

## Rapid Confirmation Analysis of Multiple Antibiotic Residues in Honey by LC-MS/MS

Nurullah ÖZDEMİR\*

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Tekirdağ Namık Kemal University, Tekirdağ, Türkiye

### ABSTRACT

Honey is a natural product containing high levels of sugar, amino acids, minerals, enzymes and vitamins and has been used as food and medicine for thousands of years. In terms of public health, honey should not contain any chemicals that may pose a health risk. Both pesticides used in agricultural areas around the apiary and drugs used in the treatment of bee diseases cause residue problems in honey. In the study, it was aimed to develop a method for rapid confirmation analysis of multiple antibiotic residues in honey samples using a two-stage liquid-liquid extraction method. With the developed method, sulphonamide (n:11), fluoroquinolone (n:2), phenicol (n:2) tetracycline (n:2) and macrolide (n:2) were used in honey samples. Screening and confirmation analyses can be performed for 19 antibiotic residues in 5 different antibiotic groups. The detection limits of the method are between 5.29 and 10.58 µg.kg<sup>-1</sup>, the accuracy values are between 86.9% and 119%, the coefficient of variation is between 1.26% and 16.33% and recovery is between 84% and 117.23%.

**Keywords:** Antibiotic, Confirmation, Honey, LC-MS/MS, Residue

\*\*\*

### Balda Çoklu Antibiyotik Kalıntılarının LC-MS/MS ile Hızlı Doğrulama Analizi

#### ÖZ

Bal, yüksek oranda şeker, aminoasit, mineral madde, enzim ve vitamin içeren, binlerce yıldır gıda ve ilaç olarak kullanılan doğal bir üründür. Halk sağlığı açısından, balda sağlık riski oluşturabilecek herhangi bir kimyasal maddenin bulunmaması gerekir. Gerek arılık çevresindeki tarımsal alanlarda kullanılan pestisitler, gerekse arı hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar, bal da kalıntı sorunlarının yaşanmasına neden olmaktadır. Çalışmada, iki farklı likit-likit ekstraksiyon metodu kullanılarak bal örneklerinde çoklu antibiyotik kalıntılarının hızlı doğrulama analizleri için metot geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen metotla, bal örneklerinde, sulfonamid (n:11), flourokinolon (n:2), fenikol (n:2) tetrasiklin (n:2) ve makrolid (n:2) olmak üzere 5 farklı antibiyotik grubunda 19 adet antibiyotik kalıntısı için tarama ve doğrulama analizleri yapılabilir. Metodun tespit limitleri 5,29 ile 10,58 µg.kg<sup>-1</sup>, doğruluk değerleri %86,9 ile %119 varyasyon katsayı değerleri %1,26 ile %16,33 ve geri kazanım oranları %85,4 ile %117,23 arasındadır.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik, Bal, Doğrulama, Kalıntı, LC-MS/MS

To cite this article: Özdemir N. Rapid Confirmation Analysis of Multiple Antibiotic Residues in Honey by LC-MS/MS  
Kocatepe Vet J. (2023):16(4):464-471

Submission: 25.07.2023 Accepted: 29.09.2023 Published Online: 27.10.2023

ORCID ID; NÖ: 0000-0003-4310-2077

\*Corresponding author e-mail: nozdemir@nku.edu.tr

## GİRİŞ

Bal, yüksek oranda şeker, aminoasit, mineral madde, enzim ve vitamin içeren, binlerce yıldır gıda ve ilaç olarak kullanılan doğal bir üründür (Ball, 2007). Halk sağlığı açısından, balda sağlık riski oluşturabilecek herhangi bir kimyasal maddenin bulunmaması gerekir. Gerek arılık çevresindeki tarımsal alanlarda kullanılan pestisitler, gerekse arı hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar, bal da kalıntı sorunlarının yaşanmasına neden olmaktadır (Lambert ve ark., 2013)

Balarısı kolonileri de diğer canlılarda olduğu gibi bakteri, virüs, protozoa ve paraziter etkenler tarafından etkilenebilmektedirler (Chantawannakul ve ark., 2016). Özellikle bakteriyel kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kloramfenikol, nitrofuranlar, nitroimidazoller, tetrasiklinler, sulfonamidler, streptomisin, fumagillin ve florokinolon grubu antibiyotikler kullanılabilir. Bu tür ilaçlarla tedavi edilen arı kolonilerinden elde edilen ballarda, kalıntı problemi ile karşılaşabilmektedir (Chiesa ve ark., 2016). Tetrasiklinlerin yarı ömürleri, tetrasiklinin türevine, dozuna veya uygulama şekline bağlı olarak 9 gün ile 8 hafta arasında olduğu saptanmıştır (Reybroeck ve ark., 2012). Stabilitelerinin yüksek olması nedeniyle streptomisin, sulfonamidler ve linkomisin için, 10 ay sonra bile mg/kg seviyelerinde kalıntıları tespit edilmiştir. Benzer bulgular, yüksek konsantrasyonların tespit edildiği fluorokinolon kalıntıları için de gözlenmiştir (Varenina ve ark., 2023).

Bu durum özellikle dış piyasaya ihraç edilen ballarda oldukça önem arz etmektedir. Yapılan analizlerde balda herhangi bir ilaç kalıntısının tespit edilmesi ve bu durumun sürekli olması durumunda, ülkemizin dış ticaretinde itibar kaybı yaşanmasına neden olmaktadır.

AB tarafından yayınlanan 37/2010 yönetmeliğinde antibiyotikler dahil olmak üzere tüm veteriner tıbbi ürünlerin hayvansal gıda maddelerindeki maksimum kalıntı limitleri listelenmiştir. Bu yönetmeliğe göre balda herhangi bir antibiyotik kalıntısı için limit belirlenmemiştir (CR, 2010). Bazı ülkelerde (Japonya, Avustralya ve Kanada) balda oksitetrasiklin için 300 µg.kg<sup>-1</sup> Maksimum Kalıntı Limiti (MRL) belirlenmiştir (Moretti ve ark., 2017). Avrupa Birliği, Ortak Referans Laboratuvarı (CRL) tarafından yayınlanan teknik kılavuzda balda önerilen konsantrasyonlar (RC'ler) tetrasiklinler (20 µg.kg<sup>-1</sup>), sulfonamidler (50 µg.kg<sup>-1</sup>), streptomisin (40 µg.kg<sup>-1</sup>) ve makrolidler (tylosin ve eritromisin, 20 µg.kg<sup>-1</sup>) verilmiştir. Bununla birlikte, bu RC'lerin gerçek bir yasal dayanağı bulunmamaktadır (CRL, 2007)

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından AB direktiflerine uygun olarak yayınlanan Türk Gıda Kodeksine göre hayvansal gıdalarda bazı maddeler için maksimum

kalıntı limitleri belirlenmiş, bunların dışında herhangi bir ilaç kalıntısı bulunmasına izin verilmemiştir (Resmî Gazete, 2017). Ülkemizde üretilen balların bu yönetmelikte belirlenen limitlere uygun olarak üretilmesi gerekir. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yıllık olarak yayınlanan Kalıntı İzleme Genelgesi kapsamında tüm illerde üretilen ballarda kalıntı analizleri gerçekleştirilmektedir. Kalıntı tespit edilen örneklerin alındığı üreticiler, izlemeye alınmakta, tekrar kalıntı tespit edildiğinde yasal işlemler uygulanmaktadır.

Balda antibiyotik kalıntı analizlerinde likit-likit ekstraksiyon (LLE) (Chen ve ark., 2009), katı faz ekstraksiyon (Solid Phase Extraction, SPE) (Xu ve ark., 2016) ve QuChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) (Yang ve ark., 2022) gibi metotlar kullanılmaktadır. Tarama amaçlı olarak ELİSA (Mahmoudi ve ark., 2014), Charm II (Salter, 2003), Chemiluminescence (Wutz ve ark., 2011) gibi testler kullanılırken, doğrulama amaçlı olarak ultraviyole (UV) (Bargańska ve ark., 2011), floresans (FD) (Peres ve ark., 2010), kütle spektrometri (MS) (Lopez ve ark., 2008) gibi detektörler tercih edilmektedir. Bu cihazlar içerisinde en hassas duyarlılığa sahip olan ve doğrulama analizlerinde tercih edilen cihaz LC-MS/MS cihazıdır.

Çalışmamızın amacı, iki likit-likit ekstraksiyon metodu kullanılarak bal örneklerinde çoklu antibiyotik kalıntılarının hızlı doğrulama analizleri için metot geliştirmektir. Geliştirilen metot, hızlı ve ekonomik, aynı zamanda çoklu antibiyotik kalıntısı doğrulama metodu olarak kullanılabilir.

## MATERYAL ve METOT

### Standart maddeler

Çalışmada kullanılan standart maddeler ve saflık yüzdeleri tablo 1'de gösterilmiştir. Tüm standart maddelerin saflık yüzdeleri %93'ün üzerindedir ve Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

### Çözeltiler

**Mobil faz A:** Diyonize su; %0,01 formik asit (FA), 1 mM okzalik asit (OA), 1 mM amonyum format

**Mobil Faz B: Asetonitril** %0,02 Formik asit Mobil faz gradient akış program tablo 2 'de olduğu gibidir.

**Stok standart çözeltisi (S<sub>0</sub>):** Her bir standart maddeden ayrı ayrı olmak üzere, 10 ml'lik balon jöjelere 10 mg tartıldı ve üzeri 10 ml çizgisine kadar metanolla tamamlandı. Bütün stok standart çözeltiler -18°C'de muhafaza edildi.

**Tablo 1.** Antibiyotik Standartları ve Saflık Yüzdeleri  
**Table 1.** Antibiotic Standards and Purities (%)

No	ANTİBİYOTİK ADI	SAFLIK %	ÜRETİCİ FİRMA
1	Dapson	≥99,5	Sigma-Aldrich
2	Enrofloksasin	≥99,8	Sigma-Aldrich
3	Eritromisin	≥93,0	Sigma-Aldrich
4	Florfenikol	≥99,5	Sigma-Aldrich
5	Kloramfenikol	≥99,9	Sigma-Aldrich
6	Norfloksasin	≥99,8	Sigma-Aldrich
7	Oksitetrasiklin	≥94,9	Sigma-Aldrich
8	Sulfakloropiridazin	≥99,7	Sigma-Aldrich
9	Sulfadiazin	≥99,8	Sigma-Aldrich
10	Sulfadimetoksin	≥99,7	Sigma-Aldrich
11	Sulfadoksin	≥98,0	Sigma-Aldrich
12	Sulfamerazin	≥98,0	Sigma-Aldrich
13	Sulfametazin	≥99,6	Sigma-Aldrich
14	Sulfametoksazol	≥99,9	Sigma-Aldrich
15	Sulfapiridin	≥98,0	Sigma-Aldrich
16	Sulfaküinoksalin	≥97,8	Sigma-Aldrich
17	Sulfatiazol	≥98,0	Sigma-Aldrich
18	Tetrasiklin	≥95,0	Sigma-Aldrich
19	Tilozin	≥95,5	Sigma-Aldrich

#### **S<sub>2</sub> standart çalışma çözeltisi (100 µg/ml):**

Her bir standart stok çözeltiden 0,1 ml 10 ml'lik balona alınarak metanolle 10 ml'ye tamamlandı. Analizlere kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi. Hazırlanan bu çözelti, MS detektörde referans standartları tanımlamak için kullanılmıştır.

#### **Örneklerin Ekstraksiyonu**

##### **Asidik ekstraksiyon**

Bal örneği 40 °C de ısıtılarak hazır hale getirildi. 1 g bal tartılarak 50 ml lik polipropilen tüpe alındı. 3 g NaCl, 3,75 ml McIlvaine Buffer (pH 3) ve 75 ml 0,1 M etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) eklenip karıştırıldı. Karışımın üzerine 10 ml asetonitril eklenip 5 dk vortekslenildi. Ardından 60 °C de 20 dk ultrasonik banyoda tutuldu.

**Tablo 2.** Mobil faz gradient akış programı

**Table 2.** Mobile phase gradient flow program

Akış süresi	Mobil Faz A	Mobil Faz B
0-5	90	10
5-7	85	15
7-11	80	20
11-15	60	40
15-16	40	60
16-20	90	10

4000 rpm de 30 dk santrifüj edildi. Üst fazdan 9 ml alınıp azot altında uçuruldu. 500 µl mobil faz A/B (80-20 v/v) karışımı ile çözdürüldü. 0,2 µm filtrelerden geçirilerek vialere alındı.

##### **Bazik ekstraksiyon**

Bal örneği, 40°C de ısıtılarak hazır hale getirildi. 2 g bal tartılarak 50 ml'lik polipropilen tüpe alındı. 2 g NaCl ve 2 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=8) ve 3,75 ml 0,1 M EDTA eklendi ve iyice vortekslenildi. Karışımın üzerine 10 ml asetonitril eklenip tekrar vorteksle karıştırıldı. Daha sonra 60°C de 20 dk ultrasonik banyoda tutuldu. 4000 rpm de 30 dk santrifüj edildi. Üst fazdan 9 ml alınarak azot altında uçuruldu. 500 µl mobil faz A/B (80-20 v/v) karışımı ile çözdürüldü. 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek vialere alındı.

##### **MS/MS Şartları**

Kütle spektrofotometri dedektörü olarak AB Sciex 3200 QTRAP (AB Sciex, Foster City, USA) kullanıldı. UHPLC, kütle spektrofotometri dedektörüne bağlı olarak çalışmaktadır. Analitik ayırım için Agilent Poroshell 120 SB, C18, 2,7 µm, 100x3,0 mm. kolonu kullanıldı. Akış hızı 0,3 ml/dk olarak ayarlandı.

İyonizasyon, pozitif ve negatif iyon modunda ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) modülü kullanılarak gerçekleştirildi. Tarama tipi, MRM (Multiple Reaction Monitoring) olarak ayarlandı. Kapillar voltaj 4500 V, azot gazının kullanıldığı curtain gas (30 psi), collision gas (medium) ve İon Source gas (50 psi) olarak ayarlandı. TurboIonSprey modülünün sıcaklığı 500 °C'de sabitlendi. Analite bağımlı parametreler; DP (declustering potansiyeli), CE (çarpışma enerjisi) ve CXP (hücre çıkış potansiyeli) için her bir standart maddenin 0,1 mg/kg içeren çalışma standart çözeltisi kullanıldı. Her bir analite ait MS/MS dedektör parametreleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

## **BULGULAR**

Metot validasyonu için seçicilik/hassasiyet, doğrusalılık, tespit limiti (Limit of Detection, LOD), ölçüm limiti (Limit of Quantitation, LOQ), doğruluk ve geri kazanım parametreleri hesaplandı.

**Tablo 3.** MS/MS dedektör parametreleri  
**Table 3.** MS/MS detector parameters

Analitler	Q1 (Da)	Q3 (Da)	DP (volts)	EP (volts)	CEP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Dapson	294,10	156,00*	81,000	5,000	14,000	17,000	4,000
		108,00	81,000	5,000	14,000	29,000	4,000
Enrofloksasin	360,12	316,30*	61,000	10,000	26,000	21,000	6,000
		245,20	61,000	10,000	26,000	29,000	4,000
Eritromisin	734,38	158,30	56,00	5,50	28,000	35,000	4,000
		83,10	56,00	5,50	28,000	69,000	4,000
Florfenikol	248,05	230,10*	31,000	7,500	14,000	15,000	4,000
		130,10	31,000	7,500	14,000	33,000	4,000
Kloramfenikol	320,88	257,20*	45,000	4,500	22,000	10,000	2,000
		237,10	45,000	4,500	22,000	26,000	8,000
Norfloksasin	320,14	302,20*	56,000	7,500	24,000	27,000	6,000
		230,90	56,000	7,500	24,000	51,000	4,000
Oksitetrasiklin	461,04	426,10*	46,000	6,000	22,000	21,000	6,000
		201,20	46,000	6,000	22,000	49,000	4,000
Sulfakloropiridazin	285,10	156,20*	71,000	8,000	16,000	17,000	4,000
		108,10	71,000	8,000	16,000	33,000	4,000
Sulfadiazin	251,06	156,10*	51,000	7,000	14,000	19,000	4,000
		108,10	51,000	7,000	14,000	31,000	4,000
Sulfadimetoksin	311,07	156,20*	61,000	8,500	16,000	23,000	4,000
		108,20	61,000	8,500	16,000	35,000	4,000
Sulfadoksin	311,06	156,10*	51,000	5,500	18,000	23,000	4,000
		108,20	51,000	5,500	18,000	33,000	4,000
Sulfamerazin	265,07	108,00*	46,000	8,500	14,000	33,000	4,000
		156,00	46,000	8,500	14,000	21,000	4,000
Sulfametazin	279,07	124,10*	41,000	5,000	18,000	33,000	4,000
		186,20	41,000	5,000	18,000	19,000	6,000
Sulfametoksazol	254,09	156,10*	46,000	5,500	14,000	19,000	4,000
		108,10	46,000	5,500	14,000	33,000	4,000
Sulfapiridin	250,13	156,10*	51,000	5,000	14,000	21,000	4,000
		108,10	51,000	5,000	14,000	33,000	4,000
Sulfaküinoksalin	301,03	156,10*	51,000	4,500	16,000	21,000	4,000
		92,10	51,000	4,500	16,000	39,000	4,000
Sulfatiazol	255,98	156,10*	46,000	6,500	14,000	17,000	4,000
		108,20	46,000	6,500	14,000	31,000	4,000
Tetrasiklin	445,10	410,00*	71,000	10,000	20,000	21,000	6,000
		154,10	71,000	10,000	20,000	33,000	4,000
Tilozin	916,34	174,20*	91,000	10,000	40,000	49,000	6,000
		101,20	91,000	10,000	40,000	65,000	4,000

\*Konfirmasyon iyonu

**DP:** Declustering Potential, **EP:** Entrance Potential, **CEP:** Cell Exit Potential, **CE:** Collision Energy, **CXP:** Collision Cell Exit Potential

**Spesifiklik/seçicilik (Specificity):** Boş numuneler, farklı standart maddeler yüklenerek analiz edildi; alıkonma sürelerinde herhangi bir girişim gözlenmedi. Analiz yönteminin seçicilik/duyarlılık açısından uygun olduğu sonucuna varıldı.

**Doğrusallık (Linearity):** Dört farklı konsantrasyon kullanılarak yapılan altı paralel analiz sonucunda her bir standart madde için kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Her standart maddenin kalibrasyon eğrisindeki  $r^2$  değeri 0,9954–0,9999 arasında bulundu (Tablo 4).

**Tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ):** Tespit limitini ve ölçüm limitini belirlemek için  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  konsantrasyonu kullanılarak 10 paralel analiz

yapılmıştır, Elde edilen sonuçlar Tablo 4'de gösterilmiştir. Oksitetrasiklinde  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  konsantrasyonlar tespit edilemediğinden tespit limiti olarak ikinci konsantrasyon noktası olan  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  konsantrasyondan elde edilen veriler kullanılmıştır.

**Doğruluk:** Doğruluk verileri, linearite ve geri kazanım çalışmalarından elde edilen verilerle hesaplanmıştır ve Tablo 4'de gösterilmiştir.

**Geri Kazanım:** Geri kazanımı belirlemek için 5, 10, 20 ve  $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$  konsantrasyonlar kullanılarak boş örneklere yükleme yapılarak analizler gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Bal örneklerinde tespit limiti, hesaplama limiti, linearite, doğruluk ve geri kazanım oranları  
**Table 4.** Detection limit, quantification limit, linearity, accuracy and recovery in honey samples

Analitler	Tespit Limiti (LOD) ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Hesaplama Limiti (LOQ) ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Linearite ( $r^2$ )	Yükleme miktarı ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Ölçüm (ort) ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	RSD %	Doğruluk %	Geri Kazanım %
Dapson	6,14	8,54	0,9973	5	5,1	6,73	109	102,1
				10	10,28	11,04	91,6	102,78
				20	18,76	8,92	96,2	93,78
				40	37,80	7,18	103	94,5
Enrofloksasin	6,22	8,52	0,9954	5	5,23	6,28	93,7	104,64
				10	9,90	8,04	112	98,96
				20	18,35	6,94	92,4	91,76
				40	38,74	5,73	101	96,86
Eritromisin	8,24	12,74	0,9997	5	6,31	10,18	103	106,28
				10	9,31	11,07	97,1	93,06
				20	19,53	9,78	98,6	97,63
				40	36,16	6,43	101	93,39
Florfenikol	6,99	9,62	0,9954	5	5,86	6,41	102	117,23
				10	9,76	13,35	91,3	97,58
				20	22,17	11,00	110	110,85
				40	40,67	8,22	97,1	101,68
Kloramfenikol	5,43	6,34	0,9982	5	5,04	2,59	92,3	100,71
				10	11,08	6,10	109	110,83
				20	20,38	5,04	100	101,86
				40	40,04	3,71	98,7	100,11
Norfloksasin	6,52	9,12	0,9998	5	5,42	6,84	97,8	108,3
				10	10,18	2,87	101	101,83
				20	21,98	6,11	102	109,92
				40	39,70	3,45	99,0	99,25
Oksitetrasiklin	10,58	24,32	0,9987	10	10,58	12,98	92,1	105,83
				20	21,19	7,37	101	105,94
				40	43,38	14,71	101	108,46
Sulfakloropiridazin	6,59	9,79	0,9988	5	5,23	8,73	94,1	104,5
				10	10,22	7,78	107	102,2
				20	20,08	3,94	115	100,42
				40	40,53	5,48	99,0	101,32
Sulfadiazin	6,89	17,47	0,9999	5	6,89	15,34	119	107,9
				10	12,2	15,37	87,0	102
				20	17,83	10,36	86,9	89,17
				40	35,47	15,53	107	88,66
Sulfadimetoksin	5,47	7,04	0,9990	5	4,80	4,68	102	95,93
				10	10,12	2,97	101	101,16
				20	20,03	2,41	95,1	100,13
				40	39,60	3,42	102	99

Sulfadoksin	5,15	5,65	0,9982	5	4,94	1,45	97,4	98,73
				10	10,06	2,48	107	100,66
				20	20,23	3,24	94,6	101,14
				40	37,89	2,71	101	94,71
Sulfamerazin	5,93	8,37	0,9988	5	4,88	7,15	93,9	97,63
				10	9,91	4,18	105	99,12
				20	20,4	4,10	102	102
				40	41,05	5,26	98,1	102,63
Sulfametazin	5,46	8,23	0,9991	5	4,27	9,28	95,6	85,4
				10	10,40	7,28	107	103,99
				20	20,93	3,52	98,0	104,67
				40	38,75	2,76	99,9	96,88
Sulfametoksazol	5,29	7,26	0,9995	5	4,44	6,33	96,4	88,87
				10	9,20	5,90	104	91,95
				20	19,50	6,13	86,9	97,50
				40	40,84	4,80	99,4	102,11
Sulfapiridin	6,02	7,92	0,999	5	5,21	5,21	101	104,13
				10	9,94	5,20	99,0	99,38
				20	20,23	1,35	100	101,17
				40	39,57	1,26	100	98,92
Sulfaküinoksalin	6,22	8,32	0,9993	5	5,32	5,64	105	106,43
				10	10,38	1,87	94,5	103,83
				20	20,18	3,92	99,5	100,89
				40	38,88	2,79	101	97,21
Sulfatiazol	6,25	8,84	0,9994	5	5,14	7,18	104	102,87
				10	10,02	6,62	99,0	100,17
				20	19,46	3,92	94,3	97,28
				40	38,58	4,57	103	96,46
Tetrasiklin	7,89	13,94	0,9994	5	5,30	16,33	95,8	105,96
				10	9,18	10,20	105	91,78
				20	17,20	5,31	72,6	86
				40	36,32	6,97	99,3	90,79
Tilozin	5,74	7,94	0,9997	5	4,79	6,58	97,6	95,85
				10	10,05	5,95	101	100,51
				20	20,01	3,86	102	100,07
				40	39,77	3,17	99,0	99,43

## TARTIŞMA

Kıvrak ve ark tarafından bal örneklerinde 23 adet veteriner tıbbi ürün eşzamanlı olarak belirlemesi amacıyla ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile UPLC–ESI–MS/MS cihazı kullanılarak hızlı bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde üç farklı antibiyotik grubu (fenikol, sulfonamid ve tetrasiklin) kullanılmış, tespit limiti 0,14 ile 0,54  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  arasında belirlenmiştir, bizim geliştirdiğimiz metotta beş farklı antibiyotik grubundan (fenikol, sulfonamid, florokinolon, aminoglikosid, makrolid ve tetrasiklin) 19 veteriner tıbbi ürün için tespit limitleri 5,29 ile 10,58  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  arasındadır. Tespit limiti değerlerinin bizim değerlere göre daha düşük olması, kullanılan cihazın farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Kıvrak ve ark., 2016).

Havari ve ark. tarafından balda çoklu antibiyotik kalıntılarının (sulfonamidler, tetrasiklinler, makrolidler, linkozamidler ve aminoglikozitler) tayini için yeni, basit ve hızlı bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir.

Analitlerin geri kazanım oranları %85 ile %111 arasında değişmektedir. Karar limiti ( $CC_{\alpha}$ ) ve saptama limiti ( $CC_{\beta}$ ) 6 ile 9  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  arasında değişmektedir. Streptomisin 13  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ve neomisin 25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  biraz daha yüksek limit tespit edilmiştir. Bizim metotta elde edilen tespit limitleri 5,29 ile 10,58  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  arasındadır. Tespit limitleri arasında önemli bir farkın olmadığı görülmektedir. Geri kazanım oranları %85,4 ile %117,23 arasında değerler, aynı çalışmanın geri kazanım değerleri ile paralel olduğu görülmektedir (Havari ve ark., 2017).

Louppis ve ark. tarafından geliştirilen metot, LC-MS/MS kullanarak baldaki antibakteriyel kalıntıların saptanması ve miktarının belirlenmesi için hızlı ve basit bir yöntemdir. Ekstraksiyon yöntemi bizim çalışmamıza benzer şekilde iki aşamalıdır. Geliştirilen metot, otuz altı farklı antibiyotik ve dört farklı aileden (sulfonamidler, tetrasiklinler, amfenikoller, florokinolonlar) ve bazı bireysel antibiyotikler (penisilin G, trimetoprim ve tiamulin) içindir. Karar limitleri ( $CC_{\alpha}$ ) 0,1 ile 9,2  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , tespit limitleri ( $CC_{\beta}$ )

## SONUÇ

0,3 ila 27,6 µg.kg<sup>-1</sup>, geri kazanım oranları %65,0 ile %116,1 arasındadır. Metot performans parametreleri ile çalışmamızın parametreleri ile arasında önemli bir fark olmadığı görülmektedir (Louppis ve ark., 2017).

Lopez ve ark. tarafından balda tetrasiklinler (klortetrasiklin, doksisisiklin, oksitetrasiklin ve tetrasiklin), florokinolonlar (siprofloksasin, danofloksasin, difloksasin, enrofloksasin ve sarafloksasin), makrolidler (tilozin), linkozamidler (lincomycin), aminoglikositler (streptomisin), sülfonamidlerin (sulfathiazol), fenikoller (kloramfenikol) ve fumagillin kalıntılarının tayini ve doğrulanması için sıvı kromatografi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak çoklu bir yöntem geliştirilmiştir. Eritromisin (makrolid) ve monensin (iyonofor) saptanabilir ve doğrulanabilir ancak miktarı ölçülemez. Metodun doğruluk (accuracy) değerleri %65 ila %104 arasında ve varyasyon katsayı değerleri (RSD) %17'den düşüktür. Çalışmamızdaki doğruluk değerleri %86,9 ile %119 arasında, varyasyon katsayı değerleri %1,26 ile %16,33 olduğu ve bu çalışmaya benzer şekilde %17 den küçük olduğu görülmektedir (Lopez ve ark., 2008).

Vidal ve ark. tarafından balda farklı veteriner ilaç kalıntılarının (makrolidler, tetrasiklinler, kinolonlar ve sülfonamidler) ultra performanslı sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (UPLC-MS/MS) ile eş zamanlı analizi için bir yöntem geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Ekstraksiyon yönteminde bizim metottan farklı olarak katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanmışlardır. Metodun ortalama geri kazanım değerleri, üç konsantrasyon seviyesinde (10, 50 ve 100 µg.kg<sup>-1</sup>), %70 ile %120, varyasyon katsayı değerleri %20'den az ve ölçüm limitleri (LOQ'lar) 4 µg.kg<sup>-1</sup> 'dan düşük olarak elde edilmiştir. Geri kazanım oranları ve varyasyon katsayı değerleri bizim metot verileri ile benzerlik göstermekte, ölçüm limitleri ise daha düşük olduğu görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan cihazın, bizim çalışmamızda kullanılan cihazdan daha hassas olduğu düşünülmektedir (Vidal ve ark., 2009).

Wutz ve ark tarafından otomatik bir akış enjeksiyon sistemi ile birlikte yeniden üretilebilir antijen mikrodizilerini kullanarak bal örneklerinde antibiyotik türevlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için metot geliştirmişlerdir. Metot, mikrodizinin yüzeyine bağlı monoklonal antikorlar kullanan dolaylı bir rekabetçi immünoanaliz formatına dayanmaktadır. Geliştirilen metodun, geri kazanımlar oranları enrofloksasin (%92 ± %6), sülfametazin (%130 ± %21), sülfadiazin (%89 ± %20) ve streptomisin (%93 ± %4) yeterli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen chemiluminescence metodu, bizim geliştirdiğimiz metottan farklı bir metottur (Wutz ve ark., 2011).

Sonuç olarak, iki farklı likit-liket ekstraksiyon metodu kullanılarak geliştirilen LC-MS/MS doğrulama analiz metodu, bal örneklerinde çoklu antibiyotik kalıntılarının tespit edilmesinde kullanılabilir. Geliştirilen metot, diğer katı faz ekstraksiyon metodlarına göre daha hızlı ve ekonomik, aynı zamanda altı farklı gruptan antibiyotikleri içeren doğrulama metodu olarak tarama ve doğrulama analizlerinde kullanılabilir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

**Etik İzin:** Bu çalışma "Hayvan Deneyleti Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir.

**Finansal Destek:** --

**Yazarların Katkı Oranı:** Nurullah Özdemir, çalışmanın proje fikrine, tasarımına ve yürütülmesine katkıda bulundu, verilerin toplanmasına katkıda bulundu, verileri analiz etti, taslağı tasarladı ve yazdı, makaleyi eleştirel olarak inceledi. Yazar, son halini alan metni okudu ve onayladı.

## KAYNAKLAR

- Ball, D.W. (2007).** The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education*, 84(10), 1643. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed084p1643>
- Bargańska, Ż., Namieśnik, J., & Ślebioda, M. (2011).** Determination of antibiotic residues in honey. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7), 1035-1041. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.014>
- Commission Regulation (CR). (2010).** No 37/2010 of 22 December 2009. Official Journal of the European Communities. 2010; L15: 1-72. doi:10.3000/17252555.L\_2010.015.eng [Erişim Tarihi:22.07.2023]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=OJ:L:2010:175:FULL&from=SL>
- Community Reference Laboratories (CRL). (2007).** Guidance Paper, CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans (7 December 2007). [Erişim Tarihi:22.07.2023]. [http://www.media-bank.co.kr/board\\_data/Erythromycin%20CRL%20guidance%202007.pdf](http://www.media-bank.co.kr/board_data/Erythromycin%20CRL%20guidance%202007.pdf)
- Chantawannakul, P., de Guzman, L.I., Li, J., & Williams, G.R.** Parasites, pathogens, and pests of honeybees in Asia. *Apidologie* 47, 301-324 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0407-5>
- Chen, H., Chen, H., Ying, J., Huang, J., & Liao, L. (2009).** Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. *Analytica*

chimica acta, 632(1), 80-85.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.068>

- Chiesa, L. M., Panseri, S., Nobile, M., Ceriani, F., & Arioli, F. (2018).** Distribution of POPs, pesticides and antibiotic residues in organic honeys from different production areas. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(7), 1340-1355.  
<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/19440049.2018.1451660?needAccess=true&role=button>
- El Hawari, K., Mokh, S., Doumyati, S., Al Iskandarani, M., & Verdon, E. (2017).** Development and validation of a multiclass method for the determination of antibiotic residues in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(4), 582-597.  
<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/19440049.2016.1232491?needAccess=true&role=button>
- Kivrak, I., KIVRAK, Ş., & Harmandar, M. (2016).** Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Science and Technology*, 36, 90-96.  
<https://www.scielo.br/j/cta/a/GqkpZ8mXfNpPhZ3jXqDS5Ls/>
- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., L'Hostis, M., Wiest, L., ... & Pouliquen, H. (2013).** Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. *PloS one*, 8(6), e67007.  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0067007>
- Lopez, M. I., Pettis, J. S., Smith, I. B., & Chu, P. S. (2008).** Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), 1553-1559.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf073236w>
- Louppis, A.P., Kontominas, M. G., & Papastephanou, C. (2017).** Determination of antibiotic residues in honey by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 10, 3385-3397.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-017-0899-x>
- Mahmoudi, R., Norian, R., & Pajohi-Alamoti, M. (2014).** Antibiotic residues in Iranian honey by ELISA. *International journal of food properties*, 17(10), 2367-2373.
- Moretti, S., Saluti, G., & Galarini, R. (2017).** Residue Determination in Honey. In *Tech*. doi: 10.5772/67135  
<https://academic.oup.com/jaoac/article/92/3/975/5655938?login=false>
- Peres, G. T., Rath, S., & Reyes, F. G. R. (2010).** A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. *Food control*, 21(5), 620-625.
- Resmî Gazete. (2017).** 07.03.2017 Tarih ve 30000 sayılı. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. [Erişim Tarihi:22.07.2023].<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/03/20170307-4.htm>
- Reybroeck, W., Daeseleire, E., De Brabander, H. F., & Herman, L. (2012).** Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary microbiology*, 158(1-2), 1-11.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113512000326>
- Salter, R. (2003).** Charm II system-comprehensive residue analysis system for honey. *Apiacta*, 38, 198-206.  
<http://charmdev-websitetestlink.charm.com/wp-content/uploads/2018/06/EX-0162.pdf>
- Varenina, I., Bilandžić, N., Luburić, Đ. B., Kolanović, B. S., Varga, I., Sedak, M., & Đokić, M. (2023).** Determination of quinolones, macrolides, sulfonamides and tetracyclines in honey using QuEChERS sample preparation and UHPLC-MS/MS analysis. *Food Control*, 148, 109676.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109676>
- Vidal, J. L. M., Aguilera-Luiz, M. D. M., Romero-Gonzalez, R., & Frenich, A. G. (2009).** Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1760-1767.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8034572>
- Wutz, K., Niessner, R., & Seidel, M. (2011).** Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays. *Microchimica Acta*, 173, 1-9.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-011-0548-9>
- Xu, J. J., An, M., Yang, R., Tan, Z., Hao, J., Cao, J., & Cao, W. (2016).** Determination of tetracycline antibiotic residues in honey and milk by miniaturized solid phase extraction using chitosan-modified graphitized multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2647-2654.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.6b00748>
- Yang, Y., Lin, G., Liu, L., & Lin, T. (2022).** Rapid determination of multi-antibiotic residues in honey based on modified QuEChERS method coupled with UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 374, 131733.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131733>