino-2-oxazolidinone,

Furaltadone metaboliti: (AMÖZ) 5-methyl-morpholino-3-amino-2-oxazolidinone,

Nitrofurazone metaboliti: (SEM) semicarbazide,

Nitrofurantion metaboliti: (AHD) 1-aminohydantoin,

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
3. Her analizden önce cihaza 6 ng/mL'lik standart enjeksiyonu yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilir.
4. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanır. Kalite Kontrol Grafiğinin hazırlanması ve Kullanılması (P.19) Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.
5. Türevlendirme işlemi 16 saatten az olmamalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS: Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

İS : Internal standart (İç standart)

ES: Eksternal standart

2-NP-AOZ, 2-NP-AMOZ, 2-NP-AHD, 2-NP-SCA: Türevlendirilmiş nitrofuran metabolitleri

MRPL: (Minimum Required Performance Level) Gerekli minimum performans seviyesi

LOD: Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ: Ölçüm limiti (Limit of quantitation)

CC α : Karar limiti

CC β : Tespit Limiti

CV: Tekraredilebilirlik (Repeatability)

PP: Polipropilen

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 4 aşamayı içermektedir;

- Asidik ortamda seberst ve dokuya bağlı nitrofuran kalıntılarının 2-nitrobenzaldehit ile türevlendirilmesi,
- Baz ilavesi ile türevlendirme reaksiyonunun durdurulması,
- Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
- LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- PP Santrifüj tüpü 50 mL'lik
- Cam tüp 15 mL'lik
- Enjektör 2 mL'lik
- 0.45 mikron filtre
- Pipet ucu (200–1000–5000 μ L'lik)
- Ayarlanabilir pipet 20–200 μ L
- Ayarlanabilir pipet 100–1000 μ L
- Ayarlanabilir pipet 1000–5000 μ L
- Hassas terazi

- Çalkalamalı etüv
- Multireaks vorteks
- Soğutmalı santrifüj
- Numune yoğunlaştırıcı
- Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS
- Kromatografik program: Tandem Gold Workstation

7.2. Kullanılan Kimyasallar

- S1: Dokuda nitrofuran analizi için ES (-20 °C'de saklanmalıdır).

S1 Nitrofuran standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/kg (ppb)
AMAZ	201,2	20
AZ	102,1	20
AHD	151,5	20
SEM	111,5	20

- R1: Dokuda nitrofuran analizi için İS (-20 °C'de saklanmalıdır)

R1 iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/kg (ppb)
AMAZ-D5	206,2	40
AZ-D5	106,1	40
SEM-13C15N2	114,5	100

- R2: Dokuda nitrofuran analizi için -%1 Asetik asit (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R3: Dokuda nitrofuran analizi için -DMSO (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R4: Dokuda nitrofuran analizi için -50 mmol Amonyum Format (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R5: Dokuda nitrofuran analizi için -Etil Asetat (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R6: Dokuda nitrofuran analizi için -Hekzan (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- R7: Dokuda nitrofuran analizi için -Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- Mobil Faz A: Nitrofuran analizi için -%20 Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- Mobil Faz B: Nitrofuran analizi için -Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).

7.3. Numunenin Analizi

- 2.0 g yumurta numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- 100 µL R1 ve 5 mL R2 ilave edilir, çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika karıştırılır.
- 300 µL R3 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 1 dakika karıştırılır.
- 50 rpm hıza ve 37 °C'ye ayarlı çalkalamalı etüvde 16 saat bekletilir.
- Türevlendirmeden sonra örnekler etüvden alınarak oda sıcaklığına gelmesi için beklenir.
- 700 µL R4 ilave edilir. Çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika karıştırılır.
- Üzerine 5 mL R5 ilave edilir. Çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 2 dakika karıştırılır.
- 3 mL R6 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 2 dakika karıştırılır.
- 4000 g'de 15°C' ye ayarlı santrifüjde 10 dk santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda, üstteki çözültiden pipet ile 6 mL (2x3 mL) alınıp 15 mL'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında 42 °C sıcaklıkta ve 5,0 psi basınçta kurutulur.
- Kurutma işleminden sonra tüpe 1 mL R6 ilave edilir. Multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır. 750 µL R7 ilave edilir. Multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır. 2500 g'de 15°C' ye ayarlı santrifüjde 10 dakika santrifüj edilir, 5 dakika ortam sıcaklığında bekletilir.
- Enjektör yardımıyla alt fazdan dikkatlice numune alınır ve enjektöre takılan 0.45 mm filtreden geçirilerek polipropilen vialer alınır. LC-MS/MS sistemine 75 µL enjeksiyon yapılır.
- 3 adet 2.0 g blank yumurta numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- Üzerine aşağıdaki tabloya uygun S1 ilave edilir.

Dokudaki Konsantrasyon	0,5 µg/kg (0,5MRPL)	1 µg/kg (1MRPL)	1,5 µg/kg (1,5MRPL)
Eklenecek Standart Hacmi	50 µL	100 µL	150 µL

- Hazırlanan bu dokulara numaralı işlemler uygulanır.

7.4. LC-MS/MS ile Doğrulama Analizi

- HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	85	15	0.20
03:00	50	50	0.20
07:00	30	70	0.20
09:30	25	75	0.20
09:31	0	100	0.20
12:00	0	100	0.20
12:06	85	15	0.25
17:00	85	15	0.25
17:06	85	15	0.20
20:00	85	15	0.20

Kolon: Nitrofuran grubu HPLC kolonu 150x2,0 mm 4µ

Akış hızı: 0.20 mL/dak

Enjeksiyon hacmi: 75µL

Otomatik örnekleme yıkama solventi: 15:85 MeOH: Su karışımı (h/h)

• MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	400 °C
Drying gas pressure	40si
Scan Time	0.725 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 500V
Capillary	30V
Detector	+ 1700 V
CID Gas Pressure	2.00 mTorr
Spray Chamber T	65°C
Mass peak width in amu	Q1=1.0 Q3=1.0

• MS-MS tarama parametreleri

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
2-NP-SEM	209,00	166,00	30	7	0,200
2-NP-SEM-13C15N2	212,00	168,00	30	7	0,075
2-NP-AHD	249,00	134,00	40	9	0,200
2-NP-AOZ	236,00	134,00	30	9	0,075
2-NP-AOZ-D4	240,00	134,00	30	9	0,050
2-NP-AMOZ	335,00	291,00	30	9	0,075
2-NP-AMOZ-D5	340,00	296,00	30	9	0,050

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analiz edilir Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamamıştır.” şeklinde raporlanır.

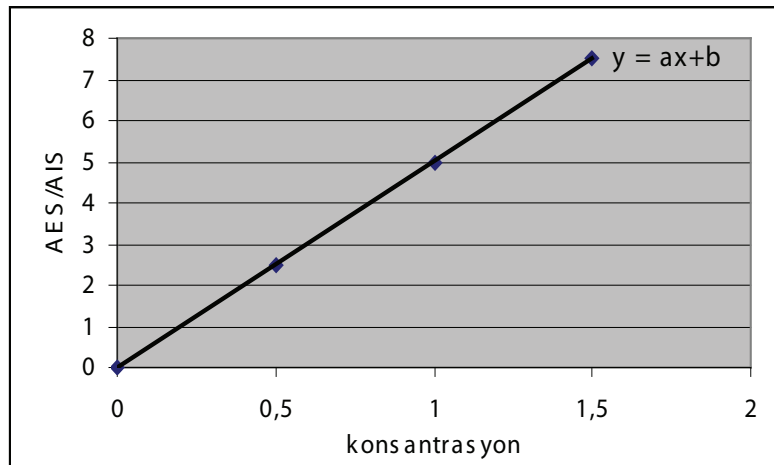
Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik

bulunursa doğrulama metodu (MS-MS tarama parametreleri aşağıdaki tabloda verilmiştir) ile cihaza enjeksiyon yapılır. Standartlardaki iyonların oranı ile numunedeki iyonların oranı karşılaştırılarak analiz sonucu değerlendirilir. Pozitif sonuçlar için hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır.

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
2-NP-SEM	209,00	166,00	30	7	0,118
		134,00	30	9	0,118
		192,00	30	11	0,118
2-NP-AHD	249,00	134,00	30	9	0,059
		104,00	30	11	0,059
		178,00	30	9	0,059
2-NP-AOZ	236,00	134,00	30	9	0,059
		104,00	30	12	0,059
2-NP-AMÖZ	335,00	291,00	30	9	0,059
		262,00	30	7	0,059
		128,00	30	6	0,059
2-NP-AOZ-D4	240,00	134,00	30	9	0,059
2-NP-AMÖZ-D5	340,00	296,00	30	9	0,059
2-NP-SEM-13C15N2	212,00	168,00	30	7	0,059

Sonuçlar cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Her pik alanının iç standart pik alanına oranları hesaplanır. Hesaplanan bu değer konsantrasyona karşılık grafiğe geçirilir.





AES: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili nitrofuran pikinin alanı

AIS: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı

Numune analizi sonucunda numunede tespit edilen nitrofuran pikinin alanı ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. ZİVAK ZV-1015-0200-30 LC-MS/MS Analiz Seti Doku Matrisinde Nitrofuran Grubu Antibiyotikler Kalıntı Analizi Talimatı (ZV-1015-0200-30-KK-T Rev.01)

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

YUMURTADA NİTROİMİDAZOL İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1 AMAÇ

Yumurtada Nitroimidazol grubu ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizlerinin yapılması.

2 UYGULAMA ALANI

Bu metot, taze ve liyofilize yumurtada toplam nitroimidazol ve metaboliti kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

Metronidazol (MNZ), 1-(2-hidroksietil)-2-metil-5-nitroimidazol

Ronidazol (RNZ), 1-Metil-2-metil-5-nitroimidazol

Dimetridazol (DMZ), 1,2-Dimetil-5-nitroimidazol

İpronidazol (IPZ), 2-İzopropil-1-metil-5-nitroimidazol

Metronidazol Hidroksit (MNZ-OH),

İpronidazol Hidroksit (IPZ-OH),

2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI),

Nitroimidazoller ve hidroksi metabolitleri, kimyasal yapı olarak Lewis-Base özelliğine sahip bileşiklere kapalı olan bileşiklerdir. Bu bileşikler ve metabolitleri karsinojenik ve mutajenik etkilidirler. Ronidazol, Metronidazol ve Dimetridazol, yasaklı ilaçlar (Annex IV of Concuil Regulation (EEC) No.2377/90) kapsamındadır (1).

Nitroimidazoller, özellikle kanatlı sektöründe koksidiyozis ve histomoniazisin tedavisi ve kontrolünde kullanılan antibiyotiklerdir. Ayrıca sığırların trikomoniazis ve domuzların hemorajik enteritlerinin tedavisinde de kullanılmaktadır (1)

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme

kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.

3. Her analizden önce cihaza 6 ng/ml'lik standart enjeksiyon yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilmelidir.
4. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanmalı, grafiğinin hazırlanması ve kullanılması, Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmelidir.
5. Türevlendirme işlemi 16 saatten az olmamalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 TANIMLAR

HPLC : Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS: Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

İS : İnternal standart (İç standart)

ES: Eksternal standart

DMZ, HMMNI, IPZ, MNZ,IPZOH,MNZOH,RNZ: Nitroimidazol metabolitleri

DMZ-d₃,HMMNI-d₃,IPZ-d₃, MNZ-¹³C₂¹⁵N₂,IPZOH-d₃,MNZOH-d₂,RNZ-d₃:nitroimidazol metabolitleri

MRPL: (Minimum Required Performance Level) Gerekli minimum performans seviyesi

LOD: Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ: Ölçüm limiti (Limit of quantitation)

CC_α: Karar limiti

CC_β: Tespit Limiti

CV: Tekraredilebilirlik (Repeatibility)

PP: Polipropile

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 3 aşamayı içermektedir.

1. Proteinlerin çöktürülmesi ve uzaklaştırılması,
2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
3. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

- Santrifüj tüpü 50 mL'lik,
- Cam tüp 15 mL'lik,
- Enjektör 2 mL'lik,
- Filtre 0.45 µm,
- Pipet ucu (200–1000–5000 µL'lik),
- Ayarlanabilir pipet 20–200 µL,
- Ayarlanabilir pipet 100–1000 µL,
- Ayarlanabilir pipet 1000–5000 µL,
- Hassas terazi
- Multireaks vorteks
- Soğutmalı santrifüj
- Numune yoğunlaştırıcı
- Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS,
- Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1),

7.2. Kullanılan Kimyasallar

- S1: Kasta nitroimidazol analizi için ES (-20 °C'de saklanmalıdır)

S1 Nitroimidazol standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
DMZ	141	400
HMMNI	157	400
IPZ	169	400
MNZ	171	400
IPZOH	185	400
MNZOH	187	400
RNZ	200	400

- R1: Kasta nitroimidazole analizi için İS (-20 °C'de saklanmalıdır)

R1 iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
DMZ-d3	144	400
HMMNI-d3	160	1200
IPZ-d3	172	400
MNZ- ¹³ C ₂ ¹⁵ N ₂	175	400
IPZOH-d3	188	400
MNZOH-d2	189	400
RNZ-d3	203	400

- R2:Yumartada nitroimidazol analizi için Etil Asetat (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)
- R3: Yumartada nitroimidazol analizi için Hexan (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)
- R4: Yumartada nitroimidazol analizi için Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)
- Mobil Faz A: Nitroimidazol analizi için %50 Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)
- Mobil Faz B: Nitroimidazol analizi için Metanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)

7.3.Numunenin Analizi

Yumurtanın Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyonu

- 4.0 g yumurta numunesi, 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- 100 µL R1 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 1 dakika karıştırılır.
- 10 mL R2 ilave edilir ve multireaks vorteksin son hızında 3 dakika karıştırılır.
- 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda, üstteki çözültiden ayarlanabilir pipet ile 7 mL (2x3,5 mL) alınıp 15 mL'lik cam tüpe aktarılır ve azot akışı altında 37 °C sıcaklıkta ve 10.0 psi basınçta kurutulur.
- Kurutma işleminden sonra tüpe 1,5 mL R3 (2x750 µL) ilave edilir ve multireaks vorteksin 10. hızında 1 dakika karıştırılır.
- Üzerine 1 mL R4 ilave edilir ve multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika karıştırılır.
- Altta kalan fazdan enjektör yardımıyla dikkatlice numune alınır ve enjektöre takılan 0.45 mm filtreden geçirilerek polipropilen vialle alınır. LC-MS/MS sistemine 50 µL enjeksiyon yapılır.

Matriks Standardının Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyon

- 3 adet 4.0 g blank yumurta numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- Üzerine aşağıdaki tabloya uygun S1 ilave edilir.

Yumurtada Konsantrasyon	0,5 µg/L (0,5MRPL)	1 µg/L (1MRPL)	1,5 µg/L (1,5MRPL)
Eklenecek Standart Hacmi	25 µL	50 µL	75 µL

7.4. Cihaz Parametreleri

LC-MS-MS ile ilgili parametreler;

- HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	80	20	0.20
01:50	50	50	0.20
06:00	30	70	0.20
06:01	80	20	0.20
12:00	80	20	0.20

Kolon: Nitroimidazol grubu HPLC kolonu 150x2,0 mm 4µ

Akış hızı: 0.20 mL/dak

Enjeksiyon hacmi: 50µL

Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 15:85 MeOH: Su karışımı (h/h)

- MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	350 °C
Drying gas pressure	36 psi
Scan Time	0.700 sec
SIM Width	1.0 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 500V
Capillary	30V
Detector	+ 1750 V

CID Gas Pressure 2.00 mTorr

Spray Chamber T 65°C

Mass peak width in amu Q1=1.0 Q3=1.0

• MS-MS tarama parametreleri

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
DMZ	142	96	20 V	15	0,05
DMZ-d3	145	99	20 V	15	0,05
HMMNI	158	140	20 V	9	0,05
HMMNI-d3	161	143	20 V	9	0,05
IPZ	170	124	20 V	13	0,05
MNZ	172	128	20 V	9	0,05
IPZ-d3	173	127	20 V	15	0,05
MNZ- ¹³ C ₂ ¹⁵ N ₂	176	132	20 V	9	0,05
IPZOH	186	168	20 V	11	0,05
MNZOH	188	123	20 V	9	0,05
IPZOH-d3	189	171	20 V	11	0,05
MNZOH-d2	190	125	20 V	9	0,05
RNZ	201	140	20 V	9	0,05
RNZ-d3	204	143	20 V	11	0,05

7.5. Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

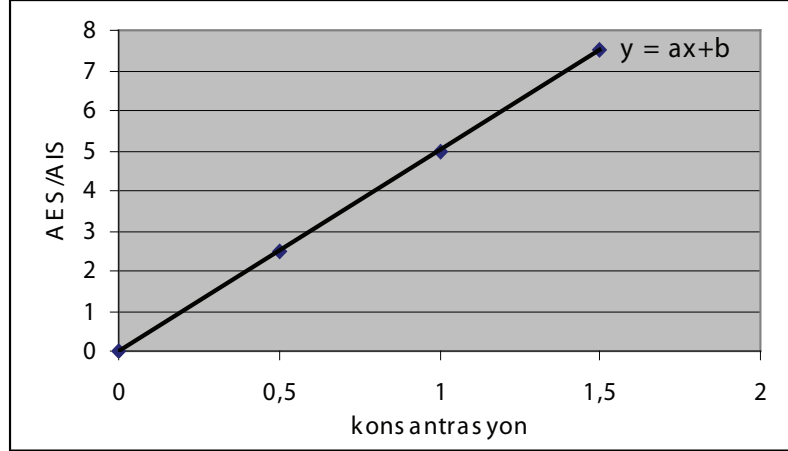
Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analiz edilir .

Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamadı.” şeklinde raporlanır.

Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu pozitif olarak değerlendirilir ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır.

Analiz sonuçları, cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Her pik alanının iç standart pik alanına oranları hesaplanır. Hesaplanan bu değer konsantrasyona karşılık grafiğe aktarılır.



AES: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili nitroimidazol pikinin alanı

AIS: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı Numune analizi sonucunda numunede tespit edilen nitrofuran pikinin alanı ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Pendik VKE Doküman Veri Kontrol Prosedürü
2. Pendik VKE Metot Validasyonu Prosedürü
3. Pendik VKE Kalite Kontrol Prosedürü
4. ZİVAK ZV-1016-0200-35 LC-MS/MS Analiz Seti Doku Matrisinde Nitroimidazol Grubu Antibiyotikler Kalıntı Analizi Talimatı (ZV-1016-0200-35-KK-T Rev.01)

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan revizyonlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SÜTTE NONSTEROİD ANTI İNFLAMATUAR GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Sütte nonsteroid anti inflamatuvar grubu ilaç (NSAID) kalıntılarının LC-MS/MS ile analizinin yapılması.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, çiğ sütte NSAID (non-steroid anti-inflamatuvar) Fluniksin hidroksit (FLU-OH), Fluniksin (FLU) , Karprofen (CPF), Fenilbütazon (PBZ), Tolfenamik asit (TOL), Diklofenak (DC) ve Meloksikam (MEL) ilaç kalıntılarının HPLC-DAD ve LC-MS sistemin de analizi amacı ile geliştirilmiştir.

NSAID' ler kimyasal olarak heterojen bir gruba sahiptirler ve bileşiklerin birbirleriyle ilişkileri azdır. Buna rağmen hemen hepsi organik asit yapısındadır.

Bu gruptaki ilaçlar temel olarak aşağıdaki gruplarda incelenirler:

1. Salisilik asit türevleri (Diklofenak)
2. Enolik asit türevleri (Meloksikam)
3. Fenamik asit türevleri (Tolfenamik asit)
4. Propiyonik asit türevleri
5. Pirazol türevleri
6. Anilin türevleri (nikotinik asit ve anthranilik asit türevleri dâhil)
7. Oksikam türevleri

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK / UYARILAR / ÖNLEMLER

- 1 Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
- 2 Standartlar numune hazırlanan ortamda hazırlanmamalıdır.
- 3 Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme

kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.

- 4 Analizden önce analitlerin tespit limitleri (varsa MKL) düzeyinde standart karışımı enjeksiyonu yapılarak sistemin performansı kontrol edilir. Analize başlayabilmek için alıkonma zamanındaki sapmanın $\pm\%5$ 'ten az ve piklerin alanlarındaki farkın $\pm\%10$ 'dan az olması gerekir.
- 5 Kullanılan LC kolonu her seri analizden sonra temizlenip uygun çözücü sisteminde saklanmalıdır.
- 6 Her seri analizden sonra cihazın tampon çözelti geçen hattı su geçirilerek temizlenmeli, MS sisteminin "cone" kısmı su püskürtülerek ya da çok kirli ise yerinden çıkarılıp yıkanarak temizlenmelidir.
- 7 Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol test grafiği hazırlanır. Kalite Kontrol Test Grafiğinin Hazırlanması ve Kullanılması (P.19) Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.
- 8 Stok standartlar asidik ortamda daha uzun stabil kalırlar.
- 9 Çalışma standartları mutlaka final çözeltisi ile hazırlanmalıdır. Farklı çözeltilerde hazırlanıp enjeksiyon yapılan standartlarda RT yanıltıcı sonuç verebilir.
- 10 Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5- KISALTMALAR/TANIMLAR

1. ACN: Asetonitril
2. MeOH: Metanol
3. HPLC: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi
4. LC-MS/MS: Likit Kromatografisi / Kütle Spektrometresi
5. DİS: Deiyonize Su
6. MKL: Maksimum Kalıntı Limiti
7. N₂: Azot
8. P.P: Polipropilen Santrifüj Tüpü
9. NSAIDs: Non-Steroid Anti-İnflamatuar Grubu İlaçlar

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

1. Protein çöktürülmesi ve uzaklaştırılması
2. Likit faz ekstraksiyonun ayrıştırılması ve yoğunlaştırılması,
3. Kalıntıların çözdürülmesi ve
4. LC-MS/MS ile ölçümü

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. MSQ LC-MS/MS Thermo Finigan
2. Phenomenex İnertsil 5u, ODS-2 150A, 150 x 3.00 mm, 5 micron SN. 532970-1
3. Ayarlanabilir pipetler 100 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL, 10000 µL ve pipet uçları
4. Hassas terazi
5. Soğutmalı santrifüj
6. Vortex
7. Multireaks
8. Ultrasonik banyo
9. 10, 500, 1000 mL lik balon joje
10. 500'lük mezür
11. Tek kullanımlık 50 mL santrifüj tüpü
12. Tek kullanımlık 15 mL tüp
13. Tek kullanımlık 2 mL şırınga
14. Tek kullanımlık 0,44 µm şırınga filtresi
15. 1.8 mL autosampler vial
16. Vakumla süzme düzeneği

7.2. Kullanılan Kimyasallar

1. Asetonitril (ACN) HPLC grade
2. Methanol (MeOH) HPLC grade
3. Amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)
4. Sodyum klorür (NaCl)
5. Asetik asit
6. Distille ve deionized Su (Laboratuar içi üretim, Millipore –Q Plus- Ultra Water System)
7. Flunixin hidrokset (FLU-OH)
8. 4-Metilamino antipirin (4-MAA),
9. Asetilsalisilik Asit (ASA)
10. Fenilbütazon (PBZ)
11. Tolfenamik Asit (TOL)
12. Diklofenak (DİK),
13. Meloksikam (MEL),

14. Çözeltiler

- a. Final Çözücü Çözeltisi (Mobil faz) : 100 mL'lik mezür içerisine sırasıyla 25 mL asetonitril (ACN), 50 mL amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) (Asetik asitle pH=4.80 ayarlanır) ve 25 mL metanol (MeOH) ilave edilir. Ultrasonik banyoda yeterli süre bekletilerek hazırlanır. Etiket yazılarak temiz bir şişeye aktarılır.
- b. Mobil Faz B Amonyum Asetat(0.05 M) pH= 4.80 : Hassas terazide 1,927 g amonyum asetat tartılır. 1 L'ye distile su ile tamamlanır. Asetik asitle pH= 4.80'e ayarlanır. 0.45 µ filtreden vakum altında süzdürülür. Her analizde yenisi hazırlanmalı ve analizlerde süzme işlemi tekrarlanmalı, pH kontrol edilmelidir.
- c. Stok Standart Hazırlama Çözeltisi : Stok standartlar metanolde çözdürüldü. Meloksikam %0.9 NaCl çözeltisinde çözdürülüp gereken hacime tamamlandı.

15. Kullanılan Standart Çözeltiler

a. S_0 Stok Standart Çözeltisi Hazırlanması(1mg/ml=1000 ppm):

Her standart bileşikten 10,0 mg \pm 0.05 mg tartılır ve 10 mL volumetrik tüplere aktarılır. Tüplere 5 mL metanol konur ve ultrasonik banyoda 30 sn çözünmesi beklenir vortekslenir ve 10 mL'ye tamamlanır. Meloksikam standardı önce 2-3 mL % 0.9 luk NaCl çözeltisinde çözdürülür daha sonra metanolla 10 mL'ye tamamlanır. Stok standartlar Fenilbütazon (PBZ) hariç koyu şişelerde 2-10 °C 'de 12 ay süreyle saklanabilir. Fenilbütazon (PBZ), 1 ay stabilitesini koruyabilir.

Çalışma standart çözeltileri, 4 °C' de saklanır ve stabilitesini 1 ay,-20°C'de 3 ay koruyabilirler.

b. S_1 Stok Standart Çözeltisi Hazırlanması(10mg/L=10 ppm):

Her bir S_1 stok standart çözeltisi için S_0 stok standart çözeltisinden 100 µL alınarak ACN/H₂O (50/50) ile 10 ml'ye tamamlanır (10 µg / mL = 10 ppm).

c. S_2 Stok Standart Çözeltisinin Hazırlanması(100 µg/L = 100 ppb):

Her bir S_2 stok standart çözeltisi için, S_1 stok standart çözeltisinden 100µL ACN/H₂O (50/50) ile 10 mL'ye tamamlanır (100 µg / L = 100 ppb).

d. Çalışma Standart Çözeltilerin Hazırlanması: Numunelere yükleme yapılan miktar

kadar standart temiz tüplere aktarılır ve üzerileri ekstraksiyon sonrası kullanılan çözücü (final çözeltisi) ile miktarına tamamlanır. Çalışma standartları mutlaka final çözeltisi ile hazırlanmalıdır.

Tablo1: Süt İçin Spike;

Adı	S ₀ 'dan(mg/mL) alınacak miktar (µL)	S ₁ Toplam Hacim 50 (mL)	0.5 MKL	1 MKL	1.5 MKL	2 MKL	MKL µg/kg
FLU-OH	50	1 ng/µL	100µL	200 µL	300 µL	400 µL	40
FLU	50	1 ng/µL					-
ASA	50	1 ng/µL					0
PBZ	50	1 ng/µL					0
TOL	50	1 ng/µL					50
DİK	50	1 ng/µL					-
MEL	50	1 ng/µL					15

7.3. Numunenin Analizi

1. Oda ısısına getirilen ve homojenizesi sağlanan süt numunesinden 5 mL, otomatik pipetle, 50 mL'lik polipropilen santrifüj tüpüne aktarılır.
2. Kalite kontrol amacıyla ayrılan numunelere eksternal standartlardan sırasıyla; 100 µL, 200 µL, 300 µL ve 400 µL ilave edilir.
3. 15 dakika oda ısısında, multireaksta çalkalanır.
4. 100 µL %25'lik fosforik asit ilave edilir.
5. 10 mL asetronitril (ACN) ilave edilir, 15 dakika multireaksta çalkalanır.
6. 5g NaCl'den eklenir ve 5 dakika multireaksta çalkalanır.
7. Numuneler, 4000 g'de -4°C'de 15 dakika santrifüj edilir.
8. Üst faz 5 mL, 15 mL lik plastik tüplere aktarılır.
9. Tüpler 40 °C'de, N₂ gazı altında numune yoğunlaştırıcıda uçurulur.
10. Kurutulan tüplere 500 µL final çözdürücü çözeltisi (Mobil faz) ilave edilir.
11. Numune tüpleri 15 dakika oda ısısında, multireaksta çalkalanarak, çözdürülür.
12. 0,45 µm filtreden geçirilerek viallere aktarılır.

7.4. LC-MS/MS ile ANALİZİ

□ HPLC Parametreleri:

Surveyor autosampler metot

Enjeksiyon hacmi :25 µL,

İğnenin dipten yüksekliği :1,8 mm.

Şırınga hızı :8 µL/s

Akış hacmi:	:1000 µl
Akış/yıkama kaynağı	:20/80 (v/v) methanol/su.
Yıkama hacmi	:0 µl
Yıkama hızı	:250 µl/s
Enjeksiyon sonrası valf değişim süresi:	0.0 min
Loop yükleme hızı	:5 µl/s
Enjeksiyon modu	:Kısmi valf
Autosampler ısı kontrol	:10 °C
Kolon ısı kontrol	:40 °C
Kolon	:Agilent Extend C18, 150 x2.00 mm, 5 µ

LC - Pompa

Mobile faz A: MeCN

Mobile faz B: Su (Formik asit%0,2)

Gradient Program:

Sıra No	Dakika	Akış hızı (mL/dak.)	Mobil faz A	Mobil faz B
1	0	0.3	0	100
2	2	0.3	0	100
3	2,1	0,3	100	0
4	5	0,3	100	0
5	5,1	0,3	0	100
6	15	0,3	0	100

MS/MS Parametreleri:

MS Dedektör : Thermo Finnigan Surveyor TSQ

İyonizasyon Metodu : ESI (negatif)

Azot Gaz Basıncı : 30 psi

Probe Sıcaklığı : 350 °C

İyon Dedeksiyon Modu : SIM

Taranacak İyon Değerleri :

Analit	Ana İyon	1.Ürün	2.Ürün	Collision energy	Polarty
Asetilsalisilik Asit	137	93	65	15/30	-
Flunixin-OH	311	267	227	18/27	-
Fenilbutazon	307	279	131	20/25	-
Diklofenak	294	250	214	12/20	-
4-MAA	218	159	97	15/15	+
Tolfenamik Asit	260	216	214	16/22	-
Meloksikam	350	286	146	14/20	-

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması:

Sorumlu pik alanları kullanılarak matriks kalibrasyon eğrisinin lineer regresyonu elde edilir. Elde edilen bu değerle her bir analittteki varolabilecek miktarlar hesaplanabilir.

$$x = (y-a) / b$$

$$b = (nSx_1y_1 - Sx_1Sy_1) / \sqrt{\{nSx_1^2 - (Sx_1)^2\}}$$

$$a = (Sy_1 - b Sx_1) / n$$

x: Örnekteki analite konsantrasyonu (mg l⁻¹)

x_i: i.nci standartın analit konsantrasyonu (mg l⁻¹)

a: Kalibrasyon eğrisinin intercepti

b: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

y: Örnekteki analit pikinin alanı

y_i: 1.nci analit pik alanı

n: Her bir konsantrasyon aralığındaki analiz sayısı

Pozitif sonuçlar için hesaplama kontrol numunelerinin analizi ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi (y=ax±b) kullanılarak hesaplanır. (y:Piklerin alanı, x:Konsantrasyon, a ve b: Doğrudan bulunan sabit sayılar). Tespit edilen miktar(µg/kg) : x = (y ± b)/a

Bu metotta 93/256/EC direktifine göre validasyon yapılır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

- Bull Vet Inst Pulawy 53, 731-739, 2009
- J Chromatogr A. 2009 Nov 13;1216(46):8132-40. E pub 2009 May 4.
- United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science
- Journal of Chromatography A 1118 (2006) 226 – 233
- Norwegian School of Veterinary Science, Section for Food Safety, P.O. Box 8146-Dep. 0033 Oslo, Norway Received 25 November 2005; received in revised form 21 March 2006; accepted 28 March 2006

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan revizyonlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALDA FUMAGİLLİN İLAÇ KALINTILARININ HPLC-DAD/MS İLE ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu metot balda fumagillin kalıntılarının HPLC-DAD/MS sistemi ile tespit edilmesi ve miktar tayini amacı ile kullanılır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot HPLC detektör kullanılarak balda Fumagillin ilaç kalıntılarının tespit edilmesi için geliştirilmiştir. Fumagillin, *A. fumigatus* kültürlerinden elde edilir. Suda çözünmeyen sarı renkte tozdur. İlaç, daha çok arılardaki nosema hastalığının sağaltımında kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Standartlar numune hazırlanan ortamda hazırlanmamalıdır.
3. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
4. Analizden önce analitlerin tespit limitleri (MRL / MRPL) düzeyinde standart karışımı enjeksiyonu yapılarak sistemin performansı kontrol edilir. Analize başlayabilmek için alıkonma zamanındaki sapmanın $\pm 5\%$ 'ten az ve piklerin alanlarındaki farkın $\pm 10\%$ 'dan az olması gerekir.
5. Kullanılan LC kolonu her seri analizden sonra temizlenip uygun çözücü sisteminde saklanmalıdır.
6. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol test grafiği hazırlanır. Bu uygulama ilgili laboratuvarın kalite kontrol prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.
7. Standartın hazırlanması, numunenin hazırlanması ve analiz aşamalarının tamamında karanlık ortamda çalışılmalıdır.
8. Analizi yapılacak bal numunesinden 10 g. kadar numune saklama kabına aktarılır, bu numune örnekleri analiz edilene kadar oda sıcaklığında karanlık ortamda saklanmalıdır.
9. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Matriks Kalibrasyon Numunesi: Standart ile güçlendirilmiş numune örneği.

IS	: Internal Standart
ES	: Eksternal Standart
HPLC	: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi
DAD	: Diode Array Dedektör
MS	: Kütle Spektrometre
CC _a	: Karar limiti
CC _b	: Tespit Limiti
DİS	: Deiyonize Su
N ₂	: Azot
S ₀	: Stok Standart
P.P	: Polipropilen Santrifüj Tüpü
MeCN	: Asetonitril
MRL	: Kabul edilebilir kalıntı limiti
MRPL	: Kabul Edilebilir Performans Limiti

Alıkonma Zamanı (R_ç): Bir türün kolona enjekte edilmesinden, detektördeki pik noktasına kadar geçen süredir.

Final çözeltisi: Numunenin hazırlanmasında son aşamada analitin çözülmesinde kullanılan çözelti

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

- Analitin asetonitril ile baldan ayrıştırılması,
- SPE ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
- HPLC-DAD/MS ile ölçümü

7. TEST METODUNUN TANIMI:

7.1 Kullanılan ekipmanlar

1. Thermo Finnigan HPLC/DAD sistem
2. Ayarlanabilir Pipetler
3. Teraziler
4. Soğutmalı Santrifüj
5. Vortex

6. Multireaks
7. Ultrasonik Banyo
8. 10,500,1000 ml lik balon joje,
9. 500'lük Mezür
10. Tek kullanımlık 50 ml P.P.Santrifuj Tüpü
11. Tek kullanımlık 15 ml P.P tüp
12. Tek kullanımlık 2 ml şırınga
13. Tek kullanımlık 0,44 µm şırınga filter
14. 1.8 ml autosampler vial
15. 100.300.1000 ve 5000 µl'lik Eppendorf marka ayarlı otomatik pipet ve uçları,
16. İnkübatör çalkalayıcı
17. Blender (Parçalayıcı)
18. Enjektör ucu filtre: 4mm syring filter 0.45 µm
19. Phenomenex 100g Strata-X polimerix kartuş.

7.2. Kullanılan kimyasallar

1. Deiyonize su
2. Asetonitril, (HPLC grade)
3. Metanol, (HPLC grade)
4. Formik asit
5. Fumagilline bicyclohexylamine
6. Çözeltiler;
 1. Final Çözücü Çözeltisi: 100 ml'lik mezür içerisine sırasıyla 45 ml DİS, 55 ml asetonitril ve 100ul (%0,1) formik asit ilave edilir. Ultrasonik banyoda yeteri süre bekletilerek hazırlanır. Etiket yazılarak temiz bir şişeye aktarılır.
 2. Mobil Faz A: Asetonitril içinde %0,1 Formik asit : 1000 ml'lik balon joje içerisinde 1 ml formik asit ilave edilir ve ACN ile 1000 ml'ye tamamlanır. Ultrasonik banyoda yeterli sürede bekletilerek hazırlanır.
 3. Mobil Faz B: DİS içinde %0,1 Formik asit Çözeltisi: 1000 ml'lik balon joje içerisinde 1 ml Formik asit ilave edilir ve DİS ile 1000 ml'ye tamamlanır. Ultrasonik banyoda yeterli sürede bekletilerek hazırlanır.
 4. Kartuş Yıkama Çözeltisi: 100 ml'lik mezür içerisine sırasıyla 65 ml DİS ve 35 ml ACN ilave edilir. (%0.1) 100 µl formik asit katılır. Ultrasonik banyoda yeteri süre bekletilerek hazırlanır.

Etiketi yazılarak temiz bir şişeye aktarılır.

5. Ekstraksiyon Çözeltisi: 500 ml'lik mezür içerisine sırasıyla 375 ml DİS ve 125 ml asetonitril konulur. (%0.1) 500 ml formik asit ilave edilir. Ultrasonik banyoda yeteri süre bekletilerek hazırlanır. Etiketi yazılarak temiz bir şişeye aktarılır.
6. Stok Standart Hazırlama Çözeltisi: (1 / 9) oranlarında metanol / asetonitril karışımı ile hazırlanır. Ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir.

7. Standart Çözeltiler;

1. – **S₀ Stok Çözeltisi Hazırlanması(1mg/ml):** % 60'lık fumagilin-bisikloheksilamin'den 15,88 mg tartılarak 10 ml'lik balon jöjeye aktarılır ve 1:9 asetonitril:metanol (v/v) karışımı ile 10 ml'ye tamamlanır. (1000 µg / ml) karanlık ortamda -20 °C 'de ağzı kapalı cam tüplerde 6 ay süreyle saklanır.
2. – **S₁ Stok Çözeltisi Hazırlanması(10 µg/ml):** S₀ Stok standart çözeltisinden 100 µl alınarak metanol ile 10 ml'ye tamamlanır. (10 µg / ml) +4 °C 'de ve karanlık ortamda 1 ay tazeliğini korur.
3. – **S₂ Spike Standart Çözeltisinin Hazırlanması(0,2 µg/ml):** S₁ Stok standart çözeltisinden 400µl alınarak metanol ile 20 ml'ye tamamlanır. (200 ng / ml) +4 °C 'de ve karanlık ortamda 1 ay tazeliğini korur.
4. – **Ç₁ Çalışma Standart Çözeltilerin Hazırlanması(10ng/ml):** S₁ Stok standart çözeltisinden 100µl alınarak 50/50 DİS/MeCN/%0.1 formik asit(final çözeltisi) ile 10 ml'ye tamamlanır. (10 ng / ml) hazırlanır. Taze olarak hazırlanır.
5. – **Ç₂ Çalışma Standart Çözeltilerin Hazırlanması(15ng/ml):** S₁ Stok standart çözeltisinden 150µl alınarak 50/50 DİS/MeCN/%0.1 formik asit(final çözeltisi) ile 10 ml'ye tamamlanır. (15 ng / ml) hazırlanır. Taze olarak hazırlanır.
6. – **Ç₃ Çalışma Standart Çözeltilerin Hazırlanması(15ng/ml):** S₁ Stok standart çözeltisinden 200µl alınarak 50/50 DİS/MeCN/%0.1 formik asit(final çözeltisi) ile 10 ml'ye tamamlanır. (20 ng / ml) hazırlanır. Taze olarak hazırlanır.
7. – **Ç₄ Çalışma Standart Çözeltilerin Hazırlanması(15ng/ml):** S₁ Stok standart çözeltisinden 250µl alınarak 50/50 DİS/MeCN/%0.1 formik asit(Final çözeltisi) ile 10 ml'ye tamamlanır. (25 ng / ml) hazırlanır. Taze olarak hazırlanır.

7.3. Numunenin Analizi

1. 1 gr bal numunesi 50 ml'lik P.P. santrifüj tüpüne tartılır.
2. Eksternal Standart (Fumagilin); 200 ppb=0,2 ppm (ng/µl)'den sırasıyla; 0µl 50µl 100µl 150µl 200µl ilave edilir.
3. 15 dakika oda ısısında bekletilir.
4. 8 ml ekstraksiyon çözeltisi ilave edilir.(7.2.6.5) (Sayfa başındaki 5. maddedeki ekstraksiyon çözeltisini ifade eder).

5. 5 dakika multireaksta çalkalanır.
6. 100 mg. Strata X kartuş, sırasıyla; 2 ml metanol ve 2 ml su geçirilerek şartlandırılır.
7. Tüpdeki karışım şartlandırılmış kartuşden geçirilir.
8. Tüpler 4 ml kartuş yıkama çözeltisi ile çalkalanarak kartuşden geçirilir.(7.2.6.4) (Kartuş yıkama çözeltisidir).
9. 4 ml asetonitrile ile elüt edilir.
10. Tüpler 60 °C'de Azot N₂ gazı altında uçurulur.
11. Kurutulan tüplere 1000 µl (**Final çözeltisi**) ilave edilir.(7.2.6.1) (Final çözücü çökeltisidir).
12. 10 dakika vorteks uygulanarak çözülür.
13. 0,45 µm filtreden geçirilerek viallere aktarılır.

7.4. Cihaz Parametreleri

1. HPLC – DAD/MS Şartları

Surveyor Autosampler (AS)

Needle height from bottom	: 2.0 mm.
Injection volume and mode	: 50 µl,
Post-injection valve switch time	: 0.0 min
Loop loading speed	: 5 µl/s
Syringe speed	: 8 µl/s
Flush/Wash source	: 20/80 (v/v) methanol/su.
Flush/Wash volume	: 1500 µl
Flush speed	: 250 µl/s
Tray temperature control	: 10 °C
Column Oven Control	: 40 °C

2. HPLC-DAD dedektör

Dalga Boyu: 351 l

3. Surveyor LC pump

Column	: Phenomenex Synergy, 4 µ, Fusion-RP 150 x 2,0 mm
Mobile faz A	: Asetonitril içinde %0,1 Formik Asit
Mobile faz B	: DİS içinde %0,1 Formik Asit
Analiz süresi	: 13dakika izokratik
Akış hızı	: 0,3 ml/dk

Akış Programı:

Sıra No	Zaman (dk)	Akış Hızı (ml/dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
01	0	0,3	55	45
02	13	0,3	55	45

4. LC-MS Şartları

MS dedektör: Thermo Finnigan LC-MSQ

Bilgi işlem: Xcalibur 1.4 Software ile DELL

İyonizasyon metodu: ESI +

İsim	İyon	Cone voltaj	Cone Temp
Fumagillin	459,4	75	400 C

Kolon: phenomenex Synergi 4u Fusion – RP 80A 150x2.0mm 4micron S/N:341431-11

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması:

Sorumlu pik alanları kullanılarak matriks kalibrasyon eğrisinin lineer regresyonu elde edilir. Elde edilen bu değerle her bir analittteki varolabilecek miktarlar hesaplanabilir.

$$x = (y-a) / b$$

$$b = (n\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i) / \sqrt{\{n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2\}}$$

$$a = (\sum y_i - b \sum x_i) / n$$

x: Örnekteki analite konsantrasyonu (mg l⁻¹)x_i: i.nci standartın analit konsantrasyonu (mg l⁻¹)

a: Kalibrasyon eğrisinin intercepti

b: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

y: Örnekteki analit pikinin alanı

y_i: 1.nci analit pik alanı

n: Her bir konsantrasyon aralığındaki analiz sayısı

Pozitif sonuçlar için hesaplama kontrol numunelerinin analizi ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi (y = ax + b) kullanılarak hesaplanır. (y: Piklerin alanı, x:Konsantrasyon, a ve b: Doğrudan bulunan sabit sayılar).

$$\text{Tespit edilen miktar}(\mu\text{g/kg}) : x = (y + b) / a$$

93/256/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

- a. Guyonnet J., Richard M. Helling Ph. Determination of fumagillin in muscle tissue of rainbow trout using automated ion-pairing liquid chromatography. Journal of Chromatography B. 1995. 666, 354-359.
- b. Guyonnet J. Assay Method of Fumagillin in Honey by High Performance Liquid Chromatography. Sanofi Sante Nutrition Animale, 1997. Study Number: 9213. France

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan revizyonlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALIKTA AVERMEKTİN GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ

1 AMAÇ

Bu test prosedürü, balık numunelerinde Avermektin grubu (ivermektin, emamektin) ilaç kalıntılarının tespiti ve miktar tayini amacıyla kullanılır.

2 UYGULAMA ALANI

Bu metot, balık numunelerinde Avermektin grubu ilaç kalıntılarının ekstraksiyonu ve LC-MS/MS ile doğrulama metodunu içerir.

Avermektinler: İvermektin, Emamektin, Moksidektin (IS).

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Standartlar, numune hazırlanan ortamda hazırlanmamalıdır.
3. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
4. Analizden önce analitlerin tespit limitleri (MKL varsa MKL düzeyinde) düzeyinde standart karışımı enjeksiyonu yapılarak sistemin performansı kontrol edilir. Analize başlayabilmek için alıkonma zamanındaki sapmanın $\pm\%5$ 'ten az ve piklerin alanlarındaki farkın $\pm\%10$ 'dan az olması gerekir.
5. Kullanılan LC kolonu her seri analizden sonra temizlenip uygun çözücü sisteminde saklanmalıdır.
6. Her seri analizden sonra cihazın tampon çözelti geçen hattı su geçirilerek temizlenmeli, MS sisteminin "cone" kısmı su püskürtülerek ya da çok kirli ise yerinden çıkarılıp yıkanarak temizlenmelidir.
7. Numuneler, analizi yapılana kadar derin dondurucuda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif olanlar imha edilir, pozitif olanlar ise derin dondurucuda bir yıl saklanır.

8. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol test grafiği hazırlanır. Kalite Kontrol Test Grafiğinin Hazırlanması ve Kullanılması (P.19) Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.
9. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR / TANIMLAR

- 1 CC_a : Karar limiti
- 2 CC_b : Tespit Limiti
- 3 Kontrol Numunesi: Standart ile güçlendirilmiş örnek.
- 4 LC: Likit Kromatografi
- 5 LC-MS/MS: Likit Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi
- 6 APCI: Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonizasyon
- 7 DİS: Deiyonize su
- 8 MRPL: Minimum Gerekli Performans Limit
- 9 MRL: Maksimum Kalıntı Limiti
- 10 MeCN: Asetonitril
- 11 MeOH: Metanol
- 12 İS: İnternal Standart
- 13 N_2 : Azot
- 14 S_0 : Stok Standart
- 15 P.P: Polipropilen Santrifüj Tüp

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

- Likit-likit ekstraksiyon yapılması
- LC-MS/MS ile doğrulama analizi

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. KULLANILAN EKİPMANLAR

1. 15 mL'lik PP santrifüj tüpü
2. 50 mL'lik PP santrifüj tüpü
3. Enjektör 2 mL

4. Enjektör filtresi (0,45 µm)
5. 1,8 mL vial ve 500 µL insert vial
6. 1000 mL'lik balon joje
7. 10 mL'lik balonjoje
8. 250 mL'lik mezür
9. Hassas terazi
10. Multireaks
11. Soğutmalı santrifüj
12. Numune yoğunlaştırıcı
13. Ultrasonik banyo
14. Otomatik pipetler (100, 200, 1000, 5000 µL)
15. Thermo Finnigan TSQ Quantum
 - Surveyor AS
 - Sureveyor LC pompa
 - TSQ Quantum
 - Yazılım ve ürün bilgisi
 - Xcalibur 1.4 SP1 for Surveyor AS and LC pump
 - Xcalibur 1.4 for TSQ Quantum
 - The firmware 1.4 for Surveyor AS

7.2. KULLANILAN KİMYASALLAR

1. İvermektin
2. Moksidektin
3. Emamektin
4. Asetonitril
5. Trietilamin
6. n-hekzan
7. Sodyum klorür
8. Deiyonize su
9. **Kullanılan Çözeltiler**

1. %0.1'lik TEA Çözeltisi

1000 mL TEA alınarak Deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

2. Stok Standart ve Çalışma Çözeltilerin Hazırlanması

Avermektin-S₀ Stok çözeltisi:

Her bir standart madde 10 mg±0.05 tartılarak 10 mL'lik cam balona alınır. 10 mL Asetonitril eklenir. Çözününceye kadar ultrasonik banyo ve vortekste bırakılır. Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu 1 mg/mL'dir.

Avermektin S₁ çalışma çözeltisi,

S₁ 100 µg/mL için, avermektin-S₀ stok solusyonundan 1 mL±0.01 mL alınarak 10 mL'lik cam balon alınır. Asetonitril ile 10 mL'e tamamlanır. Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu 100 µg/mL'dir.

Avermektin S₂ çalışma çözeltisi,

Avermektin-S₁ solusyonundan 1 mL±0.01 mL alınarak 10 mL'lik cam balon alınır. Asetonitril ile 10 mL'e tamamlanır. Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu 10 µg/mL'dir.

Balık Numuneleri İçin Spike Çözeltisinin Hazırlanması:

Balık spike çözeltisi, Tablo 2'de belirtildiği gibi emamektin 2,5 ng/µL ve ivermektin 0,5 ng/µL içerek şekilde 100 mL olarak hazırlanır. Bu amaçla, emamektin S₁ çalışma çözeltisinden 2,5 mL ve ivermektin S₁ çalışma çözeltisinden 0,5 mL alınarak metanol ile 100 mL'e tamamlanır.

İnternal Standart Çözeltisinin Hazırlanması:

İnternal standart olarak, eprinomektin kullanılır. İnternal standart çözeltisi de 3 ng/µL olacak şekilde hazırlanır. Bu amaçla, eprinomektin S₁ çalışma çözeltisinden 3 mL alınarak 100 mL'e tamamlanır.

7.3. NUMUNENİN HAZIRLANMASI

1. Homojen hale getirilen süt / balık numunesinden 5 ml / 5 g alınır ve 50 mL'lik santrifüj tüpüne koyulur.
2. Spike amacıyla Tablo 1 ve 2'de belirtilen şekilde yüklemeler yapılır ve 15 dakika çalkalayıcıda 150 rpm de bekletilir.
3. 15 ml asetonitril ilave edilir.
4. 15 dakika Multireaks ile homojen oluncaya kadar karıştırılır.
5. 5 gr Na₂SO₄ sodyum sülfat anhidrose eklendi ve karıştırılır.
6. 15 dakika 3500 g de +4 °C'de santrifüj edilir.
7. Üst faz dan 10 ml alınarak 50'lik P.P tüpe aktarılır.
8. 40 °C'de N₂ gazı altında uçurulur.
9. Kurutulan tüplere 500 µl (Final çözeltisi) ilave edilir.
10. 500 µl mobil fazda çözdürülür, enjektör filtrelerden geçirilerek insört viallere aktarılır.

Tablo 1: Balık numunelerinde uygulanacak yüklemeler

Analit	Alınacak miktar (mL)	Analit konsantrasyonu {100 (mL)}	0.5 MRL/ 1 MGPL	1 MRL/ 2MGPL	1.5 MRL/ 3 MGPL	MRL $\mu\text{g}/\text{kg}$
Emamektin	0,250 (S ₀)	2.5 ng / μL	100 μL	200 μL	300 μL	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
İvermektin	0,5 (S ₂)	0,5 ng/ μL				0 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Eprinomektin (İnternal Standart) (5 ng/ μL)			100 μL			

7.4. Cihaz Parametreleri

TSQ QUANTUM EKİPMAN (Thermo Finnigan)

1. Surveyor Autosampler (AS)

Enjeksiyon hacmi	:25 μL ,
İğnenin dipten yüksekliği	:1,8 mm.
Şırınga hızı	:8 $\mu\text{L}/\text{s}$
Akış hacmi:	:1000 μL
Akış/yıkama kaynağı	:20/80 (v/v) metanol/su.
Yıkama hacmi	:0 μL
Yıkama hızı	:250 $\mu\text{L}/\text{s}$
Enjeksiyon sonrası valf değişim süresi	:0.0 min
Loop yükleme hızı	:5 $\mu\text{L}/\text{s}$
Enjeksiyon modu	:Kısmi valf
Autosampler ısı kontrol	:10 °C
Kolon ısı kontrol	:40 °C

Surveyor LC pump

Mobile faz A	:Asetonitril (%90)
Mobile faz B	: Trietilamin (%0.1)(%10)
Analiz süresi	: 10 dakika
Akış hızı	: 0.3 mL/dak.
Kolon	: Zorbax Extend C18, 150 x 2.00 mm

2. Thermo Finnigan TSQ

Cihaz	: TSQ Termo Finnigan
İyon Source	: ESI
Source Sıcaklığı	: 400 °C

Tarama şekli	: SRM
Auxe gaz	: 10
Spray gaz	: 60
Argon gaz	: 1

Analit	MW	1.Ürün	2.Ürün	Collision energy	Polarty
İvermektin	873.50	567.30	228.70	26/30	-
Moksidektin	638,5	529	236	20/30	-
Emamektin	884.50	565.40	241.90	26/30	-

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi Ve Hesaplanması

Sorumlu pik alanları kullanılarak matriks kalibrasyon eğrisinin lineer regresyonu elde edilir. Elde edilen bu değerle her bir analittteki varolabilecek miktarlar hesaplanabilir.

$$x = (y-a) / b$$

$$b = \frac{(nSx_i y_i - Sx_i S y_i)}{\sqrt{\{nSx_i^2 - (Sx_i)^2\}}}$$

$$a = (S y_i - b S x_i) / n$$

x: Örnekteki analite konsantrasyonu (mg l⁻¹)

x_i: i.nci standartın analit konsantrasyonu (g l⁻¹)

a: Kalibrasyon eğrisinin intercepti

b: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

y: Örnekteki analit pikinin alanı

y_i: 1.nci analit pik alanı

n: her bir konsantrasyon aralığındaki analiz sayısı

Pozitif sonuçlar için hesaplama kontrol numunelerinin analizi ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi ($y = ax \pm b$) kullanılarak hesaplanır. (y: Piklerin alanı, x:Konsantrasyon, a ve b: Doğrudan bulunan sabit sayılar).

Tespit edilen miktar (mg/kg) : $x = (y \pm b) / a$

Validasyon dataları, 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Durden D. A. (2007). Positive and negative electrosprey LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. Journal Chromatography B. Analyte Technocol. Biomed. Life Sci. 850(1-2), 134-46.

9. REVİZYON

Bu analiz metodu ile ilgili yapılan revizyonlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

DOKULARDA BENZİMİDAZOL GRUBU İLAÇLARIN VE LEVAMİZOL KALINTILARININ LC- MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu dokularda levamizol ve benzimidazol grubu antihelmintiklerin ve metabolitlerinin LC MS MS kütle spektrometresiyle analiz edilmesini amaçlar

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, dokularda levamizol ve benzimidazol grubu ve metabolitlerinin (albendazole, albendazole sulfon, albendazole sulfoxide, albendazole-2-aminosulfon, fenbendazole sulfon, flubendazole, ketotriklabendazole, levamisol, thiabendazole, thiabendazole 5-OH, triklabendazole) ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
3. Her analizden önce cihaza 100 ng/ml'lik standart enjeksiyon yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilir.
4. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanmalı, grafiğinin hazırlanması ve kullanılması, (P.19) Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmelidir.
5. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR / TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS: Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

- ES: Eksternal standart
PP: Polipropilen
LOD: Tayin limiti (Limit of detection)
LOQ: Ölçüm limiti (Limit of quantitation)
CC α : Karar limiti
CC β : Tespit Limiti
CV: Tekraredilebilirlik (Repeatability)
MW: Molekül ağırlığı
S1 Benzimidazol standart karışımı
R1 Benzimidazol intorıl standart karışımı

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu analiz metodu dokularda Levamizol ve Benzimidazol gurubu antihelmintiklerin ve metabolitlerinin LC-MS MS kütle spektrometresiyle analiz edilmesini sağlayan hasas bir metotur. Analiz metodu benzimidazol gurubu ve levamizol gurubu etken maddelerinin ve metabolitlerinin pek çoğunun bir arada bakılmasını sağlayan bir metotur. Bu metotla analizler iki aşamada gerçekleştirilir;

1. Dokunun analize hazırlanması
2. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI:

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. PP Santrifüj tüpü 15 mL'lik
2. Enjektör 5 mL'lik
3. Filtre 0.45 μ m
4. Ependrof tüpü
5. Pipet ucu (200 , 1000 ve 5000 μ L'lik)
6. Ayarlanabilir pipet 20–200 μ L (Ependrof GB-10433-5)
7. Ayarlanabilir pipet 100–1000 μ L (Ependrof, GB-10433-3)
8. Ayarlanabilir pipet 500–5000 μ L (Ependrof, GB–10564–1)
9. Hassas terazi (GB 10288)
10. Multireaks vorteks (253030604010507000009)
11. Soğutmalı santrifüj (GB 9969 ve GB 10439)
12. Benzimidazol Gurubu HPLC Kolonu 75x4,6 mm 5 μ

13. Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS

14. Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1)

7.2. Kullanılan Kimyasallar

1. Standart karışımı (S1) ve iç standart karışımı (R1):

Levamisol ve Benzimidazole standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları (ST)

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
Albendazole	265	4000
Albendazole Sulfon	297	4000
Albendazole Sulfoxide	281	4000
Albendazole-2-aminosulfon	239	4000
Fenbendazole Sulfon	331	400
Flubendazole	313	2000
Ketotriklabendazole	329	4000
Levamisol	204	400
Thiabendazole	201	4000
Thiabendazole 5-OH	217	4000
Triklabendazole	359	4000

İnternal Standart ve konsantrasyonları (R1)

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
Albendazole Sulfon-d3	300	4000
Albendazole Sulfoxide-d3	284	4000
Fenbendazole Sulfon-d3	334	400
Flubendazole-d3	316	2000
Thiabendazole-13C6	207	4000

ST Standart karışımı ve R1 iç standart: Derin dondurucuda (-20 °C) saklanmalıdır. Diğer reaktifler oda sıcaklığında saklanmalıdır.

2. Asetik Asit Merck

3. Asetik Asit (%1) :100 ml Bir şişeye pipetle 1 ml asetik asit alınır. Üzerine Mezür Yardımıyla 99 ml deiyonize su ilave edilir

4. Etil Asetat

5. Metanol
6. Deiyonize Su
7. Metanol (%20): 1 Litrel lik mezürle 200 ml metanol ölçülür, üzeri deiyonize su bir litreye tamamlanır.
8. Mobil Faz A: Metanol/Su (%30)/ (%70)
9. Mobil Faz B: Metanol

7.3. Numunenin Analiz,

- 4.0 gr kıyma haline getirilmiş doku numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
 - 100 µl İnternal standart ilave edilir. 15 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
 - 200 µl %1 Asetik Asit ilave edilir. 15 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
- 10 mL Etil Asetat ilave edilir. 3 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
- 4000 x g 'de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda, üstteki berrak çözeltiden pipet ile 7 ml (2x3,5 ml) alınıp 15 ml'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında 42°C sıcaklıkta ve 10.0 psi basınçta sarı yağimsı kalıntı oluşana kadar kurutulur.
 - Kurutma işleminden sonra tüpe 1,0 ml Metanol ilave edilir. Vorteksle 15 saniye karıştırılır. Ultrasonik banyoda 5 dk bekletilir.
 - Ultrasonik banyodan sonra tekrar vortekslenir. Tüpün içindeki sıvının tamamı enjektör ile alınır. 0.45 mm filtreden eppendorf tüp içine süzülür.
 - Süzülen kısımdan 500 µL vial e alınır. Üzerine 500 µL Metanol (%20) ilave edilerek vortekslenir. LC-MS/MS sistemine 20 µL enjeksiyon yapılır.

Matris Standardının Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyonu

3 adet 4.0 mL blank Doku numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.

Üzerine aşağıdaki tabloya uygun Standart konsantrasyonundan ilave edilir.

Doku numunesindeki Konsantrasyon	50 µg/kg	100µg/kg	150 µg/kg
Eklenecek Standart Hacmi	50 µl	100 µl	150 µl

7.4. LC-MS-MS ile Analiz

□ HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	80	20	0.3
00:12	20	80	0.3
03:00	20	80	0.3
03:06	0	100	0,4
05:00	0	100	0,4
05:06	80	20	0,4
08.00	80	20	0.4
08:01	80	20	0,3

Kolon: Benzimidazol Gurubu HPLC Kolonu 75x4,6 mm 5 μ

Akış hızı: 0.50 mL/dakika Enjeksiyon hacmi: 20 μ L

Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 10 :90 metanol: su karışımı (h/h)

□ MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +	
API Nebulizing gas pressure	55 psi	
Drying gas temperature	400 °C	
Drying gas pressure	35 psi	
Scan Time	0.69 sec	
SIM Width	2.0 amu	
Needle	+ 5000V	
Shield	+ 500V	
Capillary	70V	
Detector	+ 1600 V	
CID Gas Pressure	2.00 mTorr	
Spray Chamber T	65°C	
Mass peak width in amu	Q1=1.5	Q3=1.5

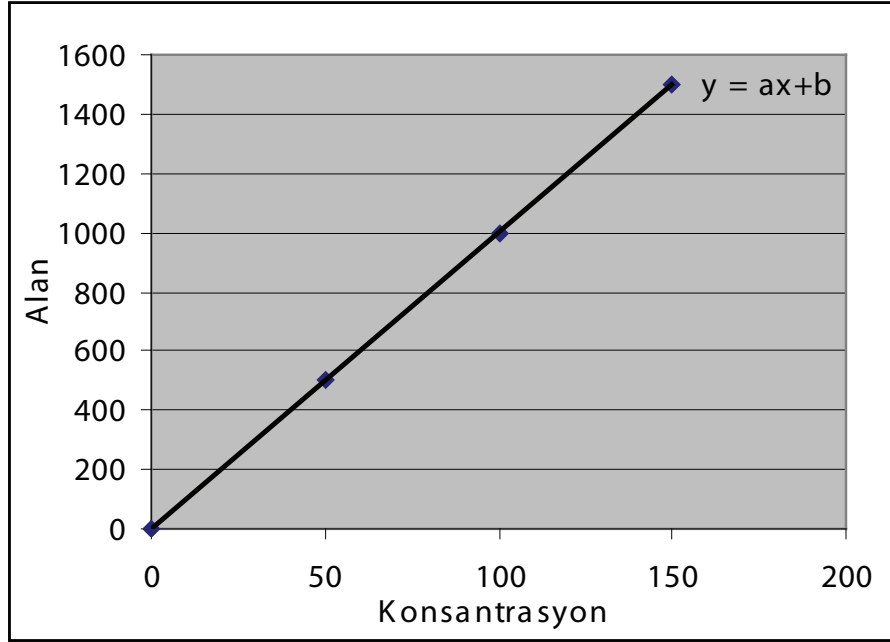
□ MS-MS tarama parametreleri

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
Albendazole	266	234	70 V	20	0,027
Albendazole Sulfon	298	266	70 V	18	0,027
Albendazole Sulfon-d3	301	266	70 V	18	0,027
Albendazole Sulfoxide	282	240	70 V	12	0,027
Albendazole Sulfoxide-d3	285	243	70 V	12	0,027
Albendazole-2-aminosulfon	240	133	70 V	25	0,027
Fenbendazole Sulfon	332	300	70 V	20	0,027
Fenbendazole Sulfon-d3	330	300	70 V	20	0,027
Flubendazole	314	282	70 V	20	0,027
Flubendazole-d3	317	282	70 V	20	0,027
Levamisol	205	178	70 V	20	0,046
Thiabendazole	202	175	70 V	25	0,027
Thiabendazole-13C6	208	181	70 V	25	0,027
Thiabendazole 5-OH	218	191	70 V	25	0,027
Ketotriklabendazole	328,5	181,3	-70V	25	0,200
Triklabendazole	358,5	196,5	-70V	35	0,100

7.5. Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

1. Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analizi edilir. Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamadı.” şeklinde raporlanır.
2. Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu pozitif olarak değerlendirilir ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır.
3. Sonuçlar cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Piklerin alanı konsantrasyona karşılık grafiğe geçirilir.



4. Numune analizi sonucunda numunede tespit edilen pikin alanı (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

- Official Journal of the European Communities 2002/657/EC Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results ,12 August 2002 implementing.

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan revizyonlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KAS DOKUDA ANTİKOKSİDİAL GRUBU İLAÇLARIN LC-MS/MS İLE ANALİZ METODU

1 AMAÇ

Kas dokusunda antikoksidial (lasolasid, maduramisın, monensin, narasin, salinomisin ve nikarbazin) ilaçların LC-MS/MS sistemi ile analizlerinin yapılması.

2 UYGULAMA ALANI

Antikoksidial (lasolasid, maduramisın, monensin, narasin, salinomisin ve nikarbazin) ilaçların yemde ekstraksiyon yöntemini ve LC-MS/MS sistemi ile analizi metodunu içerir.

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Standartlar numune hazırlanan ortamda hazırlanmamalıdır.
3. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
4. Analizden önce analitlerin tespit limitleri (MRL varsa MRL düzeyinde) düzeyinde standart karışımı enjeksiyonu yapılarak sistemin performansı kontrol edilir. Analize başlayabilmek için alıkonma zamanındaki sapmanın $\pm\%5$ 'ten az ve piklerin alanlarındaki farkın $\pm\%10$ 'dan az olması gerekir.
5. Kullanılan LC kolonu her seri analizden sonra temizlenip uygun çözücü sisteminde saklanmalıdır.
6. Her seri analizden sonra cihazın tampon çözelti geçen hattı su geçirilerek temizlenmeli, MS sisteminin "cone" kısmı su püskürtülerek ya da çok kirli ise yerinden çıkarılıp yıkanarak temizlenmelidir.
7. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol test grafiği hazırlanır. Kalite Kontrol Test Grafiğinin Hazırlanması ve Kullanılması (P.19) Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.

8. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

Matriks Kalibrasyon Numunesi: Standart ile güçlendirilmiş kas dokusu örneği.

İS: İnternal Standart

ES: Eksternal Standart

LC: Likit Kromatografi

LC/MS: Likit Kromatografi/Kütle Spektrometresi

Alıkonma Zamanı (R_ç): Sinyalin oluş zamanı(pik zamanı)

CC_a: Karar limiti

CC_b: Tespit Limiti

MeOH: Methanol

ACN: Asetonitril

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 3 aşamada gerçekleştirilir;

- Antikoksidial ilaçların asetonitril ile dokudan ayrıştırılması.
- Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması.
- LC-MS/MS sistemi ile numunelerin analizinin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. 50ml'lik PP santrifüj tüpü
2. 15ml'lik PP santrifüj tüpü
3. Tek kullanımlık PP spatül
4. 500 ml'lik beher
5. 1 L'lik balon joje
6. 10 ml'lik balonjoje
7. 250 ml'lik mezür
8. 10-100 µl'lik tek kanallı otomatik pipet ve uçları
9. 20-200 µl'lik tek kanallı otomatik pipet ve uçları
10. 100-1000 µl'lik tek kanallı otomatik pipet ve uçları

11. 500-5000 µl'lik tek kanallı otomatik pipet ve uçları
12. Hassas terazi
13. Vorteks karıştırıcı
14. Multireax
15. Soğutmalı santrifüj
16. Azot evaporatörü
17. Ultrasonik su banyosu
18. Phenomenex Synergy Max RP 150mm x 2.00 4u
19. Thermo Finnigan TSQ LC-MS-MS sistem

7.2. Kullanılan Kimyasallar

1. Deiyonize su
2. Asetonitril, (HPLC grade)
3. Metanol, (HPLC grade)
4. Amonyum asetat
5. Dimetilsülfoksit (DMSO)
6. Formik asit
7. NaOH
8. n-Hekzan, (Reagend grade)
9. Toluen, (Reagend grade)
10. Nikarbazin (4,4-dinitrocarbanilide(DNC) ve 4,6-dimetil-2-pirimidinol(HDP)`den oluşan ikili kompleks) veya saf olarak 4,4-dinitrocarbanilide (DNC)
11. Narasin
12. Salinomycin SV Sodium Salt Penta Hemihydrate
13. Monensin Sodium Salt Hydrate
14. Lasalocid A Sodium Salt
15. Maduramisin ammonium
16. Nigerisin Sodium Salt
17. Kullanılan Çözücüler

1 - **A:0,02 M Amonyum Asetat:** 0,7708 g amonyum asetat 500 ml'lik balon joje içerisine tartılarak deiyonize su ile çözündürülür. 250 µl asetik asit konulur. Balon jopenin işaret çizgisine kadar su ile doldurulur. 30 dk ultrasonik banyoda bekletildikten sonra kullanılır.

2 - **B:Asetonitril + %0,1 Formik asit (B):** 500 ml lik balonjoje içerisine doldurulan asetonitril den

0,5 ml alınarak atılır. Üzerine 0,5 ml formik asit eklenip 15 dk ultrasonik banyoda bekletildikten sonra mobil faz şişesine aktarılır. 30 dk. ultrasonik banyoda bekletildikten sonra kullanılır.

3- **0,1 M NaOH:** 2 g NaOH 500 ml'lik balonjoje içerisine tartılır. DİS ile Soğuk su altında çözdürülerek 500 ml tamamlanır. 30 dk. Ultrasonik banyoda bekletildikten sonra kullanılır.

Standart Solusyonlar:

1.Stok Standart Çözeltisi (1 mg/ml)S₀: Her bir standart madde ayrı hazırlanır. Standartlardan 10 mg±0.1 tartılarak 10 ml'lik cam balona alınır. Nikarbazine 10 ml 1/1 oranında MeOH/DMSO diğerlerine Metanol eklenir. Çözününceye kadar ultrasonik banyo ve vortekste bırakılır. Hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonu 1 mg/ml'dir. Bu çözeltiler derin dondurucuda saklandığında üç ay stabildir.

2. Spike çalışma Eksternal Standart Çözeltisi (ES): (100 µg/ml):: Miks olarak Tüm stok standart çözeltilerden 2 ml alınarak metanol ile 20 ml tamamlanarak hazırlanır.

4.Nigerisin Stok Standart Çözeltisi (1 mg/ml): Nigerisin standardından 10 mg±0.1 tartılarak 10 ml'lik cam balona alınır. Üzerine 10 ml Metanol eklenir. Çözününceye kadar ultrasonik banyo ve vortekste bırakılır. Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu 1 mg/ml'dir. Bu çözelti derin dondurucuda saklandığında üç ay stabildir.

5. Spike çalışma İnternal Standart Çözeltisi (İS): (100 µg/ml): Hazırlanan nigerisin stok standardından 2 ml±0.01 ml 20 ml'lik cam balona alınır. Asetonitril ile 20 ml'e tamamlanır. Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu 100 µg/ml'dir.

Standart Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması:

NO. SL	<u>Spike Miks</u> <u>Standardı ES</u> alınacak miktar (µL)	Çalışma Çözeltisi (İS) alınacak miktar (µL)	Toplam Final Çözeltisi	Enjeksiyon miktarı(µL)
SL 1	0	100	20/80 oarnında	10
SL 2	50	100	mobilfaz A dan	10
SL 3	250	100	ve Mobilfaz B den	10
SL 4	500	100	alınarak 20 ml	10
SL 5	1000	100	tamamlanır.	10

Matriks Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması:

No. ML	<u>ES</u> (µL)	(İS) (µL)	(mg / kg)	İS' in (mg / kg)	Analit (µg)	Toplam Çözelti	İ.S (µg)
-----------	-------------------	--------------	------------	-------------------------	----------------	-------------------	----------

ML1	0	100	0	2	0	1 ml	10
ML2	50	100	1	2	5		10
ML3	250	100	5	2	25		10
ML4	500	100	10	2	50		10
ML5	1000	100	20	2	100		10

* 10 µl enjeksiyon yapılır.

7.3. Numunenin Analiz,

- 50ml'lik santrifüj tüpüne 5.0g numune tartılır,
- Üzerine 2 ml saf su ve 13ml metanol eklenir.
- 10 dakika multi-reaks da karıştırılır.
- 4°C, 3000 g'de 10dk. santrifüj edilir,
- Santrifüj sonunda üst fazın 2,5 ml'si 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır.
- 4 ml 0,1 M NaOH çözeltisi ile 10ml Hekzan + Toluen (2:1) çözeltisi eklenir,
- 30sn vorteks karıştırıcı ile karıştırılır ve sonra 2000 g'de 10dk santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda üst fazdan 7 ml ayrılarak 15 ml'lik deney tüpüne aktarılır.
- Bu faz N₂ altında 40°C'de uçurulur,
- Tüplere Mobilfaz A (0,02M amonyum asetat) / ACN (20/80) karışımından 1 ml ilave edilir.
- 10 dakika multi-reaks da karıştırılır.
- 0,45µm'lik RC filtreden geçirilip vialer aktarılır.
- 10 µl enjeksiyon yapılır.

7.4. LC-MS/MS ile Analizi

LC- TSQ EKİPMAN

1. Surveyor Autosampler (AS)
2. Surveyor LC pump
3. ThermoFinnigan TSQ mass spectrometer AM (accurate mass)
4. The software and firmware:
 - Xcalibur 1.4 SP2 for Surveyor AS and LC pump
 - Xcalibur 1.3 TF1 for TSQ Quantum

Surveyor Autosampler (AS)

Needle height from bottom	: 2.0mm.
Injection volume and mode	: 50 µl,
Post-injection valve switch time	: 0.0 min
Loop loading speed	: 5 µl/s

Syringe speed	: 8 µl/s
Flush/Wash source	: 20/80 (v/v) methanol/su.
Flush/Wash volume	: 1500 µl
Flush speed	: 250 µl/s
Tray temperature control	: 4 °C
Column Oven Control	: 40 °C

Surveyor LC pump

Column	: Phenomenex Synergy Max RP 2.1x150mm 5u
Mobile faz A	: 0.02 M Amonyum asetat
Mobile faz B	: Asetonitril + %0,1 Formik Asit
Analiz süresi	: 15 dakika
Akış hızı	: 0.25 ml/dk

Akış Programı:

Zaman (dk)	Akış Hızı (ml/dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0	0,25	15	85
5	0,25	15	85
6	0,25	00	100
9	0,25	00	100
10	0,25	15	85
15	0,25	15	85

MS dedektör: Thermo Finnigan TSQ LC-MS-MS

Ionization Mode	+/- ESI /SRM
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	350 °C
Drying gas pressure	10 psi
Scan Time	0.700 sec
SIM Width	0,01 amu
Needle	—4500/ + 5000V
Shield	+ 500V
Capillary	50V
Detector	+ 1750 V

CID Gas Pressure	1,50 mTorr	
Spray Chamber T	65°C	
Mass peak width in amu	Q1=0.7	Q3=0.7

Taranacak iyon değerleri :

İsim	Ana İyon	Ürün İyonlar
Nikarbazin	301.1	137 – 107
Lasolasid	613.4	377 – 359
Monensin	693.5	461 – 675
Salinomisin	773.5	431 – 531
Narasin	787.5	431 – 531
Maduramisin	934.8	647 – 629

Yapılan Spike çalışmaları Konsantrasyon ve tarih girilerek C:\ Xcalibur \ Data \ Grup adı \ Analiz yılı \ Matriks \ Performans klasörüne kaydedilir.

Merlin programı kullanılarak elde edilen sonuçlar C:\ Xcalibur \ Data \ Grup adı \ Analiz yılı \ Matriks \ Raporlar klasörüne kaydedilir.

7.5. Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

Negatif sonuçlar “ Tespit edilebilir düzeyde bulunamamıştır ” şeklinde raporlanır.

Analiz sonucunda matriks spike analizinde elde edilen pikin RT si ile numuneden elde edilen pikin RT si % 20 fark ile tutuyorsa, o numune için pozitif olma olasılığı üzerinde durulur.

LC-MS/MS analizlerinde Analiz sonucunda Pozitif olduğu düşünülen numunenin küçük pikin alanı ile büyük pikin alanlarının oranları, matriks spike tan elde edilen parçalanmış iyonların oranları ile karşılaştırılır. % 20 fark ile tutuyorsa pozitifdir denir.

Pozitif sonuçların miktar tayini için kontrol numuneleri ile hazırlanan matriks kalibrasyon eğrisi kullanılır.

Analiz sonucunda elde edilen piklerin alanı eklenen standardın numunedeki konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilir (y: Piklerin alanı, x: Konsantrasyon)

Elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi ($y = ax \pm b$) kullanılarak pozitif numunelerde tespit edilen madde miktarı hesaplanır. (y: Piklerin alanı, x:Konsantrasyon, a ve b: Doğrudan bulunan sabit sayılar).

Tespit edilen miktar($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x = (y \pm b)/a$ şeklinde hesaplanır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Blanchflower W.J., Kennedy D.G. Determination of Monensin, Narasin, Salinomycine, Maduramycine in, muscle, liver, and eggs from domestic fowl using liquid-chromatography-electrosprey mass spectrometry. *J Chrom B.* 1996, 675, 225-233
2. RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005; 19: 533–539

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan revizyonlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SÜTTE LEVAMİZOL VE BENZİMİDAZOL GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MSMS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu analiz metodu sütte levamizol ve benzimidazol gurubu antihelmintiklerin ve metabolitlerinin LC MS MS kütle spektrometresiyle analiz edilmesini amaçlar

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, sütte Levamizol ve Benzimidazol gurubu ve metabolitlerinin (albendazole, albendazole sulfon, albendazole sulfoxide, albendazole-2-aminosulfon, fenbendazole sulfon, flubendazole, ketotriklabendazole, levamisol, thiabendazole, thiabendazole 5-oh, triklabendazole) ilaç kalıntılarının LC-MS/MS sistemi ile analizini kapsamaktadır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

- 1 Kullanılan kimyasal maddeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
- 2 Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
- 3 Her analizden önce cihaza 100 ng/ml'lik standart enjeksiyon yapıp sonuç önceki analizlerle karşılaştırılarak sistemin performansı kontrol edilir.
- 4 Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanmalı, grafiğinin hazırlanması ve kullanılması, (P.19) Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmelidir.
- 5 Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC/MS: Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro spreng iyonizasyon

ES: Eksternal standart

PP: Polipropilen

LOD: Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ: Ölçüm limiti (Limit of quantitation)

CC α : Karar limiti

CC β : Saptama yeteneği

CV: Tekraredilebilirlik (Repeatability)

MW m \ddot{u} lek \ddot{u} l ağırlığı

S1 Benzimidazol standart karışımı

R1 Benzimidazol internal standart karışımı

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu analiz metodu s \ddot{u} tte Levamizol ve Benzimidazol gurubu antihelmintiklerin ve metabolitlerinin LC-MS MS k \ddot{u} tle spektrometresiyle analiz edilmesini sağlayan hasas bir metotur. Analiz metodu benzimidazol gurubu ve levamizol gurubu etken maddelerinin ve metabolitlerinin pek çoğunun bir arada bakılmasını sağlayan bir metotur. Bu metotla analizler iki aşamada gerçekleştirilir;

1. S \ddot{u} t \ddot{u} n analize hazırlanması
2. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

1. PP Santrif \ddot{u} j t \ddot{u} p \ddot{u} 15 mL'lik
2. Enjekt \ddot{u} r 5 mL'lik
3. Filtre 0.45 μ m
4. Ependrof t \ddot{u} p \ddot{u}
5. Pipet ucu (200 , 1000 ve 5000 μ L'lik)
6. Ayarlanabilir pipet 100–200 μ L (Ependrof Seri No:06102815)
7. Ayarlanabilir pipet 200–1000 μ L (Ependrof, Seri No:08121321)
8. Ayarlanabilir pipet 1000–5000 μ L (Ependrof, Seri No:08121321)
9. Hassas terazi (GB 10288)

10. Multireaks vorteks (253030604010507000009)
11. Soğutmalı santrifüj (GB 9969 ve GB 10439)
12. Benzimidazol Gurubu HPLC Kolonu 75x4,6 mm 5 µ
13. Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS
14. Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1)

7.2. Kullanılan Kimyasallar

Standart karışımı (S1) ve iç standart karışımı (R1):

S1 Benzimidazole standart karışım standardının içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
Albendazole	265	4000
Albendazole Sulfon	297	4000
Albendazole Sulfoxide	281	4000
Albendazole-2-aminosulfon	239	4000
Fenbendazole Sulfon	331	400
Flubendazole	313	2000
Ketotriklabendazole	329	4000
Levamisol	204	400
Thiabendazole	201	4000
Thiabendazole 5-OH	217	4000
Triklabendazole	359	4000

R1 iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
Albendazole Sulfon-d3	300	4000
Albendazole Sulfoxide-d3	284	4000
Fenbendazole Sulfon-d3	334	400
Flubendazole-d3	316	2000
Thiabendazole-13C6	207	4000

ST Standart karışımı ve R1 iç standart: Derin dondurucuda (-20 °C) saklanmalıdır.
Diğer reaktifler oda sıcaklığında saklanmalıdır.

- Asetik Asit Merck
- Asetik Asit (%1) :100 ml Bir şişeye pipetle 1 ml asetik asit alınır Üzerine Mezür yardımıyla 99 ml deiyonize su ilave edilir
- Etil Asetat Merck
- Metanol Merck
- Deiyonize Su

Metanol (%20): 1 Litrel lik mezürle 200 ml metanol ölçülür, üzeri deiyonize su bir litreye tamamlanır.

Mobil Faz A: Metanol/Su (%30)/ (%70)/

Mobil Faz B: Metanol

7.3. Numunenin Analizi

1. Homojen hale getirilmiş süt numunesinden 4 ml, 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
2. 100 µl İnternal standart ilave edilir. 15 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
3. 200 µl %1 Asetik Asit ilave edilir. 15 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
4. 10 mL Etil Asetat ilave edilir. 3 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
5. 4000 x g 'de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda, üstteki berrak çözeltiden pipet ile 7 ml (2x3,5 ml) alınıp 15 ml'lik cam tüpe aktarılır ve azot akımı altında 42°C sıcaklıkta ve 10.0 psi basınçta sarı yağimsı kalıntı oluşana kadar kurutulur.
6. Kurutma işleminden sonra tüpe 1,0 ml Metanol ilave edilir. Vorteksle 15 saniye karıştırılır. Ultrasonik banyoda 5 dk bekletilir.
7. Ultrasonik banyodan sonra tekrar vortekslenir. Tüpün içindeki sıvının tamamı enjektör ile alınır. 0.45 mm filtreden eppendorf tüp içine süzülür.
8. Süzülen kısımdan 500 µL vialle alınır. Üzerine 500 µL Metanol (%20) ilave edilerek vortekslenir. LC-MS/MS sistemine 20 µL enjeksiyon yapılır.

Matris Standardının Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyonu

3 adet 4.0 mL blank Süt numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.

Üzerine aşağıdaki tabloya uygun Standart konsantrasyonundan ilave edilir.

Süt numunesindeki Konsantrasyon	50 µg/kg	100µg/kg	150 µg/kg
Eklenecek Standart Hacmi	50 µl	100 µl	150 µl

Hazırlanan bu numunelere 7.2.1.2–7.2.1.4 numaralı işlemler uygulanır.

7.4. LC-MS-MS ile Analiz

□ HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	80	20	0.3
00:12	20	80	0.3
03:00	20	80	0.3
03:06	0	100	0,4
05:00	0	100	0,4
05:06	80	20	0,4
08.00	80	20	0.4
08:01	80	20	0,3

Kolon: Benzimidazol Gurubu HPLC Kolonu 75x4,6 mm 5 µ

Akış hızı: 0.50 mL/dakika

Enjeksiyon hacmi: 20 µL

Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 10 :90 metanol: su karışımı (h/h)

□ MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI +	
API Nebulizing gas pressure	55 psi	
Drying gas temperature	400 °C	
Drying gas pressure	35 psi	
Scan Time	0.69 sec	
SIM Width	2.0 amu	
Needle	+ 5000V	
Shield	+ 500V	
Capillary	70V	
Detector	+ 1600 V	
CID Gas Pressure	2.00 mTorr	
Spray Chamber T	65°C	
Mass peak width in amu	Q1=1.5	Q3=1.5

□ MS-MS tarama parametreleri

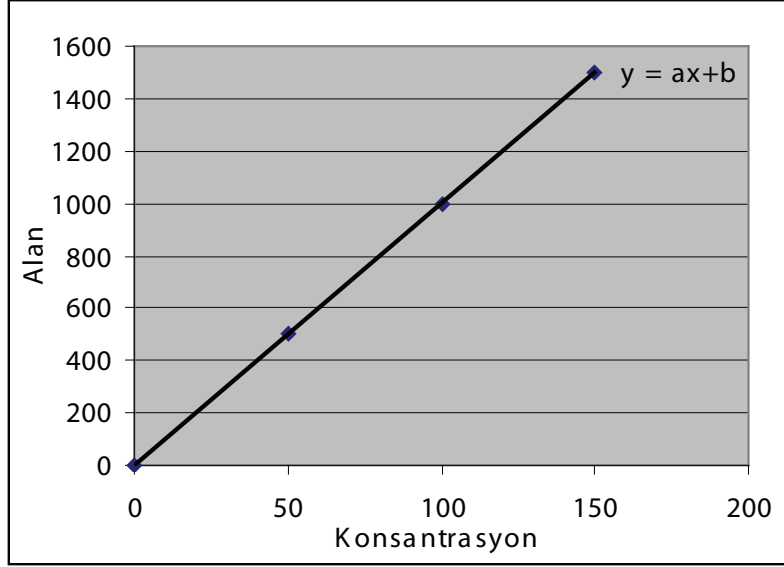
Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
Albendazole	266	234	70 V	20	0,027
Albendazole Sulfon	298	266	70 V	18	0,027
Albendazole Sulfon-d3	301	266	70 V	18	0,027
Albendazole Sulfoxide	282	240	70 V	12	0,027
Albendazole Sulfoxide-d3	285	243	70 V	12	0,027
Albendazole-2- aminosulfon	240	133	70 V	25	0,027
Fenbendazole Sulfon	332	300	70 V	20	0,027
Fenbendazole Sulfon-d3	330	300	70 V	20	0,027
Flubendazole	314	282	70 V	20	0,027
Flubendazole-d3	317	282	70 V	20	0,027
Levamisol	205	178	70 V	20	0,046
Thiabendazole	202	175	70 V	25	0,027
Thiabendazole-13C6	208	181	70 V	25	0,027
Thiabendazole 5-OH	218	191	70 V	25	0,027
Ketotriklabendazole	328,5	181,3	-70V	25	0,200
Triklabendazole	358,5	196,5	-70V	35	0,100

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analizi edilir. Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Düzeyde Bulunamadı.” şeklinde raporlanır.

Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu pozitif olarak değerlendirilir ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır. Sonuçlar cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Piklerin alanı konsantrasyona karşılık grafiğe geçirilir.



Numune analizi sonucunda numunede tespit edilen tetrasiklin pikinin alanı (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Pendik VKE Doküman Veri Kontrol Prosedürü
2. Pendik VKE Metot Validasyonu Prosedürü
3. Pendik VKE Kalite Kontrol Prosedürü
4. Official Journal of the European Communities 2002/657/EC Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results ,12 August 2002 implementing.
5. Gowik, P., Polzer J., AV 014-01-V06 Proceedings for the Validation of Test Methods 2003

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan revizyonlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SÜTTE AVERMEKTİN GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MSMS İLE ANALİZİ METODU

1. AMAÇ

Bu test prosedürü, süt numunelerinde Avermektin grubu (ivermektin, abamektin, doramektin, moksidektin, eprinomektin) ilaç kalıntılarının tespiti ve miktar tayini amacıyla kullanılır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, süt numunelerinde Avermektin grubu ilaç kalıntılarının ekstraksiyonu ve LC-MS/MS ile doğrulama metodunu içerir.

Avermektinler:

İvermektin, Abamektin, Doramektin, Moksidektin, Eprinomektin, Selamektin (IS).

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Standartlar, numune hazırlanan ortamda hazırlanmamalıdır.
3. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
4. Analizden önce analitlerin tespit limitleri (MKL' varsa MKL düzeyinde) düzeyinde standart karışımı enjeksiyonu yapılarak sistemin performansı kontrol edilir. Analize başlayabilmek için alıkonma zamanındaki sapmanın $\pm\%5$ 'ten az ve piklerin alanlarındaki farkın $\pm\%10$ 'dan az olması gerekir.
5. Kullanılan LC kolonu her seri analizden sonra temizlenip uygun çözücü sisteminde saklanmalıdır.
6. Her seri analizden sonra cihazın tampon çözelti geçen hattı su geçirilerek temizlenmeli, MS sisteminin "cone" kısmı su püskürtülerek ya da çok kirli ise yerinden çıkarılıp yıkanarak temizlenmelidir.
7. Numuneler, analizi yapılan kadar derin dondurucuda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif olanlar imha edilir, pozitif olanlar ise derin dondurucuda bir yıl saklanır.

8. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol test grafiği hazırlanır. Kalite Kontrol Test Grafiğinin Hazırlanması ve Kullanılması Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.
9. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/ TANIMLAR

- CC_a : Karar limiti
- CC_b : Tespit Limiti
- Kontrol Numunesi: Standart ile güçlendirilmiş örnek.
- LC: Likit Kromatografi
- LC-MS/MS: Likit Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi
- APCI: Atmosferik Basıncıta Kimyasal İyonizasyon
- DİS: Deiyonize su
- MGPL: Minimum Gerekli Performans Limit
- MKL: Maksimum Kalıntı Limiti
- MeCN: Asetonitril
- MeOH: Metanol
- İS: İnternal Standart
- N_2 : Azot
- S_0 : Stok Standart
- P.P: Polipropilen Santrifüj Tüp

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

- Protein çöktürülmesi ve uzaklaştırılması
- LC-MS/MS ile doğrulama analizi

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- 15 ml'lik PP santrifüj tüpü
- 50 ml'lik PP santrifüj tüpü
- Enjektör 2 ml

- Enjektör filtresi (0,45 µm)
- 1,8 ml vial ve 500 µl insert vial
- 1000 ml'lik balon joje
- 10 ml'lik balonjoje
- 250 ml'lik mezür
- Hassas terazi
- Multireaks
- Soğutmalı santrifüj
- Numune yoğunlaştırıcı
- Ultrasonik banyo
- Otomatik pipetler (100, 200, 1000, 5000 µl)
- Thermo Finnigan TSQ Quantum

-Surveyor AS

-Surveyor LC pompa

-TSQ Quantum

- Yazılım ve ürün bilgisi

- Xcalibur 1.4 SP1 for Surveyor AS and LC pump
- Xcalibur 1.4 for TSQ Quantum
- The firmware 1.4 for Surveyor AS

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- İvermektin
- Eprinomektin
- Selamektin
- Abamektin
- Doramektin
- Moksidektin
- Asetonitril
- Trietilamin
- Sodyum klorür
- Deiyonize su

Çözeltiler;

- 1. %0.1'lik TEA Çözeltisi:** 1000 µl TEA (7.2.9) alınarak Deiyonize su (7.2.11) ile 1000 ml'e tamamlanır.
- 2. 3M NaCl Çözeltisi:** 175,5 g NaCl tartılarak 1000 ml deionize suda çözündürülür.

3. Stok Standart ve Çalışma Çözeltilerin Hazırlanması

Avermektin-S₀ Stok çözeltisi:

Her bir standart madde 10 mg±0.05 tartılarak 10 ml'lik cam balona alınır. 10 ml Asetonitril eklenir. Çözününceye kadar ultrasonik banyo ve vortekste bırakılır. Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu 1 mg/ml'dir.

Avermektin S₁ çalışma çözeltisi,

Avermektin-S₀ stok solüsyonundan 1 ml±0.01 ml alınarak 10 ml'lik cam balon alınır. Asetonitril ile 10 ml'e tamamlanır. Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu 100 µg/ml'dir.

Avermektin S₂ çalışma çözeltisi,

Avermektin-S₁ solüsyonundan 1 ml±0.01 ml alınarak 10 ml'lik cam balon alınır. Asetonitril ile 10 ml'e tamamlanır. Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu 10 µg/ml'dir.

4. Süt numuneleri için spike çözeltisinin hazırlanması:

Süt spike çözeltisi, Tablo 1'de belirtildiği gibi eprinomektin 0,5 ng/µl, abamektin 0,5 ng/µl, doramektin 0,5 ng/µl, ivermektin 0,5 ng/µl ve moksidektin 1 ng/µl içerek şekilde 100 ml olarak hazırlanır. Bu amaçla, eprinomektin S₁ çalışma çözeltisinden 0,5 ml, abamektin S₂ çalışma çözeltisinden 0,5 ml, doramektin S₂ çalışma çözeltisinden 0,5 ml, ivermektin S₂ çalışma çözeltisinden 0,5 ml ve moksidektin S₀ çalışma çözeltisinden 1 ml alınarak metanol ile 100 ml'e tamamlanır.

5. İnternal Standart Çözeltisinin hazırlanması:

İnternal standart olarak selamektin kullanılır. İnternal standart çözeltisi de 3 ng/µl olacak şekilde hazırlanır. Selamektin S₁ çalışma çözeltisinden 3 ml alınarak 100 ml'e tamamlanır.

6. Final Çözeltisi:

99,9 ml Asetonitril üzerine 100 µl %0,1 TEA çözeltisinde ilave edilerek 100 ml hazırlanır.

Tablo 1: Süt numunelerinde uygulanacak yüklemeler

Analit	Alınacak miktar (ml)	Analit konsantrasyonu (100 ml)	0.5 MRL/ 1 MGPL	1 MRL/ 2 MGPL	1.5 MRL/ 3 MGPL	MRL µg/kg
Eprinomektin	0,5 (S ₁)	0,5 ng /µl	100 µl	200 µl	300 µl	20 µg/kg
Abamektin	0,5 (S ₂)	0,05 ng /µl				0 µg/kg
Doramektin	0,5 (S ₂)	w,05 ng /µl				0 µg/kg
Moksidektin	0,1 (S ₀)	1 ng /µl				40 µg/kg
İvermektin	0,5 (S ₂)	0,05 ng /µl				0 µg/kg
Selamektin (İnternal Standart) (3 ng/ µl)						

7.3. Numune Hazırlanması

- 1 Homojen hale getirilen süt numunesinden 5 ml alınır ve 50 ml'lik santrifüj tüpüne koyulur.
- 2 Spike amacıyla Tablo 1'de belirtilen şekilde yüklemeler yapılır ve 30 dakika çalkalayıcıda bekletilir.
- 3 10 ml asetonitril ilave edilir tekrar 15 dk vortekste karıştırılır.
- 4 5 ml 3 M NaCl ilave edilir, 5 dk vortekste karıştırılır.
- 5 10 dakika 4000 g de +4 °C'de santrifüj edilir.
- 6 Üst faz dan 5 ml alınarak 15'lik P.P tüpe aktarılır.
- 7 Tüpler 40 °C'de N₂ gazı altında uçurulur.
- 8 Kurutulan tüplere 500 µl final çözültisi(ACN, %0,1 TEA) ilave edilerek 15 dk multireakste karıştırılır.
- 9 Enjektör filtrelerden geçirilerek insört viallere aktarılır.
- 10 50 µl enjeksiyon yapılır.

7.4. Cihaz Parametreleri

LC-MS/MS ile ilgili parametreler;

TSQ QUANTUM EKİPMAN (Thermo Finnigan)

1. Surveyor Autosampler (AS)

Enjeksiyon hacmi	:25 µl,
İğnenin dipten yüksekliği	:1,8 mm.
Şırınga hızı	:8 µl/s
Akış hacmi:	:1000 µl
Akış/yıkama kaynağı	:20/80 (v/v) metanol/su.

Yıkama hacmi	:2500 µl
Yıkama hızı	:250 µl/s
Enj. sonrası valf değişim süresi	:0.0 min
Loop yükleme hızı	:5 µl/s
Enjeksiyon modu	:Kısmi valf
Autosampler ısı kontrol	:10 °C
Kolon ısı kontrol	:40 °C
Surveyor LC pump	
Mobile faz A	:Asetonitril (%85)
Mobile faz B	: Trietilamin (%0.1)(%15)
Analiz süresi	: 10 dakika
Akış hızı	: 0.3 ml/dak.
Kolon	: Zorbax Extend C18, 150x2.00, 5 µm

2. Thermo Finnigan TSQ

Cihaz	: TSQ Thermo Finnigan
İyon Source	: ESI
Source Sıcaklığı	: 400 °C
Tarama şekli	: SRM
Auxe gaz	: 10
Spray gaz	: 60
Argon gaz	: 1

Analit	Ana İyon	1.Ürün	2.Ürün	Collision energy	Polarity
Abamektin	871.40	565.20	229.10	26/36	-
İvermektin	873.50	567.30	228.70	26/30	-
Moksidektin	638.50	528.30	236.10	20/30	-
Eprinomektin	912.50	565.40	269.90	26/30	-
Doramektin	897.50	591.30	229.10	26/35	-
Selamektin	768.40	750.20	722.20	24/24	-

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

Sorumlu pik alanları kullanılarak matriks kalibrasyon eğrisinin lineer regresyonu elde edilir. Elde edilen bu değerle her bir analittteki varolabilecek miktarlar hesaplanabilir.

$$x = (y-a) / b$$

$$b = \frac{(n\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i)}{\sqrt{\{n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2\}}}$$

$$a = (\sum y_i - b \sum x_i) / n$$

x: Örnekteki analite konsantrasyonu (mg l⁻¹)

x_i: i.nci standartın analit konsantrasyonu (mg l⁻¹)

a: Kalibrasyon eğrisinin intercepti

b: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

y: Örnekteki analit pikinin alanı

y_i: 1.nci analit pik alanı

n: her bir konsantrasyon aralığındaki analiz sayısı

Pozitif sonuçlar için hesaplama kontrol numunelerinin analizi ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi (y = ax ± b) kullanılarak hesaplanır. (y: Piklerin alanı, x:Konsantrasyon, a ve b: Doğrudan bulunan sabit sayılar).

Tespit edilen miktar (mg/kg) : x = (y ± b)/a

Validasyon dataları, 2002/657/EC direktifine uyumlu, Metot Validasyon Prosedürüne göre belirlenmiştir.

Not: Farklı laboratuvar şartlarında, metot tanımında sunulan karakterlerin performanslarında farklılıklar oluşabilir. Bu yüzden, parametreler tüm çalışmalarda her laboratuvar tarafından yeniden belirlenmeli ve düzenli olarak doğrulanmalıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Durden D. A. (2007). Positive and negative electrosprey LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. Journal Chromatography B. Analyte Technocol. Biomed. Life Sci. 2. 850(1-2), 134-46.
2. Metot Validasyon Prosedürü, P 13.
3. Kalite Kontrol Prosedürü, P 19.
4. Piotr JEDZINIĄK et al. (2009). Multi-Residue Screening Method for the Determination of Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug Residues in Cow's Milk with HPLC-UV and its Application to Meloxicam Residue Depletion Study. Bull Vet Ins Pulawy. 53, 731-739.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

YUMURTADA ANTİKOKSİDİAL GRUBU İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE ANALİZİ METODU

1 AMAÇ

Yumurta da Antikoksidial (lasolasid, maduramisin, monensin, narasin, salinomisin ve nikarbazin) ilaç kalıntılarının LC-MS/MS Sistemi ile analizlerinin yapılması.

2 UYGULAMA ALANI

Antikoksidial (lasolasid, maduramisin, monensin, narasin, salinomisin ve nikarbazin) ilaç kalıntılarının ekstraksiyon yöntemini, LC-MS/MS sistemi ile analizini içerir.

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Kullanılan kimyasal malzemeler toksik özellik gösterdiğinden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalıdır.
2. Bulaşma olasılığına karşı tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, eğer cam malzeme kullanmak gerekiyorsa bunlar kromik asit ve güçlü bir organik çözücü ile temizlenmelidir.
3. Analiz kalitesinin kontrolü için bir kalite kontrol grafiği hazırlanır. Kalite Kontrol Grafiğinin hazırlanması ve Kullanılması Kalite Kontrol Prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilir.
4. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/ Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 TANIMLAR

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

LC-MS/MS: Likit Kromatografi / Kütle Spektrometresi

ESI: Elektro sprey iyonizasyon

İS: İnternal standart (İç standart)

ES: Eksternal standart

LOD: Tayin limiti (Limit of detection)

LOQ: Ölçüm limiti (Limit of quantitation)

CC_α: Karar limiti

CC_β: Tespit Limiti

PP: Polipropilen

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot 3 aşamada gerçekleştirilir;

1. Antikoksidial ilaçların metanolle ile yumurtadan ayrıştırılması.
2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması.
3. LC-MS/MS sistemi ile tarama analizinin yapılması

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipman

- PP Santrifüj tüpü 15 mL'lik
- Enjektör 2 mL'lik
- 0.45 mikron filtre
- Pipet ucu (200–5000 µL'lik)
- Ayarlanabilir pipet 20–200 µL
- Ayarlanabilir pipet 1000–5000 µL
- Hassas Terazî (GB 10288)
- Multireaks Vorteks
- Soğutmalı Santrifüj
- Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS-MS
- Kromatografik program: Tandem Gold Workstation (Version 6.9.2)

7.2. Kullanılan Kimyasallar

- S1: Antikoksidial analizi için ES (-20 °C'de saklanmalıdır)
- R1: Nigersin İS (1ppm) (-20 °C'de saklanmalıdır)
- R2: %5 Methanol (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.)
- R3: Asetonitril (Oda sıcaklığında saklanmalıdır).
- Mobil Faz A: %60 Methanol %40 Su %0.04 Formik Asit (Oda sıcaklığında Saklanmalıdır.)
- Mobil Faz B: Asetonitril %0.1 Formik Asit (Oda sıcaklığında saklanmalıdır.

S1 Antikoksidial standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
Monensin	671	160
Narasin	765	1000
Lasolasid A	591	400
Salinomisin	751	400
Maduramisin	917	400
Nikarbazin	426	400

R1 iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/L (ppb)
Nigerisin	725	1000

7.3. Numunenin Analizi

Numunenin Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyon

- Homojen hale getirilen 2,0 g yumurta numunesi, 15 ml'lik PP santrifüj tüpüne alınır.
- 100 µl R1 ve 2 ml R2 ilave edilir.15 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
- 6 ml R3 ilave edilir. 2 dk vorteks karıştırıcıda karıştırılır.
- 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda, üstteki berrak çözüldiden enjektör ile alınır.0.45 µm filtreden süzülerek viale alınır. LC-MS/MS sistemine 20 µl enjeksiyon yapılır.

Matris Standardının Analize Hazırlanması ve Ekstraksiyon

- 3 adet 2.0 g çırpılıp homojen hale getirilmiş blank yumurta numunesi 15 mL'lik santrifüj tüpüne alınır.
- Üzerine aşağıdaki tabloya uygun S1 ilave edilir.

Eklenecek Standart Hacmi		50 µL	100 µL	150 µL
Dokudaki Konsantrasyon (µg/kg)	Monensin	4	8	12
	Narasin	25	50	75
	Lasolasid A	10	20	30
	Salinomisin	10	20	30
	Maduramisin	10	20	30
	Nikarbazin	10	20	30

7.4. LC-MS-MS ile Analiz

- HPLC parametreleri

Gradient pompa programı:

Zaman	% A	% B	Flow
00:00	70	30	0.5
02:00	70	30	0.5
05:30	0	100	0.5
09:30	0	100	0.5
09:31	70	30	0.5
13:00	70	30	0.5

Kolon: Antikoksidial grubu HPLC kolonu 75x3,0 mm 4 µ (ZİVAK)

Akış hızı: 0.50 ml/dak

Enjeksiyon hacmi: 20µL

Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 15:85 MeOH: Su karışımı (h/h)

- MS/MS parametreleri:

Ionization Mode	ESI (+), ESI (-)
API Nebulizing gas pressure	55 psi
Drying gas temperature	250 °C
Drying gas pressure	32 psi
Scan Time	0.90 sec
SIM Width	1.5 amu
Needle	+ 5000V
Shield	+ 600V
Capillary	30V
Detector	+ 1600 V

CID Gas Pressure

2.00 mTorr

Spray Chamber T

65°C

Mass peak width in amu

Q1=1.5

Q3=1.5

MS-MS tarama parametreleri

Analit	M S MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Capillary	Parçalama Enerjisi	Dwell Time
Nikarbazin (-)	300,7	136,6	-30 V	10	0,150
Lasolasid A (-)	589	234,6	-30 V	35	0,150
Monensin	693	675	30 V	35	0,100
Nigerisin	742	657	30 V	30	0,100
Salinomisin	773	431	30 V	45	0,100
Narasin	787	431	30 V	45	0,100
Maduramisin	939	877	30 V	20	0,100

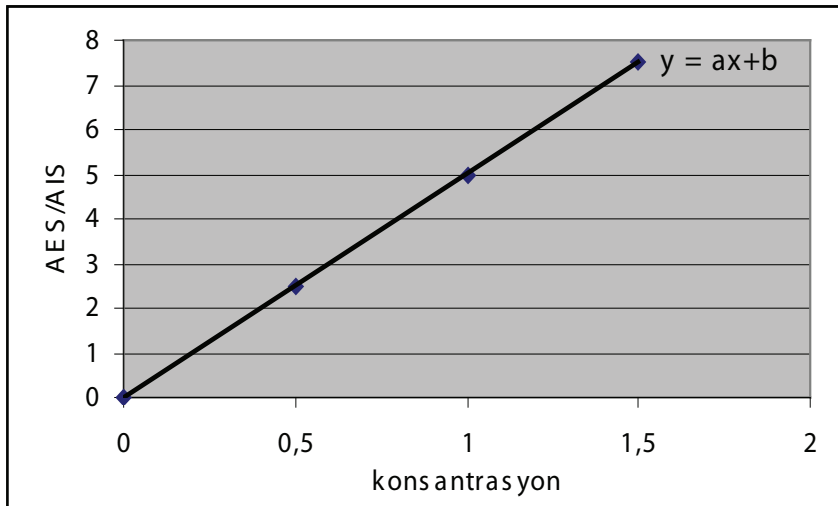
7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplanması

Numune analizinin sonucunda standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu şüpheli olarak değerlendirilir ve numune kontrol amacıyla tekrar analiz edilir. Aksi halde sonuç negatif olarak değerlendirilir ve “Tespit Edilebilir Limit Düzeyinde Bulunamamıştır.” Şeklinde raporlanır.

Şüpheli numunenin tekrar analizi sonucunda yine standart ile aynı alıkonma zamanında pik bulunursa analiz sonucu pozitif olarak değerlendirilir ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır .

Sonuçlar cihaz programından ya da matris standart numunelerinin analiz sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matris standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edilir. Her pik alanının iç standart pik alanına oranları hesaplanır. Hesaplanan bu değer konsantrasyona karşılık grafiğe geçirilir.



AES: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili antikoksidiyal pikinin alanı

AIS: Matris standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı

Numune analizi sonucunda numunede tespit edilen antikoksidiyal pikinin alanı ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konup sonuç hesaplanır.

Analiz Sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Pendik Doküman Veri Kontrol Prosedürü
2. Pendik Metot Validasyonu Prosedürü
3. Pendik Kalite Kontrol Prosedürü
4. ZİVAK ZV-1029-0200-40 LC-MS/MS Analiz Seti Yumurta Matrisinde Antikoksidial Grubu Antibiyotikler Kalıntı Analizi Talimatı (ZV-1029-0200-40-KK-T Rev.01)

9. REVİZYON

Bu analiz talimatı ile ilgili yapılan güncellemeler aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALDA PESTİSİT KALINTILARININ GC-ECD-FPD, HPLC-PCD İLE TAYİNİ METODU

1 AMAÇ

Ballarda organik klorlu, organik fosforlu, pretroid ve karbamat grubu pestisitlerin GC-ECD-FPD, HPLC-PCD ile analizlerinin yapılmasını amaçlar.

2 UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, ballarda karbamat (metomil, metiyokarb, aldikarb, karbofuran), organik klorlu (beta-endosulfan, brompropilat), organik fosforlu (diklorvos, malatyon, diazinon, paratyon-metil, klorprifos, kaumafos) ve pretroid (sipermetrin, flumetrim tau-fluvalinat) grubu pestisitlerin GC-ECD, GC-FPD, HPLC sistemi ile analizlerini kapsar.

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

- GC-ECD : Gaz Kromatografi-Elektron Yakalayıcı Dedektör
GC-FPD : Gaz Kromatografi-Alev Fotometrik Dedektör
GC-MS : Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometre
HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
PCD : Kolon Sonrası Türevlendirme Sistemi
OPA : Orto-ftalaldehit
VKMAE : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü
MRL : Maksimum Kalıntı Limiti
MRPL : Minimum Gerekli Performans Limiti

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

1. Katı-sıvı faz ekstraksiyonu ile analitlerin diklormetan fazına geçmesi
2. Cihaz analizi

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- 1 GC-ECD-FPD
- 2 HPLC-PCD
- 3 GC-MS
- 4 Floresans Dedektör (FLD)
- 5 Kolon Sonrası Türevlendirme Sistemi (PCD)
- 6 GC kolonu
- 7 HPLC kolonu
- 8 Oto Enjektör
- 9 Vorteks
- 10 GC-MS Kolonu
- 11 Vial
- 12 Pipet ucu
- 13 Otomatik Pipet
- 14 Analitik terazi
- 15 Buzdolabı

- 16 Cam malzeme(beher, mezür)
- 17 Ultra toraks
- 18 Rotary evaporatör
- 19 Extrelut NT20 kartuş
- 20 Buzdolabı
- 21 Çözücü süzme düzeneği

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Su (Ultra saf olarak üretilmiş)
2. Thiofluor
3. Aseton ($\geq 99,8$ saflıkta)
4. Orto-ftalaldehit (OPA)
5. Orto-ftalaldehit Reaktif
6. Hidroliz Reaktif
7. Asetonitri ($\geq 99,9$)
8. Etanol($\geq 99,9$)
9. Aseton($\geq 99,8$)
10. Metanol($\geq 99,9$)
11. Siklohekzan($\geq 99,9$)
12. İzooktan($\geq 99,5$)
13. Diklorometan($\geq 99,9$)
14. Standart Maddeler(Metomil, Metiyokarb, Aldikarb, Karbofuran, Beta-Endosulfan, Brompropilat, Diklorvos, Malatyon, Diazinon, Paratyon-Metil, Klorprifos, Kaumafos, Sipermetrin, Flumetrim Tau-Fluvalinat)
15. Hidrojen gazı
16. Kuru hava
17. Azot gazı
18. Helyum gazı

Standart Çözeltiler

Karbamat Grubu Pestisitler İçin Standart Çözeltiler;

1. Standart ana stok çözelti: 10 ng/ μ l yoğunluğundaki Referans Standart çözeltiler kullanılmaktadır.
2. Standart ara stok çözelti: 10 ng/ μ l yoğunluğundaki Standart ana stok çözeltilerden 1ng/ μ l

yoğunlukta olacak şekilde standart miks 4 ara stok çözeltisi hazırlanır. Bu amaçla her bir analite ait 10 ng/µl yoğunlukta standart ana stok çözeltilerden 100'er µl alınarak üzerine 600 µl sikloheksan eklenip 1ng/µl yoğunlukta standart miks 4 ara stok çözeltisi elde edilir.

3.Pozitif(Spike) numune: Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmalarında 1 ng/µl yoğunlukta hazırlanmış standart miks 4 ara stok çözeltisinden sırasıyla 0,05, 0,1 ve 0,15 ng/µl yoğunlukta olacak şekilde standart ekilmiş bal numuneleri bir baget yardımıyla iyice karıştırılır ve 7.3. basamağından itibaren numune ekstraksiyon işlemi uygulanır.

Pretroid Grubu Pestisitler İçin Standart Çözeltiler;

1. Standart ana stok çözelti:10 ng/µl yoğunluğundaki Referans Standart çözelti kullanılır.

2. Standart ara stok çözelti: 10 ng/µl'lik Sipermetrin ana stok çözeltisinden 500 µl alınıp 4500 µl Asetonitril ile 5 ml'ye tamamlanarak 1 ng/µl'lik 5 ml Sipermetrin standart ara stok çözeltisi hazırlanır. Kalan 2 standart için 10 ng/µl yoğunluğundaki standart ana stok çözeltilerden 500 µl alınıp 4000 µl Sikloheksan ile 5 ml'ye tamamlanarak 1 ng/µl'lik 5 ml standart miks-2 ara stok çözeltisi hazırlanır.

3.Pozitif (Spike) numune hazırlanması: Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmalarında 1ng/µl yoğunlukta hazırlanmış Sipermethrin ve standart Miks 2 ara stok çözeltisinden Tablo 1'de belirtildiği gibi sırasıyla 0,5MRL, 1,0MRL, 1,5MRL, 2,0MRL düzeylerinde olacak şekilde standart ekimi yapılan bal numuneleri bir baget yardımı ile iyice karıştırılır ve 7.3 basamağından itibaren numune ekstraksiyonu işlemi uygulanır.

Tablo 1. Pozitif (Spike) numune hazırlanmak için ekimi yapılan standart miktarları

MRL	Miktar (ng/g) Sipermetrin	Miktar (ng/g) Mix -2	µl Sipermetrin (1ng/µl) (10 gr örnek için)	µl miks-2 Standart (1ng/µl) (10 gr örnek için)
0	0	0	0	0
0.5	5	5	50	50
1	10	10	100	100
1.5	15	15	150	150
2	20	20	200	200

Organik Klorlu ve Organik Fosforlu Pestisitler İçin Standart Çözeltiler

1.Standart ana stok çözelti:10 ng/µl yoğunluğundaki Referans Standart çözeltiler kullanılmaktadır.

2.Standart ara stok çözelti hazırlama: 10 ng/µl'lik Brompropilat ana stok çözeltisinden 2500 µl alınıp 2500 µl sikloheksan ile 5 ml'ye tamamlanarak 5 ng/µl'lik 5 ml Brompropilat standart ara stok çözeltisi hazırlanır. Kalan 7 standart için 10 ng/µl yoğunluğundaki Standart ana stok çözeltilerden

1ng/µl yoğunlukta olacak şekilde standart miks 7 ara stok çözeltisi hazırlamak amacıyla her bir analite ait 10 ng/µl yoğunlukta standart ana stok çözeltilerden 500'er µl alınarak üzerine 1500 µl siklohekzan eklenip 1ng/µl yoğunlukta 5 ml standart miks 7 ara stok çözeltisi elde edilir.

3.Internal standart ara stok çözelti hazırlama: 10 ng/µl'lik PCB 209 ana stok çözeltisinden 50 µl ve 10 ng/µl'lik Trifenilfosfat ana stok çözeltisinden 250 µl alınıp 4500 µl siklohekzan ile 5 ml'ye tamamlanarak 1 ng/µl'lik 5 ml internal standart ara stok çözeltisi hazırlanır.

4.Pozitif (Spike) numune hazırlanması : Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmalarında 1ng/µl yoğunlukta hazırlanmış Brompropilat ve standart Miks 7 ara stok çözeltisinden tablo 1'de belirtildiği gibi sırasıyla 0,5MRL, 1,0MRL, 1,5MRL, 2,0MRL ayrıca her seviyeye 0,010 ng/µl yoğunlukta internal standart ekimi yapılan bal numuneleri bir baget yardımı ile iyice karıştırılır ve 7.3. basamağından itibaren numune ekstraksiyonu işlemi uygulanır.

Tablo 2. Pozitif (Spike) numune hazırlanmak için ekimi yapılan standart ve internal standart miktarları

MRL	Miktar (ng/g) Brompropilat	Miktar (ng/g) Mix 7	µl Brompropilat (5ng/µl) (10 gr örnek için)	µl miks 7 Standart (1ng/µl) (10 gr örnek için)	µl İnternal Standart (1ng/µl) (10 gr örnek için)
0	0	0	0	0	100
0.5	50	5	500	50	100
1	100	10	1000	100	100
1.5	150	15	1500	150	100
2	200	20	2000	200	100

7.3. Numune Analizi

1. Analize alınacak bal örneğinden 10 gr, 50 ml' lik behere tartılır ve baget ile karıştırılır.

Üzerine 10 ml su ve 10 ml aseton eklenir.

2.1100 rpm'de 2 dk ultratoraksda homojenize edilir.

3.Homojenize edilen karışım Extrelut NT20 kartuştan geçirilir ve 10 dakika kurumaya bırakılır.

4.Kuruma işleminden sonra Extrelut NT20 kartuştan 5x20 ml Diklorometan geçirilir ve eluat 250 ml'lik cam balona toplanır.

5.Toplanan eluat Rotary evaporatörde düşük basınçta ve 40°C altında uçurulur.

6.Uçurma işlemi sonrası balonun dibinde kalan kuru kalıntı; karbamat grubu insektisitler için 1 ml su ve asetonitril çözeltisi(1:1,V:V) ilavesiyle çözülür ve vialer alınarak HPLC-PCD cihazına

enjekte edilir. Organik klorlu, organik fosforlu ve pretroid grubu insektisitler için izooktan/aseton çözeltisi (4:1,V:V) çözeltisi ile çözümlenerek GK-ECD-FPD cihazına enjekte edilir

7.4. Cihaz Parametreleri

GC-ECD-FPD (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		60	2,0	2
Basamak 1	10	160	0,0	12,0
Basamak 2	2	260	10,0	72,0

Mode : Splitless	GC-ECD-FPD Kolon : HP-5
Akış Hızı : 1.50 mL/dk	Uzunluk : 30 m.
Gaz : Azot	Çapı : 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi : 1µL	Film Kalınlık : 0,25 µm

GC-MS(Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		70	2,0	2
Basamak 1	25	150	0,0	5,2
Basamak 2	3,0	200	0,0	21,87
Basamak 3	8,0	280	10,0	41,87

Mode : Splitless	GC-MS Kolon : HP-5MS
Akış Hızı : 1.0 mL/dk	Uzunluk : 30 m.
Gaz : Helyum	Çapı : 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi : 1µL	Film Kalınlık : 0,25 µm
Interface Sıcaklığı : 280 °C	İyonlaştırma Tipi :Elektron Impact
Enjektör Sıcaklığı : 250 °C	

HPLC Cihaz Şartları

Hareketli faz olarak metanol-su çözeltisi, türevlendirmede ise hidroliz reaktifi (950 ml) ve Ortotlalaldehit (OPA) reaktifi (950 ml) kullanılır.

HPLC Kolon :Karbamat Kolon C18 (15cm x 4.6mm id x 5mm, Pickering)	Metot Suresi :41 dakika
HPLC Koruyucu kolon: XDB-C8 4.6X12.5 mm Agilent	Enjeksiyon miktarı :20 ml
Akış Hızı :1 ml/dk	Dedektör parametreleri : Eksitasyon dalga boyu : 330nm Emisyon dalga boyu : 465nm

HPLC Mobil Faz Gradyent Programı

A:Su

B:Metanol

Zaman (dk)	A%	B%
0	85	15
0.5	85	15
28.5	30	70
28.6	0	100
33.5	0	100
33.6	85	15
41	85	15

Kolon Sonrası Türevlendirme (PCD)Sistemi

Analiz çözeltisi 1 (Hidroliz reaktifi : Pickering) Akış: 0.3 ml / dakika

Analiz çözeltisi 2 (Orto-ftalaldehit (OPA) çözeltisi: Pickering) Akış: 0.3 ml / dakika

HPLC kolon sıcaklığı: 42 °C

Reaksiyon sıcaklığı : 100 °C

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

1. Aranılan maddelerin standartları tek tek cihaza enjekte edilerek alıkonma zamanları belirlenir.
2. Her bir grup analizde sonuçların değerlendirilmesi için; GC-ECD-FPD/HPLC-PCD'ye sırasıyla standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü ve kör numune enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir.
3. Numune kromatogramı, standart kromatogramı ve pozitif (spike) numune kromatogramı ile karşılaştırılır ve aranılan maddelerin alıkonma zamanları kontrol edilir.
4. Her madde için 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, vb. düzeylerinde olacak şekilde standart madde eklenerek hazırlanan pozitif (spike) numuneler ile kör numune cihaza enjekte edilir.
5. Pozitif (spike) numuneler ile kör numunenin cihaz verilerinden konsantrasyona karşı pik alanın grafiği çizilerek en az beş noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.
6. Pozitif (spike) numune veya şüpheli numunenin konsantrasyonu, pik alanı değerinin kalibrasyon eğrisi kullanılarak ng/mL olarak hesaplanır.
7. Her bir analit için elde edilen değere validasyon raporunda hesaplanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri(U) \pm şeklinde eklenerek sonuçlar değerlendirilir.
8. GC-MS analizi için aranılan maddelerin standartları tek tek cihaza enjekte edilerek alıkonma zamanları, ana iyon ve diğer iyonları(en az üç iyon) belirlenir.
9. Sonra cihaza sırasıyla standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü ve kör numune enjekte edildikten sonra şüpheli numune enjekte edilir. Aranılan maddenin alıkonma zamanı, kromatogramdaki ana iyon ve diğer iyonlar (en az üç iyon) aşağıda verilen tablodaki şekli ile teyit edildikten sonra, şüpheli numune kromatogram/kütle spektrumu standart kromatogram/kütle spektrumu ve pozitif(spiked) numuneye ait kromatogram/kütle spektrumu ile karşılaştırılarak karar verilir.
10. 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır. Ayrıca Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik Kalite Kontrol Grafiği hazırlanır.

Tablo 2: Aranılan Maddelerin Ana İyon ve Parçalanma İyonları

Pestisidler	Tanımlanan iyonlar , m/z			
	Molekül ağırlığı	Q1	Q2	Q3
Diklorvos	220	109	15	185
Diazinon	304	179	137	152
Malatyon	330	173	127	125
Klorprifos	349	197	199	314
Kaumafos	362	109	97	362
Paration-Metil	263	263	109	125
Trifenilfosfat	326	325	77	65
Bromopropilat	426	341	339	343
Beta-Endosulfan	404	195	237	207
PCB 209	494	497	499	496
Sipermetrin I	415	181	163	165
Sipermetrin II	415	181	163	165
Sipermetrin III	415	163	181	165
Sipermetrin IV	415	163	181	165
Tau-fluvalinat I	250	252	209	181
Tau-fluvalinat II	250	252	209	181
Flumetrin	510,4	163	165	226

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Amendola G., Pelosi P., Cataldi L., Gregori E. and Dommarco R. (2006). Multiresidue Determination of Pesticides in Honey. 6th European Pesticide Residues Workshop on Pesticides in Food and Drink, EPRW. 21-25 May 2006. Corfu –GREECE
2. Kearney G., Alder L., Newton A., Klein J. (2003). A Multiresidue LC/MS/MS method for the determination of 81 Pesticides Residues in Fruit and Vegetables. Waters Application Note, Waters Corporation, Atlas Park, Manchester, UK

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni



BALDA AMİTRAZ VE METABOLİTLERİNİN GC-MS İLE TAYİNİ METODU

1 AMAÇ

Balda amitraz ve metabolitlerinin GC-MS sistemi ile analizlerinin yapılmasını amaçlar.

2 UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, ballarda Amitraz ve metabolitlerinin (2,4 Dimetil Anilin, N,2,4-Dimetilfenil-N'-Metilformamid) GC-MS sistemi ile analizini kapsar.

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

GC-MS : Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi

VKMAE : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

MRPL : Minimum Gerekli Performans Limiti

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

1. Katı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin asetonyril fazına geçmesi
2. Dispersive solid faz ekstraksiyon basamağı ile ekstraktın temizlenmesi
3. GC-MS ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- 1 GC-MS
- 2 Oto Enjektör
- 3 Vorteks
- 4 GC-MS Kolonu
- 5 Vial
- 6 Pipet ucu
- 7 Otomatik Pipet
- 8 Analitik terazi
- 9 Buzdolabı
- 10 Cam malzeme(beher,mezür)
- 11 Soğutmalı santrifüj
- 12 Çözücü süzme düzeneği

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Su (Ultra saf olarak üretilmiş)
2. Asetonyril (GK saflıkta)
3. Aseton ($\geq 99,8$ saflıkta)
4. Magnezyum sülfat ($\geq 98,0$ saflıkta)
5. Asetik asit (CH_3COOH) (99.6 analitik saflıkta)
6. Sodyum asetat ($\geq 99,0$ saflıkta)
7. PSA (Primer sekonder amin)
8. Helyum Gazı
9. Standart Maddeler (Amitraz, 2,4 Dimetil Anilin, N,2,4-Dimetilfenil-N²- Metilformamid)

7.2.1. Kullanılan Standart Çözeltiler

1. Standart ana stok çözeltisi: Amitraz ve N,2,4-Dimetilfenil-N'- Metilformamid için 10 ng/µl yoğunluğundaki Referans Standart çözeltiler kullanılır. 2,4 Dimetil Anilin için Yoğunluğu 0,98gr/ml olan 2,4 Dimetil Anilinden 10 µl alınarak üzerine 9790 µl aseton eklenerek 1000 ng/µl yoğunlukta 2,4 Dimetil Anilin ana stok çözeltisi hazırlanır.
2. Standart ara stok çözelti hazırlanması: 1000 ng/µl yoğunlukta 2,4 Dimetil Anilin ana stok çözeltisinden 100 µl alınır ve üzerine 9,9 ml aseton eklenerek 10 ng/µl yoğunluğunda 2,4 Dimetil Anilin ara stok çözeltisi hazırlanır.
3. Pozitif (Spike) numune hazırlanması: Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmaları için 10 ng/ml konsantrasyonunda standart çözeltilerden Tablo 1'de belirtildiği gibi sırasıyla 1MRPL, 1.5 MRPL, 2 MRPL, 2.5 MRPL seviyelerinde olacak şekilde standart ekimi yapılan bal numuneleri bir baget yardımı ile iyice karıştırılır ve 7.3 basamağından itibaren numune ekstraksiyonu işlemi uygulanır.

Tablo 1: Pozitif (Spike) numune hazırlanmak için ekimi yapılan standart miktarları.

MRPL	Konsantrasyon (ng/gr) Amitraz	Konsantrasyon (ng/gr) 2,4 Dimetil Anilin	Konsantrasyon (ng/gr) N,2,4-Dimetilfenil-N'- Metilformamid	Amitraz (10ng/µl) Standart çözeltisinden eklenen miktar(/µl) (10 gr örnek için)	N,2,4-Dimetilfenil-N'- metilformamid (10ng/µl) Standart çözeltisinden eklenen miktar(/µl) (10 gr örnek için)	2,4 Dimetil Anilin (10ng/µl) Standart çözeltisinden eklenen miktar(/µl) (10 gr örnek için)
0	0	0	0	0	0	0
1	200	200	200	2000	2000	2000
1.5	300	300	300	3000	3000	3000
2	400	400	400	4000	4000	4000
2.5	500	500	500	5000	5000	5000

7.3. Numune Analizi

1. 10 g bal numunesi 50 ml'lik cam santrifüj tüpüne konulur.
2. Üzerine 10 ml saf su ilave edilerek 1 dk vorteks ile karıştırılır.
3. Karışıma daha sonra 100 µl Asetik Asit, 10 ml Asetonitril, 4 g Magnezyum sülfat ve 1 g Sodyum Asetat eklenir.
4. Karışım 1 dk vorteks ile karıştırılır.
5. Daha sonra 3500 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edilir.

- Santrifüj sonunda üst fazdan 4 ml, içersinde 0,6 g Magnezyum sülfat ve 0,2 g PSA (Primer Sekonder Amin) bulunan 15 ml'lik cam tüpe aktarılır ve 30 sn vorteksle karıştırılır.
- Daha sonra karışım 3500 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda elde edilen üst faz 0.45 mikron filtreden geçirilip, vialde toplanır ve cihaza enjekte edilir.

7.4. Cihaz Parametreleri

GC-MS(Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C/dak.)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		70	2,0	2
Basamak 1	25	150	0,0	5,2
Basamak 2	3,0	200	0,0	21,87
Basamak 3	8,0	280	10,0	41,87

Mode : Splitless	GC-MS Kolon : HP-5MS
Akış Hızı : 2,3 mL/dk	Uzunluk : 30 m.
Gaz : Helyum	Çapı : 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi : 1µL	Film Kalınlık : 0,25 µm
Interface Sıcaklığı : 280 °C	İyonlaştırma Tipi :Elektron Impact
Enjeksiyon Sıcaklığı : 250 °C	Kütle Tarama Aralığı :91-149

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamaların Yapılması

- Aranan maddelerin standartları cihaza enjekte edilerek alıkonma zamanları, ana iyon ve diğer iyonlarla(3 iyon) belirlenir.
- Her analizde cihaza sırasıyla standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü, kör numune enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir.
- Aranan maddenin geliş zamanı, kromatogramdaki ana iyon ve diğer iyonlar (en az 3 iyon) aşağıda verilen tablodaki şekli ile teyit edildikten sonra şüpheli numune kromatogramı kütle spektrumu, standart ve pozitif (spike) numuneye ait kromatogram/kütle spektrumları ile karşılaştırılır.
- Her madde için 1, 1.5, 2, 2.5, 5 vb. MRPL düzeylerinde hazırlanan pozitif (spike) numuneler ile kör numune cihaza enjekte edilir.
- Pozitif (spike) numuneler ile kör numunenin cihaz datalarından konsantrasyona karşı pik alanının grafiği çizilerek en az 5 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.
- Pozitif (spike) numune veya şüpheli numunenin konsantrasyonu çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak ng/g olarak hesaplatılır.
- Her bir analiz için elde edilen değere validasyon raporunda hesaplanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri(U) ± şeklinde eklenerek sonuçlar değerlendirilir.
- 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır. Ayrıca Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik Kalite Kontrol Grafiği hazırlanır.

Tablo 2:Aranan Maddelerin Ana İyon ve Parçalanma İyonları

Madde adı	Ana İyon	Parçalanma iyonları
Amitraz	121	132,120,106
2,4 Dimetil Anilin	121	120,106,91
N,2,4-Dimetilfenil-N'Metilformamid	120	121,106,149

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Lehotay S.J. (2004). Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for Determining Pesticide Residues. FIFRA Fall Pesticide Analytical Workshop.

9.REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALIK VE KANATLI ETLERİNDE ORGANİK KLORLU İNSEKTİSİTLERİN GC-ECD İLE TAYİNİ METODU

1 AMAÇ

Balık ve kanatlı etlerinde organik klorlu insektisitlerin tespitini ve teyidinin yapılmasını amaçlar.

2 UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, hayvansal gıda olarak tüketilecek balık ve kanatlı etlerinde organik klorlu insektisitleri (alfa-HCH, heksaklorobenzen, heptaklor, aldrin, 4,4-DDE, 4,4- DDD, 4,4-DDT, 2,4 DDT, gama-HCH, beta-HCH) GC-ECD sistemi ile analizini kapsar.

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal maddeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılmaya kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

- GC-ECD : Gaz Kromatografi-Elektron Yakalayıcı Dedektör
GC-MS : Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi
VKMAE : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü
MRL : Maksimum Kalıntı Limiti

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

1. Pestisitlerin organik çözücü faza geçirilmesi
2. Organik çözücünden suyun uzaklaştırılması
3. Organik çözücünden yağın clean-up ile uzaklaştırılması
4. GC-ECD ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- 1 GC-ECD, GC-MS
- 2 Oto Enjektör
- 3 Vorteks
- 4 GC-ECD, GC-MS Kolonu
- 5 Vial
- 6 Santrifüj
- 7 Rotary evaporatör
- 8 Ultra torax
- 9 Pipet ucu
- 10 Otomatik Pipet
- 11 Analitik terazi
- 12 Buzdolabı
- 13 Cam malzeme(beher,mezür)
- 14 Helyum Gazı
- 15 Azot Gazı

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Petroleter
2. Benzen (% 99.5 saflıkta)
3. Sodyum sülfat (% 99.0 saflıkta)
4. Aseton (%99.8 saflıkta)
5. İzooktan (%99.5 saflıkta)
6. N-hekzan
7. Florosil (J. Baker)
8. Extrelut 1 kartuş (E.Merck)
9. Sülfürik asit (H_2SO_4 %95 saflıkta, dansite 1,84kg/l)

Standart Çözeltiler;

1. **Standart ana stok çözeltisi:** 10 ng/µl yoğunluğundaki Referans Standart çözeltiler kullanılmaktadır.
2. **Standart ara stok çözeltisi:** 10 ng/µl yoğunluğundaki Standart ana stok çözeltilerden 1ng/µl yoğunlukta olacak şekilde standart miks ara stok çözeltisi hazırlanır. Bu amaçla 1ng/µl yoğunlukta standart Miks 10 ana stok çözeltisi hazırlamak için her bir analite ait 10 ng/µl yoğunlukta standart ana stok çözeltilerden 500'er µl alınarak, 1ng/µl yoğunlukta 5 ml'lik standart miks 10 ara stok çözeltisi elde edilir.
3. **Internal standart ara stok çözeltisi:** 10 ng/µl'lik PCB 209 ana stok çözeltisinden 500 µl alınıp 4500 µl siklohekzan ile 5 ml'ye tamamlanarak 1 ng/µl'lik 5 ml internal standart ara stok çözeltisi hazırlanmıştır.
4. **Pozitif (Spike) numune:** Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmalarında 1ng/µl yoğunlukta hazırlanmış standart Miks 10 ara stok çözeltisinden tablo 1'de belirtildiği gibi sırasıyla 0,5MRL, 1,0MRL, 1,5MRL, 2,0MRL ve 5,0MRL düzeylerinde olacak şekilde standart ve ayrıca her seviyeye 1 ng/µl yoğunlukta internal standart (PCB 209) çözeltisinden 100 µl eklenir.

Tablo 1: Pozitif (Spike) numune hazırlanmak için ekimi yapılan standart ve internal standart miktarları

MRL	Miktar (ng/g)	µl Standart (1ng/µl)	µl İnternal Standart (1ng/µl)
0	0	0	100
0.5	5	50	100
1	10	100	100
1.5	15	150	100
2	20	200	100
5	50	500	100

7.3. Numune Analizi

1. Homojenize edilmiş balık ve kanatlı eti numunelerinden 10 g tartılarak 250 ml'lik bir santrifüj tüpüne koyulur ve üzerine 100 µl internal standart eklenerek 30 sn ultratoraks ile karıştırılır
2. Üzerine 100 ml petroleter aseton (1/1, V/V) karışımından ilave edilerek 9500 rpm'de 2 ultratoraksta homojenize edilir. Daha sonra santrifüj tüpü ultratoraksın altına konularak ultratoraks 5 ml petroleter ve aseton karışımıyla yıkanır ve yıkama karışımında santrifüj tüpüne toplanır.
3. Karışım 1600 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edilir. Organik çözücü fazı (üst faz), içerisine 25 gr sodyum sülfat konularak hazırlanmış olan (yaklaşık 6 cm, 200X200 mm id uzunluğundaki) cam kolondan geçirilir ve cam balona toplanır.
4. Santrifüj tüpündeki kalan kısım 50 ml lik petroleter ilavesi ile aynı şekilde birkez daha tekrar edilir ve Daha sonra cam kolon 3X5 ml petroleter ile yıkanır ve hepsi aynı balona toplanır.
5. Bir araya gelmiş karışım Rotary evaporatörde 40°C' de ve düşük basınçta uçurulur.
6. Hazırlanan 30cmx10mm teflon musluklu cam kolonlara 2.5 gr aktive edilmiş florosil doldurulur. üzerine 1 cm yüksekliğinde susuz sodyum sülfat konulur. Kolon 3x5 ml n- heksan-benzen (4/1) karışımı ile şartlandırılır.
7. Rotary evaporatörde uçurulduktan sonra cam balonda elde edilen kuru kalıntı 3x1 ml n-heksan ile çözdürülerek, şartlandırılmış olan florosil kolona eklenir.
8. Daha sonra florosil kolondan 30 ml (6x5 ml) n-heksan/benzen karışımı (4/1) geçirilerek bütün karışım cam balona toplanır.
9. Toplanan karışım Rotary evaporatörde 40°C' de düşük basınçta uçurulur.
10. Temizleme (Clean up) safhası: 1 ml H₂SO₄ dikkatlice extrelut NT1 kartuşa boşaltılır. 10 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Sonra uçurma balonundaki kuru kalıntıya 3x1 ml petroleter eklenir. Vortekslenir ve ekstrakt NT1 kartuştan geçirilir. NT1 kartuş 5 dakika oda şartlarında kurutulur. Sonra kartuşa 10 ml petroleter eklenerek temiz balona toplanır.
11. Karışım düşük basınçta ve 40°C sıcaklıkta uçurulur ve elde edilen kuru kalıntı 1ml isooktan ilavesiyle çözümlenerek vialer alınır ve çihaza enjekte edilir.

7.4. Cihaz Parametreleri

GC-ECD (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		60	2,0	2
Basamak 1	10	160	0,0	12,0
Basamak 2	2	260	10,0	72,0

Mode : Splitless	GC-ECD Kolon : DB-XLB
Akış Hızı : 1.50 mL/dk	Uzunluk : 30 m.
Gaz : Azot	Çapı : 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi : 1µL	Film Kalınlık : 0,25 µm

GC-MS(Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		70	2,0	2
Basamak 1	25	150	0,0	5,2
Basamak 2	3,0	200	0,0	21,87
Basamak 3	8,0	280	10,0	41,87
Mode : Splitless	GC-MS Kolon : HP-5MS			
Akış Hızı : 2,3 mL/dk	Uzunluk : 30 m.			
Gaz : Helyum	Çapı : 0,25 mm			
Enjeksiyon Hacmi : 1µL	Film Kalınlık : 0,25 µm			
Interface Sıcaklığı : 280 °C	İyonlaştırma Tipi :Elektron Impact			
Inlet Sıcaklığı : 250 °C				

7.5 Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

1. Her bir grup analizde sonuçların hesaplanması ve değerlendirilmesi için; GC-ECD'ye sırasıyla standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü ve kör numune enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir.
2. Numune kromatogramı ile standart kromatogramı ve pozitif (spike) numune kromatogramı karşılaştırılır ve geliş zamanları kontrol edilir. Her bir analit için Türk Gıda kodeksinde belirtilen MRL düzeyleri dikkate alınarak 0.5, 1.0, 1.5 ve 2,0 ve MRL düzeylerinde olacak şekilde standart madde eklenerek (Tablo 1 ve 2'è göre) hazırlanan pozitif (spike) numuneler ile kör numune cihaza enjekte edilir.
3. Kör numune ve pozitif (spike) numunelerin pik alanları ile internal standardın pik alanı oranlanıp derişim değerlerine karşı grafik çizilerek en az beş noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.
4. Pozitif (spike) numune veya şüpheli numunenin konsantrasyonu, çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak ng/g olarak hesaplatılır. Her bir analit için elde edilen değere validasyon raporunda hesaplanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri(U) ± şeklinde eklenerek sonuçlar değerlendirilir.
5. Pozitif bulunan sonuçlar GC-MS ile teyit edilir, autotune alınır.

6. Sonra cihaza standart enjeksiyonu yapılır ve cihazın analize hazır olduğu tespit edilir.
7. Daha sonra sırasıyla çözücü, standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü, kör numune ve pozitif şüpheli numune cihaza enjekte edilir.
8. Aranılan maddenin Tablo 3'de belirtilen geliş zamanı ve karakteristik iyonları (en az üç iyon), standart ve pozitif (spike) numune ile karşılaştırılır ve karar verilir.
9. 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

Tablo 2: Aranılan Maddelerin Ana İyon ve Parçalanma İyonları

Pestisidler	Geliş Zamanı (dk)	Tanımlanan iyonlar , m/z			
		Molekül ağırlığı	Q1	Q2	Q3
Alfa-HCH	12.414	288	181	183	219
Hexachlorobenzene	12.693	282	282	284	286
Heptachlor	17.201	370	270	272	274
Aldrin,	18.961	362	263	265	293
4'4 DDE	24.409	316	246	248	318
4'4 DDD	26.044	318	165	235	237
4'4 DDT	27.332	352	165	235	237
2'4 DDT	26.134	352	165	235	236
Gama-HCH	13.815	288	181	183	219
Beta-HCH	13.569	288	181	183	219
PCB 209	33.971	494	428	496	497

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Di Muccio, A., Attard Barbini, D., Generalli P., Pelosi, P., Stefanelli, P., Stefanelli, P., Amendola, G., Girolimetti, S.(1998).Methods for organochlorine pesticides and chlorobiphenyls residues in foods of animal origin in use pesticides residues. The Italian National Reference Laboratory (Pesticide Residues Section of the ISS - Istituto Superiore di Sanità National Institute of Health) Roma, 3 rd edition.Rev.

9.REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI ETİNDE PRETROID İNSEKTİSİTLERİN GC-ECD İLE TAYİNİ

1 AMAÇ

Kanatlı etlerinde Pretroid İnsektisitlerin tespitini ve teyidinin yapılmasını amaçlar.

2 UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, hayvansal gıda olarak tüketilecek kanatlılarda Pretroid İnsektisitleri (Sipermetrin, Deltametrin, Tetrametrin) GC-ECD sistemi ile analizini kapsar.

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal malzemeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

GC-ECD : Gaz Kromatografi-Elektron Yakalayıcı Dedektör

GC-MS : Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi

VKMAE : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

MRL : Maksimum Rezidü Limiti

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

1. Pestisitlerin organik çözücü faza geçirilmesi
2. Organik çözücünden suyun uzaklaştırılması
3. Dispersive katı faz ekstraksiyon ile clean-up yapılması
4. GC-ECD ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- 1 GC-ECD, GC-MS
- 2 Oto Enjektör
- 3 Vorteks
- 4 GC-ECD, GC-MS Kolonu
- 5 Vial
- 6 Santrifüj
- 7 Derin dondurucu
- 8 Pipet ucu
- 9 Otomatik Pipet
- 10 N₂ altında uçurma sistemi (Örnek yoğunlaştırıcı)
- 11 Analitik terazi
- 12 Buzdolabı
- 13 Cam malzeme (beher, mezür)
- 14 Helyum Gazı
- 15 Azot Gazı
- 16 Hidrojen Gazı
- 17 Kuru Hava

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Magnezyum sülfat (%99 saflıkta)
2. Su (Ultra saf olarak üretilmiş)
3. PSA (Primer sekonder amin) (Varian)
4. Sodyumasetat (% 99.0 saflıkta)
5. N-Hekzan (GC saflıkta)

6. Aseton (GC saflıkta)
7. Asetonitril (GC saflıkta)
8. Sikloheksan (GC saflıkta)
9. Asetik asit (CH_3COOH , Analitik saflıkta)

Standart Çözeltiler

1. Standart ana stok çözeltisi: 10ng/ μl yoğunluğundaki Referans Standart çözeltiler kullanılmaktadır.
2. Standart ara stok çözelti hazırlama: 10 ng/ μl 'lik Tetrametrin ana stok çözeltisinden 500 μl alınıp 4500 μl Sikloheksan ile 5 ml'ye tamamlanarak 1 ng/ μl 'lik 5 ml Tetrametrin standart ara stok çözeltisi hazırlanır. Kalan 2 standart için 10 ng/ μl yoğunluğundaki Standart ana stok çözeltilerden 1ng/ μl yoğunlukta olacak şekilde standart miks ara stok çözeltisi hazırlanır. Bu amaçla 1ng/ μl yoğunlukta standart Miks 2 ana stok çözeltisi hazırlamak için her bir analite ait 10 ng/ μl yoğunlukta standart ana stok çözeltilerden 500'er μl alınarak üzerine 4000 μl sikloheksan eklenip 1ng/ μl yoğunlukta standart miks 2 ara stok çözeltisi elde edilir.
3. Pozitif (Spike) numune hazırlanması: Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmalarında 1ng/ μl yoğunlukta hazırlanmış Tetramethrin ve standart Miks 2 ara stok çözeltisinden tablo 1'de belirtildiği gibi sırasıyla 0,5MRL, 1,0MRL, 1,5MRL, 2,0MRL düzeylerinde olacak şekilde ekim yapılan kanatlı numuneleri vorteks ile 30 sn karıştırılır ve 7.3. basamağından itibaren numune ekstraksiyonu işlemi uygulanır.

Tablo 1: Pozitif (Spike) numune hazırlanmak için ekimi yapılan standart miktarları.

MRL	Miktar (ng/g) Tetrametrin	Miktar (ng/g) Miks 2	μl Tetrametrin (1ng/ μl) (5 g örnek için)	μl miks 2 Standart (1ng/ μl) (5 g örnek için)
0	0	0	0	0
0.5	5	25	25	125
1	10	50	50	250
1.5	15	75	75	375
2	20	100	100	500

7.3. Numune Analizi

1. Homojenize edilmiş kanatlı numunesinden 5 g tartılarak 50 ml'lik bir santrifüj tüpüne koyulur. Üzerine 10 ml su ve 15 ml asetonitril eklenir.

2. Karışım 3 dk boyunca vorteksle karıştırılır.
3. Karışıma daha sonra 100 µl asetik asit ile 2 g Magnezyum sülfat ve 0,5 g Sodyum asetat eklenir.
4. Karışım 3 dk boyunca vorteksle karıştırılır.
5. Daha sonra 5000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edilir.
6. Santrifüj sonunda elde edilen üst faz cam tüpe alınır ve 40°C' de N₂ altında uçurma işlemi yapılır.
7. Cam tüpün dibinde kalan kuru kalıntı 5 ml aseton/N-hekzan (V:V, 1:9) karışımıyla çözülür.
8. Karışım 5 dk ultrasonik banyoda tutulur.
9. Üzerine 50 mg PSA ilave edilir. Ardından karışım 30 sn boyunca vorteksle karıştırılır.
10. Daha sonra 5000 rpm'de 1 dk süreyle santrifüj edilir.
11. Santrifüj sonunda üst faz 0.45 mikron filtreden geçirilip, vialle alınır ve cihaza enjekte edilir.

7.4. Cihaz Parametreleri

GC-ECD (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		60	2,0	2
Basamak 1	10	160	0,0	12,0
Basamak 2	2	260	10,0	72,0
Mode	: Splitless		GC-ECD Kolon : HP-5	
Akış Hızı	: 1.50 mL/dk		Uzunluk : 30 m.	
Gaz	: Azot		Çapı : 0,25 mm	
Enjeksiyon Hacmi	: 1µL		Film Kalınlık : 0,25 µm	

GC-MS (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		70	2,0	2
Basamak 1	25	150	0,0	5,2
Basamak 2	3,0	200	0,0	21,87
Basamak 3	8,0	280	10,0	41,87
Mode	: Splitless		GC-MS Kolon : HP-5MS	
Akış Hızı	: 2,3 mL/dk		Uzunluk : 30 m.	
Gaz	: Helyum		Çapı : 0,25 mm	
Enjeksiyon Hacmi	: 1µL		Film Kalınlık : 0,25 µm	
Interface Sıcaklığı	: 280 °C		İyonlaştırma Tipi :Elektron Impact	
Inlet Sıcaklığı	: 250 °C			

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi Ve Hesaplamanın Yapılması

1. Her bir grup analizde sonuçların hesaplanması ve değerlendirilmesi için; GC-ECD'ye sırasıyla standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü ve kör numune enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir.
2. Numune kromatogramı ile standart kromatogramı ve pozitif (spike) numune kromatogramı karşılaştırılır ve geliş zamanları kontrol edilir. Her bir analit için Türk Gıda kodeksinde belirtilen MRL düzeyleri dikkate alınarak 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 ve MRL düzeylerinde olacak şekilde standart madde eklenerek (Tablo 1'e göre) hazırlanan pozitif (spike) numuneler ile kör numune cihaza enjekte edilir.
3. Kör numune ve pozitif (spike) numunelerin pik alanları ile derişim değerlerine karşı grafik çizilerek en az beş noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.
4. Pozitif (spike) numune veya şüpheli numunenin konsantrasyonu, çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak ng/g olarak hesaplatılır. Her bir analit için elde edilen değere validasyon raporunda hesaplanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri(U) \pm şeklinde eklenerek sonuçlar değerlendirilir.
5. Pozitif bulunan sonuçlar GC-MS ile teyit edilir, autotune alınır.
6. Sonra cihaza standart enjeksiyonu yapılır ve cihazın analize hazır olduğu tespit edilir.
7. Daha sonra sırasıyla çözücü, standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü, kör numune ve pozitif şüpheli numune cihaza enjekte edilir.
8. Aranılan maddenin Tablo 3'de belirtilen geliş zamanı ve karakteristik iyonları (en az üç iyon), standart ve pozitif (spike) numune ile karşılaştırılır ve karar verilir.
9. 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

Tablo 2: Aranılan Maddelerin Ana İyon ve Parçalanma İyonları

Pestisidler	Tanımlanan iyonlar , m/z			
	Molekül ağırlığı	Q1	Q2	Q3
Sipermetrin I	415	181	163	165
Sipermetrin II	415	181	163	165
Sipermetrin III	415	163	181	165
Sipermetrin IV	415	163	181	165
Tau-fluvalinat I	250	252	209	181
Tau-fluvalinat II	250	252	209	181
Flumetrim	510,4	163	165	226



8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Lehotay. (2007) S.J. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Excartion and Prationing with Magnesium Sulfate Collaborative Study. J.AOAC İnt.90:485

9.REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

ÇİĞ SÜTTE ORGANİK FOSFORLU İNSEKTİSİTLERİN GC-FPD İLE TAYİNİ METODU

1. AMAÇ

Çiğ sütte organik fosforlu insektisitlerin GC-FPD ile analizlerinin yapılmasını amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, hayvansal gıda olarak tüketilecek çiğ sütlerde organik fosforlu insektisitlerin (Malatyon, Diazinon, Triklorfon) GC-FPD sistemi ile analizini kapsar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal maddeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizini gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

GC-FPD : Gaz Kromatografi-Alev Fotometrik Dedektör

GC-MS : Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometre

PSA : Primer Sekonder Amin

VKMAE : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

MRL : Maksimum Kalıntı Limiti

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

1. Analit asetonitril fazına geçirilir.
2. Magnezyum sülfat ilavesiyle ortamdan su uzaklaştırılır.
3. PSA eklenerek yağın ortamdan uzaklaşması sağlanır.
4. GC-FPD ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. GC-FPD
2. GC-MS
3. Vorteks
4. Vial
5. Santrifüj
6. Örnek yoğunlaştırıcı
7. Manifold ve vakum pompası
8. Buzdolabı
9. Dispensör
10. Otomatik Pipet
11. Analitik Terazî
12. Santrifüj tüpü

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Asetonitril
2. N-hekzan
3. Siklohekzan
4. Aseton
5. Sodyum sülfat
6. Magnezyum sülfat
7. Sodyum klorür

8. PSA(Primer Sekonder Amin)
9. Filtre amaçlı (Extract clean) kolon
10. Standart Maddeler (Malatyon, Diazinon, Triklorfon)

Çözeltiler;

Aseton/Hekzan(1:1): 100 ml'lik erlene mezür kullanılarak 50 ml aseton ve 50 ml hekzan katılarak elle çalkalanır.

Standart Çözeltiler;

1. **Standart ana stok çözelti:** 10 ng/µl yoğunluğundaki Referans Standart çözeltiler kullanılmaktadır.
2. **Standart ara stok çözelti:** 10 ng/µl yoğunluğundaki Standart ana stok çözeltilerden 1 ng/µl yoğunlukta olacak şekilde standart ara stok çözelti hazırlanır. Bu amaçla 1 ng/µl yoğunlukta standart Miks 3 ara stok çözeltisi hazırlamak için her bir analite ait 10 ng/µl yoğunlukta standart ana stok çözeltilerden 500'er µl alınarak üzerine 3500 µl siklohekzan eklenip 1 ng/µl yoğunlukta standart Miks 3 ara stok çözelti elde edilir.
3. **İnternal standart ara stok çözelti:** 10 ng/µl'lik Trifenilfosfat ana stok çözeltisinden 500 µl alınıp 4500 µl asetonitril ile 5 ml'ye tamamlanarak 1 ng/µl yoğunluğunda 5 ml internal standart ara stok çözeltisi hazırlanır.
4. **Pozitif (Spike) numune:** Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmalarında 1 ng/µl yoğunlukta hazırlanmış standart Miks 3 ara stok çözeltisinden tablo 1'de belirtildiği gibi sırasıyla 0,5MRL, 1,0MRL, 1,5MRL, 2,0MRL ve 5,0MRL düzeylerinde olacak şekilde standart ve ayrıca her seviyeye 1 ng/µl yoğunlukta internal standart(Trifenilfosfat) çözeltisinden 150 µl eklenen çiğ süt numuneleri vorteks ile 30 sn. karıştırılarak 7.3 basamağından itibaren ekstraksiyon işlemi uygulanır.

Tablo. 1 Pozitif (Spike) numune hazırlamak için ekimi yapılan standart miktarları

MRL	Konsantrasyon (ng/ml) Diazinon/Malation/ Triklorfon	Diazinon/Malation/ Triklorfon (1ng/µl) (15 g örnek için)	Trifenilfosfat(IS) (1ng/µl) (15 g örnek için)
0	0	0 µl	150 µl
0.5	5	75 µl	150 µl
1	10	150 µl	150 µl
1.5	15	225 µl	150 µl
2	20	300 µl	150 µl
5	50	750 µl	150 µl

7.3. Numune Analizi

1. 15 ml çiğ süt numunesi cam pipet yardımı ile 50 ml'lik plastik santrifüj tüpüne alınır. Üzerine 150 µl internal standart ilave edilip 30 sn vorteks ile karıştırılır.
2. Üzerine 15 ml asetonitril ve 6 g magnezyum sülfat ilave edilerek tekrar 30 sn. vortekslenir ve 3500 rpmde 5 dk süreyle santrifüj edilir.
3. Santrifüj sonrası elde edilen karışıma 4 g sodyum klorür eklenip vorteks yardımıyla tekrar karıştırılır ve santrifüj aşaması tekrar edilir.
4. 0,5 g PSA ve 2,5 g sodyum sülfat ilave edilerek hazırlanan 13 ml hacmindeki filtre amaçlı kolon 5 ml asetonitril ile şartlandırılır.
5. Şartlandırılmış kolonun altına deney tüpü yerleştirilerek santrifüj sonrasında elde edilen üsteki sıvı faz kolondan geçirilir ve kolon 5 ml asetonitril ile yıkanır.
6. Deney tüpünde toplanan çözelti azot altında 40°C'de uçurulur ve elde edilen kuru kalıntı 200 µL aseton:hekzan(1:1) karışımı ile çözülerek vial e alınır ve cihaza enjekte edilir.

7.4. Cihaz Parametreleri

GC-FPD (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C/dak.)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		60	2,0	2
Basamak 1	10	160	0,0	12,0
Basamak 2	2	260	10,0	72,0

Mode	: Splitless	GC-FPD Kolon	: HP-5
Akış Hızı	: 2,4 mL/dk	Uzunluk	: 30 m.
Gaz	: Azot	Çapı	: 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi	: 1 µL	Film Kalınlık	: 0,25 µm
Inlet Sıcaklığı	: 250 °C		

GC-MS (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C/dak.)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		70	2,0	2
Basamak 1	25	150	0,0	5,2
Basamak 2	3,0	200	0,0	21,87
Basamak 3	8,0	280	10,0	41,87

Mode : Splitless	GC-MS Kolon : HP-5MS
Akış Hızı : 2,3 mL/dk	Uzunluk : 30 m.
Gaz : Helyum	Çapı : 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi : 1µL	Film Kalınlık : 0,25 µm
Interface Sıcaklığı : 280 °C	İyonlaştırma Tipi : Elektron Impact
Inlet Sıcaklığı : 250 °C	

Tablo 2. Aranılan Maddelerin Ana İyon ve Parçalanma İyonları

Analit	Tanımlanan iyonlar(Q) , m/z			
	Molekül ağırlığı(g/mol)	Q1	Q2	Q3
Triklorfon	257,40	93	109	145
Diazinon	304,35	137	152	179
Malation	330,36	125	127	173

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamaların Yapılması

1. Her bir grup analizde sonuçların hesaplanması ve değerlendirilmesi için; GC-FPD'ye sırasıyla standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü ve kör numune enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir.
2. Numune kromatogramı ile standart kromatogramı ve pozitif (spike) numune kromatogramı karşılaştırılır ve geliş zamanları kontrol edilir. Her bir analit için Türk Gıda kodeksinde belirtilen MRL düzeyleri dikkate alınarak 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 ve MRL düzeylerinde olacak şekilde standart madde eklenerek hazırlanan pozitif (spike) numuneler ile kör numune cihaza enjekte edilir.
3. Kör numune ve pozitif (spike) numunelerin pik alanları ile internal standardın pik alanı oranlanıp derişim değerlerine karşı grafik çizilerek en az beş noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.
4. Pozitif (spike) numune veya şüpheli numunenin konsantrasyonu, çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak ng/mL olarak hesaplanır. Her bir analit için elde edilen değere validasyon raporunda hesaplanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri(U) ± şeklinde eklenerek sonuçlar değerlendirilir.
5. Pozitif bulunan sonuçlar GC-MS ile teyit edilir, autotune alınır.
6. Cihaza standart enjeksiyonu yapılır ve cihazın analize hazır olduğu tespit edilir.
7. Daha sonra sırasıyla çözücü, standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü, kör numune ve pozitif şüpheli numune cihaza enjekte edilir.
8. Aranılan maddelerin geliş zamanı ve karakteristik iyonları (en az üç iyon), standart ve pozitif (spike) numune ile karşılaştırılır ve karar verilir.
9. 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır. Ayrıca Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik Kalite Kontrol Grafiği hazırlanır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Antignac J.P., Bizec B.L., Monteau F.,Andre F. (2003). Validation of Analtical Methods Based on Mass Spectrometric detection According to the “2002/657/EC” European Decision Guideline and Application. Analytica Chimica Actra. 483: 325-334.
2. Lehotay S.L., Mastovska K. (2005). Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticides Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. Journal of AOAC İnt.88: 630-638.
3. Zwir-Ferenc A.Biziuk M. (2006).Solid Phase Extraction Technique-Trends, Opportunities and Application. Polish J.of Environ.Stud.15: 677-690.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI PLAZMASINDA ANABOLİK HORMONLARIN GC-MS İLE TAYİNİ METODU

1 AMAÇ

Kanatlı plazmasında anabolik hormon kalıntılarının (stilbenler, steroidler, zearanol ve metabolitleri) GC-MS sistemi ile analiz edilmesini amaçlar.

2 UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, hayvansal gıda olarak tüketilecek kanatlı hayvan plazmasındaki anabolik hormonların(17 beta estradiol, 17 alfa estradiol, progesteron, testesteron, dietilstilbestrol, dienestrol, hekzestrol, zearalanone, zearalenone, α -zearalanol, β - zearalanol, α -zearalenol, β - zearalenol) GC-MS sistemi ile analizini kapsar.

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal maddeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi “Numune Kabul Talimatı” esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

GC- MS : Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometre

VKMAE : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

MRPL : Minimum Gerekli Performans Limiti

TBME : Tersiyer Bütil Metil Eter

BSTFA+TMCS: (N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) + (Trimethylchlorosilane)

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

1. Analitin eter fazına geçmesi
2. Heptan uygulanarak yağın ortamdan uzaklaşması sağlanır.
3. Katı faz ekstraksiyonu uygulanarak analit safsızlıklardan ayrıştırılır.
4. BSTFA+TMCS ilavesiyle analit uçucu forma getirilir.
5. GC-MS ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. GC-MS
2. Vorteks
3. Etüv
4. Vial
5. Santrifüj
6. Örnek yoğunlaştırıcı
7. Türevlendirme tüpü
8. PH metre
9. Çalkalayıcı
10. Manifold ve vakum pompası
11. Derin dondurucu
12. Buzdolabı
13. Dispensır
14. Otomatik Pipet
15. Analitik Terazı
16. Santrifüj tüpü

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Metanol (GC saflıkta)
2. İsooctan (GC saflıkta)
3. TBME (Tersiyer Bütil Metil Eter)
4. Heptan
5. BSTFA+TMCS (N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) + (Trimethylchlorosilane)
6. Sodyum asetat
7. Glasiyel asetik asit (%100)
8. Distile su
9. Etanol (GC saflıkta)
10. Petrol eter
11. Standart Maddeler (17 Beta Estradiol, 17 Alfa Estradiol, Progesteron, Testesteron, Dietilstilbestrol, Dienestrol, Hekzestrol, Zearalanone, Zearalenone, α -Zearalanol, β - Zearalanol, α -Zearalenol, β - Zearalenol)
12. Azot gazı
13. Helyum gazı
14. C 18 kartuş (500mg, 6ml)

Çözeltiler;

1. 2M Asetat Tamponu (PH 5,2) Hazırlama:129,5 g sodyum asetat tartılır. Üzerine 25,2g asetik asit eklenir. 800 ml distile suda çözülür. PH:5,2 \pm 0,1 olacak şekilde asetik asit ilavesi yapılır. PH metreyle PH kontrolü yapılır. Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.
2. TBME/Petrol Eteri (30/70) Karışımı Hazırlama: 100 ml'lik erlene mezür kullanılarak 30 ml TBME ve 70 ml Petrol eter katılarak elle çalkalanır.
3. Metanol/su (1/1) Karışımı Hazırlama: 100 ml'lik erlene mezür kullanılarak 50 ml metanol ve 50 ml distile su katılarak elle çalkalanır.

Standart Çözeltiler;

1. Standart ana stok çözelti hazırlama: Analiz edilecek her bir analit için toz halindeki standart maddeden 10 mg hassas terazide tartılır. Daha sonra koyu renkli şişe içerisinde 10 ml etanol yardımıyla çözülür. Oluşan çözelti 1000 μ g/ml'lik ana stok çözeltisidir.
2. Standart ara stok çözelti hazırlama: Her bir analit için hazırlanan 1000 μ g/ml'lik ana stok çözeltisinden 1ml alınarak 9 ml etanol yardımıyla toplam hacim 10 ml olacak şekilde yeni bir ara stok çözelti elde edilir. Oluşan çözelti 100 μ g/ml'lik ara stok çözeltisidir.Bu şekilde seyreltmeler yapılarak 10 μ g/ml, 1 μ g/ml ve 100 ng/ml ara stok çözeltileri hazırlanır.

3. Pozitif numune (Spike) hazırlanması : Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmalarında analiz edilecek her bir analit için ayrı ayrı hazırlanmış 100 ng/ml konsantrasyonunda standart ara stok çözeltilerinden sırasıyla 1MRPL, 1,5 MRPL, 2MRPL, 2,5 MRPL, 5 MRPL düzeylerinde olacak şekilde aşağıdaki tabloya (Tablo 1) uygun standart eklenen plazma numuneleri vorteksle 30 sn karıştırılarak homojenize edilir ve numune ekstraksiyonu basamağında 7.3 maddesinden itibaren ekstraksiyon işlemi uygulanır.

Tablo 1: Plazma numunelerine (1 ml) ekimi yapılan standart miktarları

MRPL Düzeyleri	Konsantrasyon Düzeyleri (ng/ml)	100 ng/ml'lik ara stok çözeltilisinden eklenen miktar(µl)
0	0	0
1	2	20
1,5	3	30
2	4	40
2,5	5	50
5	10	100

7.3. Numunenin Analizi

- 1 ml plazma numunesi cam santrifüj tüpüne konulur.
- Üzerine 1 ml 2M asetat tamponu (PH:5,2) ilave edilir ve vorteks yapılır.
- 5 ml TBME/Petrol eteri (30/70) karışımı ilave edilir. 10 dk çalkalayıcıda çalkalanır. 000 devirde 5 dk santrifüj edilir.
- Karışım 2 saat derin dondurucuda (-17°C/-27°C) bekletilir.
- Eter kısmı temiz bir tüpe alınır ve 50 °C'de Azot altında buharlaştırılır.
- Kuru kalıntı 5 ml metanol/su (1/1) ile çözülür. Üzerine 1 ml heptan ilave edilerek 30 sn vortekslenir ve 5 dk 3000 devirde santrifüj yapılır. Heptan kısmı atılır. (Heptan aşaması iki kez tekrarlanır.)
- C18 kolonu sırasıyla 5 ml metanol ve 5 ml su ile şartlandırılır.
- 5 ml metanol/su (1/1) ile çözülmüş kalıntı kolondan geçirilir.
- 2 ml metanol/su (1/1) ile kolon yıkanır.
- 2 ml metanol ile elusyon yapılır.
- Eluat 50 °C'de azot altında buharlaştırılır. Kuru kalıntı 0,5 ml metanol ile vortekslenerek çözülür ve türevlendirme tüplerine aktarılır. 50 °C'de azot altında tekrar buharlaştırılır.
- Kuru kalıntıya 0.1 ml BSTFA+TMCS ilave edilir ve vortekslenir. 60 °C'de 1 saat etüvde türevlendirilir.
- 50 °C'de azot altında buharlaştırılır. Kuru kalıntı 25 µl isooctan ile vortekslenerek çözülür ve vialerine aktarılır.
- GC-MS cihazına enjeksiyon yapılır.

7.4. Cihaz Parametreleri

GC-MS(Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı/dak. (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		90	1	1
Basamak 1	20	250	21	30

Mode	: Splitless	GC-MS Kolon	: HP-5MS
Akış Hızı	: 1.0 mL/dk	Uzunluk	: 30 m.
Gaz	: Helyum	Çapı	: 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi	: 2µL	Film Kalınlık	: 0,25 µm
Enjektör Sıcaklığı	:230 C	İyonlaştırma Tipi	:Elektron Impact(EI)
İnterface Sıcaklığı	:280 C	Kütle Tarama Aralığı	:124-416

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

1. Aranılan maddelerin standartları cihaza enjekte edilerek alıkonma zamanları, ana iyon ve diğer iyonlarla belirlenir.
2. Her analizde cihaza sırasıyla standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü, kör numune enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir.
3. Aranılan maddenin geliş zamanı, kromatogramdaki ana iyon ve diğer iyonlar (en az 3 iyon) aşağıda verilen tablodaki şekli ile teyit edildikten sonra şüpheli numune kromatogramı kütle spektrumu, standart ve pozitif (spike) numuneye ait kromatogram/kütle spektrumları ile karşılaştırılır.
4. Her madde için 1, 1.5, 2, 2.5, 5 MRPL düzeylerinde hazırlanan pozitif (spike) numuneler ile kör numune cihaza enjekte edilir.
5. Pozitif (spike) numuneler ile kör numunenin cihaz datalarından konsantrasyona karşı pik alanının grafiği çizilerek en az 5 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.
6. Pozitif (spike) numune veya şüpheli numunenin konsantrasyonu çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak ng/mL olarak hesaplanır.
7. Her bir analit için elde edilen değere validasyon raporunda hesaplanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri(U) ± şeklinde eklenerek sonuçlar değerlendirilir.
8. 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır. Ayrıca Analiz kalitesinin kontrolü için her bir analite yönelik Kalite Kontrol Grafiği hazırlanır.

Tablo 2: Aranan Maddelerin Ana İyon ve Parçalanma İyonları

Anabolik madde adı	Ana İyon	Parçalanma iyonları
17beta-Estradiol	416	285,326,232
17alfa-Estradiol	416	285,326,232
Testesteron	360	345,270,226
Progesteron	314	272,229,124
Dietilstilbestrol	412	397,383,191
Dienestrol	410	395,381,245
Hekzestrol	207	399,163,179
Zearalanone	307	335,450,449,260
Zearalenone	260	305,462,333,151
α -Zearalanol	538	523,335,307,433
β - Zearalanol	538	523,335,307,433
α -Zearalenol	446	333,536,305,260
β - Zearalenol	446	333,536,305,260

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon.(1996).Council Directive 96/23 of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues there of in live animals and animal products. off. J. Europ. Comm. L125, 10-31.
2. Anon.(1995)SOP ARO/405,RİVM.Analysis of bovine serum for 17 β -estradiol with GC-MS.
3. Dickson L.C., Macneil J.D.,Reid J., Fesser A.C.E.(2003).Validation of screening method for residues of diethylstilbestrol, dienestrol, hexestrol and zeranol in bovine urine using immunoaffinity chromatography and gas chromatography/mass spectrometry, Journal of AOAC, 86:631-639
4. Herbold, H.A., Sterk,S.S., Stephany,R.W., van Ginkel, L.A. (1997) Multi residue method using coupled column HPLC and GC-MS for determination of anabolic compounds in samples of urine. RIVM, Bilthoven - The Netherlands, ARO SOP nr. 401

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALIK DOKUSUNDA POLİKLORBİFENİLLERİN GC-ECD İLE TAYİNİ METODU

1 AMAÇ

Balık dokusunda poliklorbifenillerin tespitini ve teyidinin yapılmasını amaçlar.

2 UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, hayvansal gıda olarak tüketilecek balıklarda poliklorbifenillerin (PCB 28, 30, 52, 101, 118, 153, 180) GC-ECD sistemi ile analizini kapsar.

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal maddeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılana kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslar arası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

GC-ECD : Gaz Kromatografi-Elektron Yakalayıcı Dedektör

GC-MS : Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi

VKMAE : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

MRL : Maksimum Kalıntı Limiti

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

1. Pestisitlerin organik çözücü faza geçirilmesi
2. Organik çözücünden suyun uzaklaştırılması
3. Katı faz ekstraksiyon ile yağın uzaklaştırılması
4. GC-ECD ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- 1 GC-ECD, GC-MS
- 2 Oto Enjektör
- 3 Vorteks
- 4 GC-ECD, GC-MS Kolonu
- 5 Vial
- 6 Santrifüj
- 7 Vakum manifold
- 8 Pipet ucu
- 9 Otomatik Pipet
- 10 Analitik terazi
- 11 Buzdolabı
- 12 Cam malzeme (beher, mezür)
- 13 Helyum Gazı
- 14 Azot Gazı

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Magnezyum sülfat (%99.8 saflıkta)
2. PSA (Primer sekonder amin) (Varian)
3. Sodyumasetat (% 99.0 saflıkta)
4. Heptan (GC saflıkta)
5. İsooctan (%99.5 saflıkta)
6. C18 kolon /Alltech)

Standart Çözeltiler;

- 1. Standart ana stok çözeltisi:** 10 ng/µl yoğunluğundaki Referans Standart çözeltiler kullanılmaktadır.
- 2. Standart ara stok çözeltisi:** 10 ng/µl yoğunluğundaki Standart ana stok çözeltilerden 1ng/µl yoğunlukta olacak şekilde standart miks ara stok çözeltisi hazırlanır. Bu amaçla 1ng/µl yoğunlukta standart Miks 10 ana stok çözeltisi hazırlamak için her bir analite ait 10 ng/µl yoğunlukta standart ana stok çözeltilerden 500'er µl alınarak, 1ng/µl yoğunlukta 5 ml'lik standart miks 10 ara stok çözeltisi elde edilir.
- 3. Internal standart ara stok çözeltisi:** 10 ng/µl'lik PCB 209 ana stok çözeltisinden 500 µl alınıp 4500 µl sikloheksan ile 5 ml'ye tamamlanarak 1 ng/µl'lik 5 ml internal standart ara stok çözeltisi hazırlanmıştır.
- 4. Pozitif (Spike) numune:** Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmalarında 1ng/µl yoğunlukta hazırlanmış standart Miks 10 ara stok çözeltisinden tablo 1'de belirtildiği gibi sırasıyla 0,5MRL, 1,0MRL, 1,5MRL, 2,0MRL ve 5,0MRL düzeylerinde olacak şekilde standart ve ayrıca her seviyeye 1 ng/µl yoğunlukta internal standart (PCB 209) çözeltisinden 100 µl eklenir.

Tablo 1: Pozitif (Spike) numune hazırlanmak için ekimi yapılan standart ve internal standart miktarları

MRL	Miktar (ng/g)	µl Standart (1ng/µl)	µl İnternal Standart (1ng/µl)
0	0	0	100
0.5	5	50	100
1	10	100	100
1.5	15	150	100
2	20	200	100
5	50	500	100

7.3. Numune Analizi

- Homojenize edilmiş balık numunesinden 10 g tartılarak 50 ml'lik bir santrifüj tüpüne koyulur ve üzerine 100 µl internal standart ilave edilip 30 sn vorteks ile karıştırılır.
- Karışımın üzerine 4 gr Magnezyum sülfat (500 °C'de bir gece bekletilmiş) 1 gr sodyum asetat ve 10 ml Heptan eklendikten sonra tüpün ağzı sıkıca kapatılarak 1 dk elle çalkalanır.
- Karışım 3500 rpm'de 3 dk santrifüj edilir.
- C18 kolonunun üzerine 350 mg PSA ve 1cm olacak şekilde Magnezyum sülfat ilave edilerek hazırlanan kolon vakum manifold cihazına yerleştirilir ve 2x5 ml heptan ile şartlandırılır. Daha sonra vakum manifoldun alt kısmına cam tüpler yerleştirilir.
- Santrifüj sonrası elde edilen üst faz C18 kolonundan geçirilerek cam tüplerde toplanır ve viallere alınarak cihaza enjekte edilir.

7.4. Cihaz Parametreleri

GC-ECD (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		60	2,0	2
Basamak 1	10	160	0,0	12,0
Basamak 2	2	260	10,0	72,0
Mode	: Splitless	GC-ECD Kolon : DB-XLB		
Akış Hızı	: 1.50 mL/dk	Uzunluk : 30 m.		
Gaz	: Azot	Çapı : 0,25 mm		
Enjeksiyon Hacmi	: 1µL	Film Kalınlık : 0,25 µm		

GC-MS(Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		70	2,0	2
Basamak 1	25	150	0,0	5,2
Basamak 2	3,0	200	0,0	21,87
Basamak 3	8,0	280	10,0	41,87
Mode	: Splitless	GC-MS Kolon : HP-5MS		
Akış Hızı	: 2,3 mL/dk	Uzunluk : 30 m.		
Gaz	: Helyum	Çapı : 0,25 mm		
Enjeksiyon Hacmi	: 1µL	Film Kalınlık : 0,25 µm		
Interface Sıcaklığı	: 280 °C	İyonlaştırma Tipi :Elektron Impact		
Inlet Sıcaklığı	: 250 °C			

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

1. Her bir grup analizde sonuçların hesaplanması ve değerlendirilmesi için; GC-ECD'ye sırasıyla standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü ve kör numune enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir.
2. Numune kromatogramı ile standart kromatogramı ve pozitif (spike) numune kromatogramı karşılaştırılır ve geliş zamanları kontrol edilir. Her bir analit için Türk Gıda kodeksinde belirtilen MRL düzeyleri dikkate alınarak 0.5, 1.0, 1.5 ve 2,0 ve MRL düzeylerinde olacak şekilde standart madde eklenerek (Tablo 1'e göre) hazırlanan pozitif (spike) numuneler ile kör numune cihaza enjekte edilir.
3. Kör numune ve pozitif (spike) numunelerin pik alanları ile internal standardın pik alanı oranlanıp

derişim değerlerine karşı grafik çizilerek en az beş noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.

4. Pozitif (spike) numune veya şüpheli numunenin konsantrasyonu, çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak ng/g olarak hesaplatılır. Her bir analit için elde edilen değere validasyon raporunda hesaplanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri(U) \pm şeklinde eklenerek sonuçlar değerlendirilir.
5. Pozitif bulunan sonuçlar GC-MS ile teyit edilir, autotune alınır.
6. Sonra cihaza standart enjeksiyonu yapılır ve cihazın analize hazır olduğu tespit edilir.
7. Daha sonra sırasıyla çözücü, standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü, kör numune ve pozitif şüpheli numune cihaza enjekte edilir.
8. Aran maddenin Tablo 2' de belirtilen geliş zamanı ve karakteristik iyonları (en az üç iyon), standart ve pozitif (spike) numune ile karşılaştırılır ve karar verilir.
9. 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

Tablo2: Aran maddelerin Ana İyon ve Parçalanma İyonları

Pestisidler	Geliş Zamanı (dk)	Tanımlanan iyonlar , m/z			
		Molekül ağırlığı	Q1	Q2	Q3
PCB 30	257	256	186	150	PCB 30
PCB 28	257	256	186	150	PCB 28
PCB 52	290	292	220	255	PCB 52
PCB101	324	326	254	324	PCB101
PCB 118	324	326	254	218	PCB 118
PCB 153	358	360	290	252	PCB 153
PCB 180	392	252	324	394	PCB 180

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Lehotay S.J., Mastovska K.(2005).Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticides Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. Journal of AOAC İnt,88, No. 2
2. Lehotay S.J. (2005).Validation of Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. Journal of AOAC İnt.88: 595

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

ÇİĞ SÜTTE ORGANİK KLORLU İNSEKTİSİTLERİN GC-ECD İLE TAYİNİ METODU

1. AMAÇ

Çiğ sütte organik klorlu insektisitlerin GC-ECD sistemi ile analizinin yapılmasını amaçlar.

2. UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu organik klorlu insektisitlerin (alfa-HCH, heksaklorobenzen, aldrin, gama-HCH, Beta-HCH, 2,4-DDT, 4,4-DDE, 4,4-DDD, 4,4-DDT) GC-ECD sistemi ile analizini kapsar.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal maddeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılan kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5.KISALTMALAR/TANIMLAR

GC-ECD : Gaz Kromatografi-Elektron Yakalayıcı Dedektör

GC-MS : Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometre

VKMAE : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

MRL : Maksimum Kalıntı Limiti

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

1. Analitler aseton fazına geçmesi.
2. Magnezyum sülfat ilavesiyle ortamdan su uzaklaşması.
3. Ortama benzen-pentan eklenmesi.
4. Florisil ile matrikler temizlenmesi.
5. GC-ECD ile analizin yapılması.

7. TEST METODUNUN TANIMI:

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

1. GC-ECD
2. GC-MS
3. Vorteks
4. Vial
5. Santrifüj
6. Örnek yoğunlaştırıcı
7. Manifold ve vakum pompası
8. Buzdolabı
9. Dispensör
10. Otomatik Pipet
11. Analitik Terazî
12. Santrifüj tüpü

7.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. N-pentan
2. Sikloheksan
3. Aseton
4. Benzen
5. Magnezyum sülfat
6. İsooktan
7. Florisil
8. Filtre amaçlı (Extract clean) kolon

Standart Maddeler (Alfa-HCH (alfa-hekzaklorosikloheksan), Hekzaklorobenzen, Aldrin, Gama-HCH (gama-hekzaklorosikloheksan), Beta-HCH (beta-hekzaklorosikloheksan) , 2,4-DDT (o,p-DDT), 4,4-DDE (p,p-DDE), 4,4-DDD (p,p-DDD), 4,4-DDT (p,p-DDT)

Çözeltiler;

1. Benzen/n-Pentan(30:70): 100 ml'lik erlene mezür kullanılarak 30 ml benzen ve 70 ml n-pentan katılarak elle çalkalanır.

Standart Çözeltiler;

- Standart ana stok çözeltisi:**10 ng/µl yoğunluğundaki Referans Standart çözeltiler kullanılmaktadır.
- Standart ara stok çözeltisi:** Miks ara stok çözeltisi hazırlamak için Alfa-HCH, Gama-HCH, Hekzaklorobenzen, Aldrin, Beta-HCH, 2,4-DDT, 4,4-DDT, 4,4-DDD ve 4,4-DDE'nin 10 ng/µl'lik ana stok çözeltilerinden sırasıyla 40, 100, 100, 30, 30, 100, 100, 100 ve 100 µL alınıp 300 µL sikloheksan ile 1,0 mL'ye tamamlanır.
- Internal standart ara stok çözeltisi:** 10 ng/µl'lik PCB 209 ana stok çözeltisinden 1 ml alınıp 9 ml sikloheksan ile 10 ml'ye tamamlanarak 1 ng/µl'lik 10 ml internal standart ara stok çözeltisi hazırlanır.
- Pozitif (Spike) numune:** Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmalarında Miks ara stok çözeltisinden tablo 1'de belirtildiği gibi sırasıyla 0,5MRL, 1,0MRL, 1,5MRL, 2,0MRL ve 5,0MRL düzeylerinde olacak şekilde standart ve ayrıca her seviyeye 1 ng/µl yoğunlukta internal standart(PCB 209) çözeltisinden 50 µl eklenen çiğ süt numuneleri vorteks ile 30 sn. karıştırılarak 7.2.2.2 basamağından itibaren ekstraksiyon işlemi uygulanır.

Tablo 1: Pozitif (Spike) numune hazırlamak için ekimi yapılan standart miktarları

MRL Düzeyleri	Miks ara stoktan eklenen miktar(µL)	Internal standarttan eklenen miktar(µL)
0 MRL	0,0	50
0,5 MRL	25	50
1,0 MRL	50	50
1,5 MRL	75	50
2,0 MRL	100	50
5,0 MRL	250	50

7.3. Numune Analizi

1. 5.0 mL çiğ süt numunesi 50 mL'lik plastik santrifüj tüpüne konulur. Üzerine standart ve internal standart ekimi Tablo 1'de ifade edildiği gibi yapılır (Kör numune ve analize alınacak numunelere sadece internal standart eklenir).
2. Üzerine 6 mL aseton ve 2,5 g magnezyum sülfat eklenerek 30 s vortekslenir ve 3500 rpm'de 3 dakika süreyle santrifüj edilir.
3. Santrifüj sonrası 6mL benzen:n-pentan(v/v, 30:70) ilave edilerek tekrar 30 s vortekslenir ve 3500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilir.
4. İkinci santrifüj sonrasında elde edilen üstteki sıvı fazdan 9 mL deney tüpüne alınıp azot altında 40°C'de uçurulur.
5. 1000 mg florisil kartuş üzerine 2,0 g sodyum sülfat eklenerek kolon hazırlanır. Daha sonra kolon vakum manifolda yerleştirilerek, 2x2 mL benzen:n-pentan(v/v, 30:70) ile şartlandırılır.
6. Şartlandırılmış kolonun altına deney tüpü yerleştirilir. Azot altında uçurularak elde edilmiş kuru kalıntı 2 mL benzen:n-pentan(v/v, 30:70) ile çözülüp kolondan geçirilir ve kolon 3 mL n-benzen:n-pentan(v/v, 30:70) ile yıkanır.
7. Deney tüpünde toplanan çözelti azot altında 40°C'de uçurulur ve elde edilen kuru kalıntı 100 µL isooktan ile çözülerek vial e alınır ve GK-ECD cihazına enjekte edilir.

7.4. Cihaz Şartları

GC-ECD (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C/dak.)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		60	2,0	2
Basamak 1	10	160	0,0	12,0
Basamak 2	2	260	10,0	72,0

Mode : Splitless	GC-ECD Kolon : DB-XLB
Akış Hızı : 2,4 mL/dk	Uzunluk : 30 m.
Gaz : Azot	Çapı : 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi : 1µL	Film Kalınlık : 0,25 µm
Inlet Sıcaklığı : 250 °C	

GC-MS (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C/dak.)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		70	2,0	2
Basamak 1	25	150	0,0	5,2
Basamak 2	3,0	200	0,0	21,87
Basamak 3	8,0	280	10,0	41,87

Mode : Splitless	GC-MS Kolon : HP-5MS
Akış Hızı : 2,3 mL/dk	Uzunluk : 30 m.
Gaz : Helyum	Çapı : 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi : 1µL	Film Kalınlık : 0,25 µm
Interface Sıcaklığı : 280 °C	İyonlaştırma Tipi :Elektron Impact
Inlet Sıcaklığı : 250 °C	

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması

1. Her bir grup analizde sonuçların hesaplanması ve değerlendirilmesi için; GC-ECD'ye sırasıyla standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü ve kör numune enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir.
2. Numune kromatogramı ile standart kromatogramı ve pozitif (spike) numune kromatogramı karşılaştırılır ve geliş zamanları kontrol edilir. Her bir analit için Türk Gıda kodeksinde belirtilen MRL düzeyleri dikkate alınarak 0.5, 1.0, 1.5 ve 2,0 ve MRL düzeylerinde olacak şekilde standart madde eklenerek (Tablo 1'e göre) hazırlanan pozitif (spike) numuneler ile kör numune cihaza enjekte edilir.
3. Kör numune ve pozitif (spike) numunelerin pik alanları ile derişim değerlerine karşı grafik çizilerek en az beş noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.
4. Pozitif (spike) numune veya şüpheli numunenin konsantrasyonu, çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak ng/g olarak hesaplanır. Her bir analit için elde edilen değere validasyon raporunda hesaplanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri(U) ± şeklinde eklenerek sonuçlar değerlendirilir.
5. Pozitif bulunan sonuçlar GC-MS ile teyit edilir, autotune alınır.
6. Sonra cihaza standart enjeksiyonu yapılır ve cihazın analize hazır olduğu tespit edilir.
7. Daha sonra sırasıyla çözücü, standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü, kör numune ve pozitif şüpheli numune cihaza enjekte edilir.

8. Aranan maddenin Tablo 2' de belirtilen geliş zamanı ve karakteristik iyonları (en az üç iyon), standart ve pozitif (spike) numune ile karşılaştırılır ve karar verilir.
9. 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

Tablo 2: Aranan Maddelerin Ana İyon ve Parçalanma İyonları

Madde adı	Ana İyon	Parçalanma iyonları		
Alfa-HCH	183	181	219	217
Gama-HCH	111	109	181	183
Beta-HCH	219	181	109	183
Hekzaklorobenzen	284	286	282	142
Aldrin	66	263	79	91
4'4 DDE	246	318	248	316
4'4 DDD	235	237	165	236
4'4 DDT	235	237	165	236
2'4 DDT	235	237	165	236
PCB 209	498	214	500	178

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Antignac J.P., Bizec B.L., Monteau F., Andre F.(2003). Validation of Analytical Methods Based on Mass Spectrometric detection According to the "2002/657/EC" European Decision: Guideline and Application, *Analytica Chimica Acta*, 483: 325-334.
2. Lehotay S.L., Mastovska K.(2005). Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticides Residue Analysis in Fatty Food Matrixes, *Journal of AOAC Int.* 88: 630-638.
3. Zwir-Ferenc A., Biziuk M.(2006). Solid Phase Extraction Technique-Trends, Opportunities and Application, *Polish J. of Environ. Stud.* Vol 15: 677-690.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

YUMURTADA ORGANİK KLORLU İNSEKTİSİTLER ve POLİKLOROBİFENİLLERİN GC-ECD İLE TAYİNİ METODU

1 AMAÇ

Yumurta numunelerinde organik klorlu insektisitlerin ve poliklorobifenillerin (PCB) GC-ECD sistemi ile analizlerinin yapılmasını amaçlar.

2 UYGULAMA ALANI

Bu analiz metodu, hayvansal gıda olarak tüketilecek yumurtada organik klorlu insektisitlerinin (alfa-HCH, heksaklorobenzen, heptaklor, dieldrin, aldrin, gama-HCH, beta-HCH, 2,4-DDT, 4,4-DDE, 4,4-DDD, 4,4-DDT) ve PCB'lerin (PCB28, PCB30, PCB52, PCB101, PCB118, PCB153, PCB180) GC-ECD sistemi ile analizlerini kapsar.

3 TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4 GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

1. Test öncesinde laboratuvar koşullarının çalışmaya uygunluğu ve güvenliği gözden geçirilmelidir.
2. Kullanılan kimyasal maddeler, toksikolojik özellik gösterebileceğinden güvenlik yönünden çeker ocak altında çalışılmalı, önlük, eldiven gibi koruyucu kıyafetler kullanılmalı ve analizin gerektirdiği diğer tedbirler alınmalıdır.
3. Testle ilgili her türlü cihaz ve malzemelerin kullanım ve bakım talimatlarına uyulmalıdır.
4. Bulaşma olasılığına karşı mümkünse tek kullanımlık malzemeler tercih edilmeli, mümkün değilse bulaşmayı önlemek amacıyla, kullanılan malzemeler analitin özelliği ve laboratuvar malzemelerinin temizliği ile ilgili genel prensipler esas alınarak temizlenmelidir.
5. Numuneler, analizi yapılmaya kadar analit ve matriksin özelliği dikkate alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır. Analiz sonucu raporlandırılan numunelerden sonucu negatif veya pozitif olanların imhası ya da saklanması konusunda laboratuvarın kendi "Numune Kabul Talimatı" esas alınmalıdır.
6. Analiz sonrası ortaya çıkan her türlü atık malzemelerin saklanması ve imhasında Ulusal/Uluslararası prosedürler dikkate alınmalı, konu ile ilgili güncel gelişmeler takip edilmelidir.

5 KISALTMALAR/TANIMLAR

- GC-ECD : Gaz Kromatografi-Elektron Yakalayıcı Dedektör
GC-MS : Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi
VKMAE : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü
MRL : Maksimum Rezidü Limiti

6 TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot aşağıdaki adımları takip eder:

1. Pestisitlerin organik çözücü faza geçirilmesi
2. Organik çözücünden suyun uzaklaştırılması
3. Katı faz ekstraksiyon tekniği ile clean-up yapılması
4. GC-ECD ile analizin yapılması.

7 TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Kullanılan Ekipmanlar

- 1 GC-ECD, GC-MS
- 2 Oto Enjektör
- 3 Vorteks
- 4 GC-ECD, GC-MS Kolonu
- 5 Etüv
- 6 Vial
- 7 Santrifüj
- 8 Pipet ucu
- 9 Otomatik Pipet
- 10 Analitik terazi
- 11 Buzdolabı
- 12 Cam malzeme(beher,mezür)
- 13 Vakum Manifoltu
- 14 Helyum Gazı
- 15 Azot Gazı

7.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Magnezyum sülfat (%98 saflıkta)
2. PSA kolon (Primer sekonder amin kolon, 500 mg'lık kolon)
3. Benzen (% 99.0 saflıkta)
4. N-Heptan (% 99.0 saflıkta)
5. Sodyum klorür (% 99.5 saflıkta)
6. Asetonitril (% 99.0 saflıkta)
7. Asetik asit (CH₃COOH, Analitik saflıkta)

7.2. Kullanılan Standart Çözeltiler

1. Standart ana stok çözelti: 10 ng/µl yoğunluğundaki Referans Standart çözeltiler kullanılmaktadır.
2. Standart ara stok çözelti hazırlama: Miks1 ara stok çözeltisi hazırlamak için Alfa-HCH, Gama-HCH, Heptaklor, 4,4-DDT, 4,4-DDD ve 4,4-DDE'nin 10 ng/µl'lik ana stok çözeltilerinden sırasıyla 600, 300, 600, 375, 375 ve 375 µL alınıp 375 µL sikloheksan ile 3 mL'ye tamamlanır. Miks 2 ara stok çözeltisi hazırlamak için Hekzaklorobenzen, Dieldrin, 2,4-DDT, Aldrin ve Beta-HCH'nin 10 ng/µl'lik ana stok çözeltilerinden sırasıyla 600, 300, 375, 300 ve 300 µL alınıp 1125 µL sikloheksan ile 3 mL'ye tamamlanır. 0,5 ppm'lik Miks 3 ara stok hazırlamak için PCB28, PCB 30, PCB52, PCB101, PCB118, PCB153, PCB180' in 10 ng/µl yoğunluğundaki standart ana stok çözeltilerinden 100'er µL alınıp 1300µL isooktan ile 2 ml'ye tamamlanır.
3. Internal standart ara stok çözelti hazırlama: 10 ng/µl'lik PCB 209 ana stok çözeltisinden 1 ml alınıp 9 ml sikloheksan ile 10 ml'ye tamamlanarak 1 ng/µl'lik 10 ml internal standart ara stok çözeltisi hazırlanır.
4. Pozitif (Spike) numune hazırlanması : Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmaları için kullanılan pozitif numuneler Tablo 1'e göre hazırlanır.

Tablo 1: Pozitif (Spike) numune hazırlamak için ekimi yapılan standart ve internal standart miktarları

*MRL düzeyleri	Miks 1'den eklenen miktar(µL)	Miks 2'den eklenen miktar(µL)	Miks 3'den eklenen miktar(µL)	Internal standarttan eklenen miktar(µL)
0,0	0,0	0,0	0,0	100
0,5	25	25	28	100
1,0	50	50	56	100
1,5	75	75	84	100
2,0	100	100	112	100
5,0	250	250	280	100

7.3. Numune Analizi

1. Homojenize edilmiş yumurta numunesinden 5,0 g alınarak 50 mL'lik plastik santrifüj tüpüne konulur. Üzerine standart ve internal standart ekimi yapılır. (Kör numune ve analize alınacak numunelere sadece internal standart eklenir).
2. Üzerine 1 mL asetik asit, 10 mL asetonitril, 2 g magnezyum sülfat ve 2 g sodyum klorür eklenerek, 30 sn. vortekslenir ve 3500 rpmde 5 dk süreyle santrifüj edilir.
3. 500 mg'lık PSA kartuş üzerine 1,0 g magnezyum sülfat eklenerek kolon hazırlanır. Daha sonra kolon vakum manifolda yerleştirilerek, 2x5 mL asetonitril ile şartlandırılır.
4. Şartlandırılmış kolonun altına deney tüpü yerleştirilir. Santrifüj sonrasında elde edilen üstteki sıvı fazdan 6 mL kolondan geçirilir ve daha sonra kolon 2 ml asetonitril ile yıkanır.
5. Deney tüpünde toplanan çözelti azot altında 40°C'de uçurulur .
6. Tekrar 500 mg'lık PSA kartuş üzerine 1,0 g magnezyum sülfat eklenerek yeni bir kolon hazırlanıp, vakum manifolda yerleştirilir ve 2x5 mL n-heptan-benzen(v/v, 70:30) ile şartlandırılır.
7. Rotary evaporatörde uçurulduktan sonra cam balonda elde edilen kuru kalıntı 3x1 ml n-hekzan ile çözdürülerek, şartlandırılmış olan florosil kolona eklenir.
8. Deney tüpünde toplanan çözelti azot altında 40°C'de uçurulur ve elde edilen kuru kalıntı 100 µL n-heptan-benzen(v/v, 70:30) ile çözümlenerek vialer alınır ve cihaza enjekte edilir.

7.4. Cihaz Parametreleri

GC-ECD (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		60	2,0	2
Basamak 1	10	160	0,0	12,0
Basamak 2	2	260	10,0	72,0

Mode	: Splitless	GK-ECD Kolon	: HP - 5
Akış Hızı	: 1.50 mL/dk	Uzunluk	: 30 m.
Gaz	: Azot	Çapı	: 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi	: 1µL	Film Kalınlık	: 0,25 µm

GC-MS (Fırın Programı ve Cihaz Şartları)

	Sıcaklık Artış Hızı (°C)	Fırın Sıcaklığı(°C)	Bekleme Zamanı(dak.)	Toplam Zaman(dak.)
Başlangıç		70	2,0	2
Basamak 1	25	150	0,0	5,2
Basamak 2	3,0	200	0,0	21,87
Basamak 3	8,0	280	10,0	41,87
Mode	: Splitless		GC-KS Kolon	: HP-5MS
Akış Hızı	: 2,3 mL/dk		Uzunluk	: 30 m.
Gaz	: Helyum		Çapı	: 0,25 mm
Enjeksiyon Hacmi	: 1µL		Film Kalınlık	: 0,25 µm
Interface Sıcaklığı	: 280 °C		İyonlaştırma Tipi	:Elektron Impact
Inlet Sıcaklığı	: 250 °C			

7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi Ve Hesaplamanın Yapılması

1. Her bir grup analizde sonuçların hesaplanması ve değerlendirilmesi için; GC-ECD'ye sırasıyla standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü ve kör numune enjeksiyonundan sonra analizi yapılan numuneler enjekte edilir.
2. Numune kromatogramı ile standart kromatogramı ve pozitif (spike) numune kromatogramı karşılaştırılır ve geliş zamanları kontrol edilir. Her bir analit için Türk Gıda kodeksinde belirtilen MRL düzeyleri dikkate alınarak 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 ve MRL düzeylerinde olacak şekilde standart madde eklenerek (Tablo 1'e göre) hazırlanan pozitif (spike) numuneler ile kör numune cihaza enjekte edilir.
3. Kör numune ve pozitif (spike) numunelerin pik alanları ile internal standardın pik alanı oranlanıp derişim değerlerine karşı grafik çizilerek en az beş noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.
4. Pozitif (spike) numune veya şüpheli numunenin konsantrasyonu, çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak ng/g olarak hesaplanır. Her bir analit için elde edilen değere validasyon raporunda hesaplanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri(U) ± şeklinde eklenerek sonuçlar değerlendirilir.
5. Pozitif bulunan sonuçlar GC-MS ile teyit edilir, autotune alınır.
6. Sonra cihaza standart enjeksiyonu yapılır ve cihazın analize hazır olduğu tespit edilir.
7. Daha sonra sırasıyla çözücü, standart, çözücü, pozitif (spike) numune, çözücü, kör numune ve pozitif şüpheli numune cihaza enjekte edilir.
8. Aranılan maddenin Tablo 3'de belirtilen geliş zamanı ve karakteristik iyonları (en az üç iyon), standart ve pozitif (spike) numune ile karşılaştırılır ve karar verilir.
9. 2002/657/EC direktifine uyumlu olarak geçerli kılınır.

Tablo 2: Analitlerin GC-MS'deki alıkonma zamanları ve karakteristik iyonları.

Analitler	Alıkonma zamanı (dk)	Tanımlanan iyonlar , m/z				
		Molekül ağırlığı	Q1	Q2	Q3	Q4
Alfa-HCH	12,169	290,80	183	181	219	217
Gama-HCH	13,551	290,80	111	109	181	183
Beta-HCH	13,448	290,80	219	181	109	183
Hekzaklorobenzene	12,473	284,81	284	286	282	142
Heptaklor	16,886	373,34	100	272	274	270
Dieldrin	23,964	380,93	79	81	82	77
Aldrin	18,597	364,93	66	263	79	91
4'4 DDE	24,180	318,03	246	318	248	316
4'4 DDD	25,860	320,05	235	237	165	236
4'4 DDT	27,135	354,51	235	237	165	236
2'4 DDT	25,905	354,51	235	237	165	236
PCB 209	33,751	498,66	498	214	500	178
PCB 28	16,275	257,55	256	258	186	260
PCB 30	13,366	257,55	256	258	186	150
PCB 52	18,029	291,99	292	220	290	222
PCB 101	22,771	326,44	326	254	328	324
PCB 118	25,510	326,44	326	328	324	254
PCB 153	26,331	360,88	360	362	145	144
PCB 180	29,250	395,33	394	396	324	392

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR KAYNAKLAR VE EKLER

1. Lehotay SJ, Mastovská K, Yun SJ. (2005). Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. J AOAC Int. Mar-Apr;88(2):630-8. PubMed PMID: 15859091.
2. Lehotay SJ, de Kok A, Hiemstra M, Van Bodegraven P. (2005). Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. J AOAC Int. Mar-Apr;88(2):595-614. PubMed PMID: 15859089.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALDA STREPTOMİSİN KALINTILARININ CHARM-II YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu test metodu, balda bulunmasına izin verilmeyen aminoglikozid grubu antibiyotiklerden streptomisinin Charm II yöntemi ile kalitatif tespitini amaçlamaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, hayvansal gıda maddelerinden balda streptomisin etkin maddeli ilaçlara ait kalıntıların kalitatif tespiti için uygulanır. Balda tespit limiti 10 ppb'dir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK UYARILARI ve ÖNLEMLER

1. Kimyasallar hazırlanırken ağızla çekilmemeli ve pipetör kullanılmalıdır. Eldiven ve gözlükle çalışma yapılmalıdır. Atıklar, kimyasal atık şişesine doldurulmalıdır.
2. Charm- II testinin [^3H] içeriği Nuclear Regulatory Commission ve Agreement State Regulations tarafından muaf tutulacak kadar düşüktür. Radyoaktif materyallere dokunduğunuz zaman aşağıdaki önlemleri alınız.
3. Pipetleri ağızınızla çekmeyiniz.
4. Radyoaktif materyallere dokunurken sigara içmeyiniz, bir şey yemeyiniz ve kozmetik kullanmayınız. Bu esnada yemek sağlığı ciddi bir şekilde tehdit eder.
5. Radyoaktif materyallere dokunduktan sonra ellerinizi iyice yıkayınız.
6. Dökülen materyalleri hemen ve iyice siliniz.
7. Katı atıklar [^3H] ya da [^{14}C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller etiketlenerek karartıldıktan ya da uzaklaştırıldıktan sonra normal çöpe atılabilir.
8. Sıvı atıklar [^3H] ya da [^{14}C] ile kontamine olmuş olabilir bu yüzden materyaller ya tıbbi atık çukurlarına konulmalı ya da bol su ile yıkanmalıdır.

5. KISALTMALAR TANIMLAR

Analizör: Charm II LSC7600 analizörü. Cihaz örneklerin analizini yapar ve sayısal bir sonuç vererek yorumlar.

Bağlayıcı (Beyaz tablet): Streptomisin etkin maddeli ilaçlara bağlanabilen spesifik reseptör alanı içeren ana molekül yapısıdır.

Santrifüj Tüpü: 50 ml'lik konik tüpler. Örnek hazırlama ve ekstraksiyon aşamalarında kullanılır.

Kontrol Noktası: Negatif ve şüpheli pozitif sonuçların arasındaki kesişme noktasını gösteren sayıdır. Test sonuçlarının kontrol noktasından büyük olması örneğin negatif olduğunu, kontrol noktasından küçük veya eşit olması ise muhtemel pozitif olduğunu gösterir ve örneğin tekrar test edilmesi gerekebilir. Her yeni reaktif için yeni bir kontrol noktası oluşturulur ve bu kontrol noktası kitin son kullanma tarihine kadar geçerlidir.

CPM: Dakika sayıcısının kısaltmasıdır. Sonuç ölçüm birimi.

Tissue Performans Negative Concentrate (TPNC): 30ml'lik açık renkli serum şişesinde toz halde bulunur. 10 ml saf su ile çözündürülür. Çözündürüldüğü zaman dilüe edilmiş bal görevi görür.

MSU Multi-Antimikrobiyel Konsantr Standart (MSUMA): Amber şişe içerisinde liyofilize toz halinde bulunan çeşitli antimikrobiyel ilaçlar içeren standart. 10 ml deiyonize su veya saf su ile çözüldüğünde 10 ppb streptomisin standardı içeren bir sıvı elde edilir. Bu standart örnek yüklemelerinde ve dilüe edilmiş pozitif kontrol yapmak için kullanılır.

Negatif Kontrol: Doku Performans Negatif Konsantratu dilüe edilmiş negatif örneğin CPM sonuçlarını verir. Negatif Kontrol Performans izlemesi Negatif Kontrol ortalamasına %20 kadar yakın olmalıdır.

Negatif Kontrol Ortalaması: 3 Negatif Kontrol CPM sonuçlarının ortalamasıdır.

Negatif Bal Ortalaması: Bal örneği negatif kontrol ortalaması ile karşılaştırıldığında bu ortalamanın %0-50 aralığında ise 6 test sonucunun ortalaması alınıp bundan %40 çıkartılarak Kontrol Noktası hesaplanır.

M2 Buffer: Örnek ekstraktlarının pH'sını ayarlama için kullanılan tampon çözeltidir.

MSU Ekstraksiyon Buffer: Örnekten antibiyotiği ekstrakte etmeye yarayan tampon çözeltidir.

Optifluor: Radyoaktiviteyi açığa çıkaran sıvı. Taşıyıcı moleküle bağlanmış olan işaretlenmiş antibiyotik örneğindeki [³H] moleküllerinden elde edilecek ışımalarını açığa çıkartarak radyoaktivitenin ölçülmesini sağlar. Kapağı açıldıktan sonra 6 ay ömrü vardır. Kapağı kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 sene saklanabilir.

Performans İzleme: Her çalışma gününde test prosedürünün doğrulanması ve ekipmanların fonksiyonlarını yerine getirebildiğinin görülmesi ve kontrol noktasının doğrulanmasıdır.

Pozitif Kontrol: Negatif Kontrol içinde MSUMA seyreltilerek 5 ppb streptomisin elde edilir. Pozitif kontrol için performans izleme sonuçları kontrol noktasının altında olmalıdır.

Pozitif Kontrol Ortalaması: 3 adet pozitif kontrolün CPM sonuçlarının ortalamasıdır. Alternatif kontrol noktası belirlenmesi çalışmaları esnasında kullanılır.

ppb: Milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır. mg/kg'a tekabül eder.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Tracer (Renkli Tablet): Kit tableti üzerinde işaretlenmiş olan renkli tablet. Bu tablet [³H] ile işaretlenmiş olan streptomisin standardı içerir.

Tipik Sayım Sayfası: Her kit için pozitif ve negatif kontrol noktalarının hesaplanacağı bir tablo içeren kit ile beraber verilen sayfa.

Kontrol Noktasını Doğrulama: Doğrulama adımları süresinde belirli pozitif örnekleri kullanır ve pozitif kontrol ortalamasından hesaplanır.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Balda streptomisin etkin maddeli ilaçların test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip Charm-II cihazı ile tanımlanmasına yarayan hızlı bir immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Hayvansal gıdalardan baldır.

1.2. Kullanılan Ekipman

- Dereceli Pipetler, 2 ml, 5 ml ve 25 ml.
- Santrifüj Tüpleri (PP), 50 ml.
- Su banyosu
- Balon joje, 50 ml ve 100 ml, 1000 ml
- Cam Huniler, 5cm ve 10 cm Ø.
- Otomatik Pipet, 1ml ve 5ml
- Hassas terazi
- Karıştırıcı, vorteks
- Soğutmalı santrifüj
- Charm-II inkübatör
- Charm 6600 okuyucu
- Otomatik pipet ucu, 1ml ve 5 ml
- Streptomycin, Gradient saflıkta % 94

7.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Negatif Kontrol Standart

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 100 ml 40°C'deki şebeke suyu çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika 4±2 °C'de tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6 °C'de 3 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

MSU Multi-Antimikrobiyal Standart (MSU-MA) -10 ppb streptomisin Standardı:

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10 ml distile su ile çözülüp iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika oda sıcaklığında tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-8°C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

Tissue Performance Negative Concentrate (Doku Performans Negatif Konsantratu)

2-6°C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. 10ml saf su ile çözülür ve iyice çalkalanır. Kullanmadan önce 15 dakika oda sıcaklığında tutulur. Çözündürülmüş olan standart 2-6°C'de 2 gün saklanabilir. -15°C'de veya altında 2 ay saklanabilir.

MSU Buffers, M2 Buffer

2-6 °C'de kuru bir yerde muhafaza edilir. MSU Extraction Buffer 1 litre saf suda çözülür ve iyice karıştırılır. M2 Buffer ise 50 ml saf suda çözülerek hazırlanır. Çözülerek hazırlanmış olan tamponlar 2-6 °C'de 2 ay saklanabilir.

Tabletler: Tabletleri -15 °C'de ya da yada daha düşük sıcaklıkta saklayın. Dondurucudan sadece o gün içinde kullanacağınız kadar tablet alın. Günlük kullanım sırasında tabletler 12 saat kadar oda sıcaklığında kalabilirler.

1 M NaOH Çözeltisi

40 gr. NaOH tartılır balon jodede 1 litre suda çözülür.

7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.4.1.1. Kontrol Noktasının Oluşturulması

1. 4 ml Tissue Performance Negative Concentrate 12 ml MSU Extraction Buffer ile dilue edilir. Negatif kontrol hazırlanmış olur. Negatif kontrol oda sıcaklığında tutulmalıdır.
2. Negatif kontrol sonuçlarının ortalamasını alınır. Bu Negatif Kontrol Ortalamasıdır. Bu günlük izleme içindir ve tipik bir negatif bal örneği için kontrol noktası oluşturmada kullanmak için yeterlidir.
3. Tipik bir bal örneği test edilir ve negatif kontrol ortalamasındaki CPM değeri ile karşılaştırılır. Eğer bal negatif ise sonuç %0-50 aralığında olmalıdır. Negatif ballar sıklıkla %-20-50 aralığında olurlar.
4. Eğer sonuçlar bu aralıklarda ise 6 tane yeterli görülen tipik negatif bal örneği test edilir. Sonuçların ortalaması alınır. Bu negatif bal örneği ortalamasıdır. Eğer bu aralığın dışında ise başka bir numune analiz edilir.

5. Negatif bal örneği ortalamasından %40 çıkarın. Bu Kontrol Noktasıdır.
6. CPM sonuçları tipik sayım sayfasındaki sonuçlarla karşılaştırılır. Sonuçlar tipik sayım ortalamasının %20 aralığında olmalıdır. Eğer sonuçlar bu aralıkta değilse kontrol noktası oluşturma işlemi tekrarlanır.
7. Yüklenmiş bal numunesinin hazırlanması için 0.9 ml (900 µl) Doku Performans Negatif Konsantrenin içine çözüldürülmüş 0.1 ml (100 µl) MSU-MA, iyice karıştırılır. 9.8 ml Doku Performans Negatif Konsantrenin içine bu karışımdan 0.2 ml (200 µl) eklenerek dilüe edilir. iyice karıştırılır. Bu karışımdan 6 ml alınarak 18 ml MSU Ekstraksiyon Buffer ile karıştırılır. Kullanırken pozitif kontrol oda sıcaklığında tutulabilir.
8. Hazırlanan 3 adet yüklenmiş numune analiz edilir ve ortalaması alınır.
9. Ortalama CPM değeri bulunur.
10. Ortalamaya %20 eklenerek kontrol noktası tespit edilir.
11. Üç adet negatif kontrol standardı analiz edilir ve ortalaması bulunur. Bu Negatif Kontrol Ortalamasıdır. Burada elde edilen sonuçlar Tipik Sayım Sayfası ortalamasının % 20 aralığında olmalıdır.

Kontrol noktası, negatif ile muhtemel pozitif sonuç (şüpheli) arasındaki sınır noktasıdır. Her yeni kit için bir kontrol noktası ve kontrol ortalaması belirlenmelidir. Streptomisin içermeyen 6 negatif numuneye (% 25 negatif kontrol ortalaması içerisinde olmalıdır) istenilen tarama seviyesinde yükleme yapılarak analiz edilir. Ortalama CPM değeri bulunur. Ortalamaya %20 ilave edilerek kontrol noktası tespit edilir.

7.4.1.2 Numunenin Hazırlanması

1. Oda sıcaklığında saklanan numuneler karıştırılarak homojen hale getirilir. Balda şeker kristalize olmuşsa, numune homojenize oluncaya kadar ılık su içerisinde tutulur.
2. Santrifüj tüpüne 10 gr. bal tartılır üzerine 30 ml MSU Ekstraksiyon Tamponu ilave edilir, iyice karıştırılır. pH değeri kontrol edilir. pH 7.5 olmalıdır. Eğer pH değeri 7.5'den düşük ise M2 Buffer ile pH 7.5'e ayarlanır. Eğer pH değeri 7.5'den yüksek ise 0.3 ml 0.1 M HCl eklenerek karıştırılır ve tekrar ölçülür. Hala yüksek ise damla damla ilave edilerek ayarlanır.

7.4.2. Analizin Yapılması

1. Boş test tüpüne beyaz tablet eklenir.
2. 0.3 ± 0.1 ml ($300 \mu\text{l} \pm 100 \mu\text{l}$) saf su eklenir. Tabletın parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
3. Test tüpünün içine 5.0 ± 0.25 ml örnek ya da standart eklenir (her bir örnek için yeni uç kullanılır), 10 saniye karıştırılır.
4. 35 ± 2 °C'de 2 dakika inkübe edilir.
5. İnkubasyondan sonra bir kalem yardımıyla yeşil tablet test tüpüne ilave edilir.

6. 10 saniye karıştırılır.
7. $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dakika inkubasyona bırakılır.
8. 3300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
9. Üstteki ekstrakt dökülür (Santrifüj durduktan sonraki herhangi bir gecikme dipteki çökeltinin de ekstraktla birlikte dökülmesine neden olabilir). Test tüpünün kenarları emici bir kağıt havlu ile silinir.
10. $300 \mu\text{l} \pm 100 \mu\text{l}$ saf su eklenir. Tablet parçalanması için 10 saniye karıştırılır (tabletin iyice parçalanması için gerekiyorsa ek süre tanınabilir).
11. 3.0 ± 0.5 ml optiflour eklenir. Bulutumsu görüntü uniform bir şekilde dağılıncaya değin karıştırılır.
12. Analizörün içinde 60 saniye saydırılır. [^3H] kanalındaki CPM değerini okunur. Pozitif ya da negatif belirlemeye göre kontrol noktası ile karşılaştırılır.

7.5. Analiz Sonucunun Değerlendirilmesi

1. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden büyükse örnek negatiftir”(not found).
2. Eğer örneğin CPM değeri kontrol noktasının değerinden küçükse örnek “şüpheli pozitif”.
3. Negatif olarak değerlendirilen örneklerin analiz sonucu negatif olarak raporlanır. Örnek ‘şüpheli pozitif’ olarak değerlendirildi ise örneğin konfirmasyon analizine alınması gerekir.
4. Ulusal Kalıntı İzleme Genelgesine göre belirli sayıda negatif örneği temsilen bir örnek konfirmasyon analizine alınır.

7.6. Numune Sonuçlarının Hesaplanması

Her çalışmadan önce bir tane negatif ve bir tane de pozitif kontrol hazırlanıp test edilmelidir. Bu, kontrol noktasını ve prosedürleri valide etmemizi sağlar.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
2. Bornova VKE Laboratuvar Güvenliği Prosedürü
3. Bornova VKE Deney Metotları ve Deney Metotlarının Geçerli Kılınması Prosedürü
4. Charm II Streptomycin Test for Honey
5. Charm Control Point Setup worksheets

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BALDA KLORAMFENİKOL KALINTILARININ ELISA YÖNTEMİ İLE KALİTATİF TESPİTİ ANALİZ METODU

1. AMAÇ

Bu test metodu, gıda değeri olan ballarda kullanımı yasaklanmış olan kloramfenikolün balda Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile kalitatif tespiti amaçlamaktadır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu metot, bal numunelerinde kloramfenikolün kalitatif tespiti için uygulanır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK /UYARILAR/ÖNLEMLER

Laboratuvarda çalışırken Laboratuvar Güvenliği Prosedürü ve Laboratuvarda Güvenli Çalışma Talimatı uygulanmalıdır. Analiz sonucu oluşan atıklar Enstitü Atıklarının İmhası Talimatı uygun olarak imha edilmelidir.

Kitler kullanılmadan önce 2-8°C'ler arasında saklanmalıdır. Son kullanma tarihi geçen kitler kesinlikle kullanılmamalıdır. Kit içerisinden çıkan aynı lot numaralı solüsyonlar ile kullanılmalıdır; lot numarası farklı kitler ile solüsyonlar bir arada kullanılmamalıdır. Kullanımı tamamlanan tüm solüsyonlar derhal buzdolabına konulmalıdır. Kitin kullanılmamış kısmı, orijinal ambalajında ve buzdolabında saklanmalıdır.

Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yönteminin tekrarlanabilirliği büyük ölçüde yıkama işlemi yapılan kuyucukların bir örnekliliğine bağlı olup, ELISA test prosedürü sıranın dikkatli bir şekilde takip edilerek uygulanması gerekmektedir. Test prosedürü aşamasında kit kuyucuklarının kurummasına asla izin verilmemelidir. Çalışmalar esnasında hazırlanan reagentlar el ile karıştırılmalı, kesinlikle vortex kullanılmamalıdır. İnkübasyon sırasında kuyucukların direk gün ışığına maruz kalmaması için, kuyucukların üzeri örtülmelidir. Kromojen ışığa duyarlı olduğundan, kuyucuklara kromojen ilave edildikten sonra inkübasyon sırasında karanlıkta bekletilmelidir. Renk bozukluğu şekillenen kromojen kullanılmamalıdır. 1 N sülfürik asit içeren stop solüsyonun kullanımı esnasında deri ile temasından kaçınılmalıdır. Yapılan kontrol sonucunda standartlar arasındaki korelasyonu uygun olmayan kitler kullanılmamalıdır. Standart 1 (0 ppt) solüsyonunda herhangi bir bozulma meydana geldiğinde, 0.6 absorbans ($A_{450\text{nm}} < 0.6$) değerinden daha düşük

bir absorbans değeri verdiği göz önünde bulundurulmalıdır. Standart 1 ve standart 4 absorbans değerleri arasında belirgin bir farklılık bulunmalıdır.

5. KISALTMALAR / TANIMLAR

Absorbans: Bir ışık demeti bir maddeden geçerken ışığın madde tarafından emilen kısmı, geçirgenliğin negatif logaritması, optik yoğunluk, soğurganlık, OD.

ELISA: Enzym Linked Immuno Sorbent Assay. Belli bir enzimle işaretlenmiş test maddesi olan antijen veya antikör kullanılarak spesifik antijen veya antikörü belirleme amacıyla uygulanan, çok duyarlı bir laboratuvar yöntemi.

Kromojen: Pigment hâline dönüşebilen öncü madde; renk verici maddeyi oluşturan kendisi renksiz herhangi bir madde.

Substrat: Belirli bir enzimin özgül olarak etkilediği bir bileşik veya reaksiyona giren madde.

Standart: Hedef bileşiğin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir.

Blank: Negatif numune

Spayk: Standart yüklü numune

MRPL: Minimum Required Performance Limit, Gerekli En Az Performans Limiti

ppm: Parts per milion. Milyonda bir tanımlamasının kısaltmasıdır. mg/kg'a tekabül eder.

nm: Nanometre

ppb: Parts per miliar, milyarda bir tanımlamasının kısaltmasıdır. mg/kg'a tekabül eder.

ppt: Parts per trillion, trilyonda bir tanımlamasının kısaltmasıdır.

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

N: Normal

OD: Optik dansite

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bu metot bal numunelerinde kloramfenikolün test metodunda belirtildiği gibi ekstrakte edilip ELISA yöntemi ile 450 nm dalga boyuna sahip spektrofotometrede (ELISA okuyucu) absorbansının ölçülmesine dayanan immunoassay metodudur.

7. TEST METODUNUN TANIMI

7.1. Materyal

Bal numuneleridir.

7.2. Kullanılan Ekipman

7.2.1. Malzemeler

- Dereceli pipetler (1 ml, 5 ml ve 10 ml'lik)
- Santrifüj tüpleri (Polipropilen 50 ml'lik)
- Cam tüpler (vida kapaklı, 10 ml'lik)
- Mezür (25 ml'lik)
- Balon joje (10 ml, 50 ml, 100 ml ve 1000 ml'lik)
- Cam huni (5cm ve 10 cm çapında)
- Filtre (0,45 nm)

7.2.2. Laboratuvar Araçları

- Otomatik pipetler (1ml ve 5ml'lik)
- Mikropipet: 100µl ve 1000 µl
- Otomatik ve mikropipet uçları
- Blender
- Karıştırıcı
- Hassas terazi (1 mg hassasiyette)
- Vorteks
- Çoklu vorteks
- Soğutmalı santrifüj
- Çoklu uçurucu
- ELISA plate okuyucu (Bio-Tek, EL808)

7.2.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanması

7.2.3.1. Kimyasal Maddeler

- Etil Asetat, gradient saflıkta
- N-Heksan, gradient saflıkta
- Methanol, gradient saflıkta
- Referans Standart: Chloramphenicol (Sigma Aldrich, 31667, CAS:56-75-7)
- Kloramfenikol Enzim Konjugatı,

- Kromojen, .
- Stop Solüsyon, .
- Buffer .
- Mirotiterplatte (96' lik)
- Kloramfenikol Standart Solüsyonları,.
 1. Standart 1: 0 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon, .
 2. Standart 2: 25 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon, .
 3. Standart 3: 50 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon, .
 4. Standart 4: 100 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon, .
 5. Standart 5: 250 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon, .
 6. Standart 6: 750 ng / kg Kloramfenikol içeren standart solüsyon, .

7.2.3.2. Çözeltiler ve Hazırlanması

- Yıkama Çözeltisi-PBST'nin Hazırlanması: Kit ile birlikte gelen yıkama solüsyonu bidistile su ile çözüldürülüp son hacim 1000 ml' ye tamamlanır.1 ay buzdolabında saklanarak kullanılabilir
- Kloramfenikol Enzim Konjugatının Hazırlanması: Bir kısım kloramfenikol enzim konjugatı, on kısım buffer ile 1:11 oranında dilüe edilir.
- Kloramfenikol Ana Stok Standardı (0,1 mg / ml-100 ppm): 10 ± 01 mg Kloramfenikol standardı, metanol ile 100 ml hacimli balonda çizgisine kadar dilüe edilir (karanlıkta -20 °C ile -30 °C arasındaki derin dondurucuda 3 ay saklanabilir).
- Kloramfenikol Ara Stok Standardı (1 µg / ml-1 ppm): 100 µl Kloramfenikol Ana Stok solüsyonu, metanol ile 10 ml'lik ölçülü balonda ölçü çizgisine kadar dilüe edilir (karanlıkta -20 °C ile -30 °C arasındaki derin dondurucuda 1 ay saklanabilir).
- Kloramfenikol Spayk Standardı (0.010µg/ml-10 ppb): 100 µl Kloramfenikol ara stok solüsyonu, saf su ile 10 ml'lik ölçülü balonda çizgisine kadar dilüe edilir (buzdolabında ve karanlıkta 1 hafta saklanabilir).

7.3. Numunelerin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

Test 5 basamaktan oluşmaktadır.

1. Numunenin homojen hale getirilmesi,
2. Etil asetat ile ekstrakte edilmesi,
3. Azot gazı altında uçurularak bufer ile son hacmin elde edilmesi,
4. Uygun bir konjugat ve spesifik substrat aracılığı ile inkübasyona bırakılması,
5. ELISA okuyucuda 450 nanometrede tespit edilmesi.

7.4. Test Numunesinin Homojenizasyonu ve Ekstraksiyonu

1. Bal numuneleri homojen hale getirilir.
2. Bal numunesinden 50 ml'lik santrifüj tüpüne $2,0 \pm 0,1$ g tartılır.
3. Üzerine 4 ml saf su eklenir. Homojenize edilir.
4. 4 ml etil asetat eklenerek 15 dk otomatik vorteks ile karıştırılır.
5. 15 dakika 20°C de 4000 rpm'de santrifüj edilir.
6. Üst fazdan 1 ml cam tüpe alınır. 55°C 'de azot gazı ile uçurulur.
7. 0,5 ml buffer eklenir ve 15 dakika vortekslenerek çözülür.
8. 0,45 nm filtreden süzülerek 10 ml'lik cam tüplere alınır.

7.5. Kontrol Örneklerinin Ekstraksiyonu

1. Homojenize edilmiş kontrol örneğinden bir santrifüj tüpüne numune ile aynı miktarda alınır.
2. Ekstraksiyon işlemleri numuneye uygulandığı şekli ile aynen tekrarlanır.

7.6. Spayk Kas Doku Örneğinin Hazırlanması

1. Homojenize edilmiş kontrol örneğinden bir santrifüj tüpüne numune ile aynı miktarda alınır.
2. Her tüpe, 10 ppb kloramfenikol spayk standardından her 1 gr örnek için 30 μl ilave edilir.
3. Ekstraksiyon işlemleri numuneye uygulandığı şekli ile aynen tekrarlanır.

7.7. Analizin Yapılması

1. Kit içerisindeki plate ve tüm solüsyonlar analiz öncesinde, karanlık ortamda oda ısısına ($20 - 25^{\circ}\text{C}$) gelinceye kadar bekletilir.
2. Kullanılacak standart ve numune sayıları düşünülerek gerekli sayıda kuyucuk başka bir mikroplate alınır. Mikroplate yerleşim planı standartlar, kontrol örnekleri, spayk örnekleri, numuneler şeklinde olmalıdır (Tablo.2). Günlük laboratuvar çalışmalarında Std 1 ve 6 kullanılır. Mikroplate yerleşim planı kullanılan standartlara uygun şekilde hazırlanır.

Tablo.1. Mikroplate Yerleşim Planı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	N1	N9	“	“	“	“	“	“	“	“	“
B	Std 2	N2	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
C	Std 3	N3	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
D	Std 4	N4	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“

E	Std 5	N5	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
F	Std 6	N6	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
G	Blk	N7	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
H	Spk	N8	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“

Std: Kloramfenikol Standart Solüsyonu

Blk: Kontrol Örneği

Spk: Spayk Örneği

N: Numune

1. Tüm kuyucuklara ilgili standartlar ve örneklerden 50 ml eklenir.
2. Kuyucuklara 50'şer ml dilue edilmiş enzim konjugatı ilave edilir.
3. Mikroplate, karanlık bir ortamda, oda ısısında (20 – 25 °C) 1 saat süre ile inkübasyona bırakılır.
4. İnkübasyon süresi biten mikropleyte oda ısısına gelmiş yıkama solüsyonundan her bir kuyucuk için 250 ml olacak şekilde çoklu mikropipet yardımı ile eklenir, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırılır ve dökülür. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edilir.
5. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 100'er ml kromojen solusyonundan ilave edilir.
6. Kromojen ilave edilmiş plate, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırılır.
7. Mikroplate, karanlık bir ortamda, oda ısısında (20 – 25 °C) 15 dakika süre ile inkübasyona bırakılır.
8. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 100 ml stop solüsyon ilave edilerek, mikroplate dikkatlice karıştırılır.
9. Mikroplate, ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda, 30 dakika içerisinde okutulmalıdır.

7.8. Analiz Sonuçlarının Değerlendirmesi

1. Sonuçların Değerlendirilmesi

Cut-off değerine eşit veya daha düşük absorbans veren örnekler şüpheli pozitif, daha yüksek absorbans veren örnekler negatif olarak değerlendirilir. Şüpheli pozitif olarak değerlendirilen örnekler konfirmasyon testi uygulanır. Kloramfenikol A6 grubunda bulunan yasaklı ilaçlardır. Minimum gerekli performans limiti 0.3 ppb olarak belirlenmiştir.

2. Geri Alım Değeri

1. Kontrol numunesinin ve spaykların absorbansları karşılaştırılarak,
2. Standart ve spayk absorbansları karşılaştırılarak uygun bir geri alım yapıp yapılmadığına karar verilir.

7.9. Bu test metodunda geçerlilik için, 2002/657 AB direktifi uygulanır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. Anon. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması Ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı RG.
2. ANONİM (2002a), 2002/657 AB direktifi Implementing Council Directive 96/23 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
3. Bornova VKE Laboratuvar Güvenliği Prosedürü
4. Bornova VKE Laboratuvarda Güvenli Çalışma Talimatı
5. Bornova VKE Enstitü Atıklarının İmhası Talimatı
6. R-Biopharm RIDESCREEN Chloramphenicol, Enzyme Immunoassay for the quantitative analysis of chloramphenicol Art No:R1505

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

