

Sütte Glukokortikoidlerin analizi için metot karşılaştırması

Gülay Dudaklı^{1*}, Handan Vural²

^{1,2} İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 20.04.2024, Kabul Tarihi / Accepted: 25.06.2024

Özet: Betametazon, deksametazon, prednizolon ve metilprednizolon büyükbaş hayvanlarda glukokortikoidlere duyarlı çeşitli akut ve kronik hastalıklarda yaygın olarak kullanılan sentetik glukokortikoidlerdir. Glukokortikoidler sütte kalıntı yapmaları sonucu insanlarda ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Bu çalışmada, sütte glukokortikoidlerin belirlenmesine yönelik hassas metodun seçilebilmesi için sıvı-sıvı ekstraksiyon (liquid liquid extraction, LLE), katı faz ekstraksiyon (solid phase extraction, SPE) ve dispersif katı faz ekstraksiyon (dispersive solid phase extraction, DSPE) metotları karşılaştırılmış ve en hassas metot seçilerek metodun performans özelliklerinin belirlemek için geçerli kılma çalışmaları yapılmıştır. Kromatografik ayırım, Diyot Dizi Dedektörü (Diode Array Detector, DAD) ile bütünlük Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ile gerçekleştirilmiştir. Betametazon 0,12 µg/kg, 0,3 µg/kg, 0,45 µg/kg seviyesinde analit eklenmiş örneklerin geri alımı %97 ila %102 arasında, deksametazon 0,12 µg/kg, 0,3 µg/kg, 0,45 µg/kg seviyesinde analit eklenmiş örneklerin geri alımı %97 ila %102 arasında, metilprednizolon 0,2 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg seviyesinde analit eklenmiş örneklerin geri alımı %94 ila %100 arasında, prednizolon 0,6 µg/kg, 6 µg/kg, 9 µg/kg seviyesinde analit eklenmiş örneklerin geri alımı %97 ila %99 arasında değişmiştir. C8 kartuş ile valide edilmiş ekstraksiyon yöntemi, sütte deksametazon, betametazon, prednizolon ve metilprednizolonun kantitatif taraması için güvenilir ve basit bir metot olup günlük laboratuvar kullanımına uygun olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: dispersif katı faz ekstraksiyon, HPLC, katı faz ekstraksiyon, sıvı sıvı ekstraksiyon, süt

Comparison of methods for the analysis of Glucocorticoids in milk

Abstract: Betamethasone, dexamethasone, prednisolone and methylprednisolone are synthetic glucocorticoids that are widely used in various acute and chronic diseases sensitive to glucocorticoids in cattles. Glucocorticoids can cause serious health problems in humans as a result of residues in milk. In this study, in order to choose the sensitive method for the determination of glucocorticoids in milk, liquid-liquid extraction(LLE), solid phase extraction(SPE) and dispersive solid phase extraction(DSPE) methods were compared and the most sensitive method was selected and validation studies were carried out to determine the performance specifications of the method. Chromatographic separation was performed by Agilent 1100 series High Performance Liquid Chromatography (HPLC) combined with Diode Array Detector (DAD). The recovery of samples spiked with betamethasone 0.12 µg/kg, 0.3 µg/kg, 0.45 µg/kg ranged from 97% to 102%, the recovery of samples spiked with dexamethasone 0.12 µg/kg, 0.3 µg/kg, 0.45 µg/kg ranged from 97% to 102%, the recovery of samples spiked with methylprednisolone analyte at 0.2 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg ranged from 94% to 100%, and the recovery of samples spiked with prednisolone at 0.6 µg/kg, 6 µg/kg, 9 µg/kg ranged from 97% to 99%. The validated extraction method using the C8 cartridge is a reliable and simple method for the quantitative screening of dexamethasone, betamethasone, prednisolone and methylprednisolone in milk and may be suitable for routine laboratory use.

Keywords: dispersive solid phase extraction, HPLC, liquid liquid extraction, milk, solid phase extraction

Giriş

Glukokortikoidler, adrenal korteks tarafından salgılanan metabolizma ve bağışıklık fonksiyonlarının yürütülmesini düzenleyen steroid hormonlardır (Luo ve ark., 2005; Dirikolu, 2013). Sentetik glukokortikoidler, doğal bir glukokortikoid olan kortizolün kimyasal yapısında yapılan modifikasyonlar ile anti-inflamatuar gücü artırılıp ve mineralokortikoid etkileri azaltılarak geliştirilmiştir (Buchwald ve Bodor, 2004;

Schimmer ve Funder, 2022). Geniş fizyolojik ve farmakolojik etkilerinin bir sonucu olarak, glukokortikoidler en çok kullanılan veteriner ilaç sınıflarından biridir. Sentetik glukokortikoidlerin büyükbaş hayvanlarda enfeksiyöz, metabolik ve inflamatuvar hastalıklardaki terapötik uygulamaların yanı sıra; buzağılarda, boğalarda ve üretken döngülerinin sonundaki yaşlı ineklerde büyüme destekleyicileri olarak kullanımları yaygındır (Courtheyn ve ark., 2002). Gluko-

kortikoidler, insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen immunosupresyon, osteoporoz, obezite ve diyabet gibi birçok yan etkiye neden olduklarından süt gibi hayvansal gıdalardaki kalıntılarının tespiti önem arz etmektedir (Schacke, Döcke ve Asadullah, 2002). Terapötik endikasyonları nedeniyle, hayvan yetiştiriciliğinde deksametazon, betametazon, prednizolon ve metilprednizolonun uygulanmasına izin verilmektedir ve Avrupa Birliği düzenlemeleri ile uyumlu olarak Türkiye'de tüketime yönelik süt ve hayvansal dokularda maksimum rezidü limitleri (MRL) belirlenmiştir. Sütte MRL değerleri betametazon ve deksametazon için 0,3 µg/kg, prednizolon ve metilprednizolon için ise sırasıyla 6 µg/kg ve 2 µg/kg'dır (TC Tarım ve Orman Bakanlığı, 2017).

Glukokortikoidlerin sütte tespiti için birçok metot geliştirilmiştir (Guo ve ark., 2024; Caretti ve ark., 2010; Malone, Elliott, Kennedy ve Regan, 2010). Bu çalışmanın amacı glukokortikoidlerin sütte tespiti için tercih edilen metotlardan sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyon ve yeni nesil yaklaşımlardan dispersif katı faz ekstraksiyon metotlarının karşılaştırılarak en hassas metodun validasyonunu gerçekleştirmektir.

Katı Faz Ekstraksiyon; analitin, katı faz (sorbent) ile analiti içeren sıvı faz arasında dağılım katsayısına uygun olarak bölünmesi, analitin katı faza adsorpsiyonu ve ardından katı fazdan daha fazla tercih ettiği organik çözücü ile elüe edilmesi esasına dayanır. Van der Waals, hidrojen bağlanması, dipol-dipol veya elektrostatik (iyon değişimi) gibi farklı etkileşimlere dayanan mekanizmalar ekstraksiyonda rol oynar (Ötles ve Kartal, 2016).

Sıvı-sıvı ekstraksiyon; analitin, sulu faz ve organik faz arasında belirli bir oranda kendisini dağıtabilmesi prensibine dayalı olarak çalışan bir yöntemdir. İyonize olmayan analitlerin polar fazdan polar olmayan organik faza aktarılması asit-baz kimyası gereği analitin yüksüz hale geçebilmesi sonucu gerçekleşir. Analitin yüksüz hale geçebilmesi, sulu fazın pH'ının, analit asidik iyonlaşma sabiti (pKa) değerine göre ayarlanması ile sağlanır (Kyle, 2017).

Dispersif katı faz ekstraksiyonu; analiti içeren sıvı fazda, katı fazın (sorbent) dağılmasına prensibine dayalı olarak çalışan bir yöntemdir. Dispersiyon sonrası, yüzeyinde tutunan analitlerle birlikte sorbent, santrifüjleme veya filtreleme gibi mekanik bir işlemle ayrılarak yüzeyinde adsorbe edilmiş analitlerin organik çözücü ile ayrıştırılması amaçlanır. Katı faz ekstraksiyonda olduğu gibi sorbentin yapısal özelliklerine göre elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik

ve hidrofilik etkileşimler ve dipol-dipol bağları gibi etkileşimler söz konusudur (Islas, Ibarra, Hernandez, Miranda ve Cepeda 2017).

Metot karşılaştırması için tercih edilen metotlardan geri alımı yüksek olan metot, matrix-matched kalibrasyon yöntemlerinden biri olan standartla güçlendirilmiş matris yöntemi kullanılarak her bir analit için ayrı ayrı 2021/808/EU yönetmeliğine göre valide edilmiştir (The European Commission, 2021).

Bu çalışmada, sütte glukokortikoidlerin belirlenmesine yönelik hassas metodun seçilebilmesi için sıvı-sıvı ekstraksiyon (liquid liquid extraction, LLE), katı faz ekstraksiyon (solid phase extraction, SPE) ve dispersif katı faz ekstraksiyon (dispersive solid phase extraction, DSPE) metotlarının karşılaştırılması ve en hassas metodun performans özelliklerinin belirlenmesi için geçerli kılma çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Reaktifler ve Kimyasallar Çalışmada; Metanol (%99, HPLC düzey), asetonitril, diklormetan, sodyum dihidrojen fosfat dihidrat, disodyum hidrojen fosfat, formik asit, izopropanol, heptan, etil asetat, trietilamin, asetik asit, sodyum hidroksit (Isolab Chemicals, Almanya), oktil silika (C8) ters faz kartuş(500 mg/6 ml), oktadesil silika (C18) sorbent (United Chemical Technologies, USA) kullanılmıştır.

Standart maddeler Çalışmada; Betametazon, deksametazon, prednizolon ve metilprednizolon referans standartları (Sigma-Aldrich, USA) kullanılmıştır. Standart maddelerin stok çözeltileri metanol (MeOH) içerisinde 1 mg/ml seviyesinde hazırlanmış ve -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

Analitik cihazlar Kromatografik analizler Agilent 1100 serisi Diyot Dizi Dedektörü (Diode Array Detector, DAD) ile bütünleşik Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ile değerlendirilmiştir. Hedef analitlerin tespiti Agilent XDB-C18 kolon (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) ile sağlanmıştır. Mobil faz akış hızı 0.7 ml/dk, akış şekli izokratik ve cihaz metot süresi 4 dk'dır. Cihaz kolonu sıcaklığı 40°C ve enjeksiyon hacmi 10 µl'dir. Mobil faz A: su/formik asit (%0,1), B:metanoldür.

Ekstraksiyon yöntemleri Katı faz ekstraksiyonda kartuş aktivasyonu (şartlandırma) için 3 ml metanol ve 3 ml fosfat tampon ph 6,8 kullanılmıştır. Ardından MRL düzeyinde analit içeren 5 ml süt örneği ve 2 ml fosfat tampon ph 6,8 kartuştan geçirilmiş, en son 1 ml heptan ile kartuştan kirliliğe neden olabilecek

moleküller uzaklaştırılmıştır. Elüsyon 5 ml trietilamin/etilasetat (10:90, h/h) çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Elüat nitrojen gazı altında 40°C'de tamamen kuruyana kadar bekletilmiş ve 100 µl metanol ile çözülerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Sıvı sıvı ekstraksiyonda 5 ml MRL düzeyinde analit ihtiva eden süt örneği 50 ml'lik polipropilen tüpe alınarak üzerine ekstraksiyon çözeltisi olarak diklormetan/izopropanol (75:25, h/h) çözeltisinden 5 ml eklenmiştir. Orbital çalkalayıcıda 30 dk boyunca çalkalama sonrası elüat ve süt örneğinin ayrımı için 5000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Elüat nitrojen gazı altında 40°C'de tamamen kuruyana kadar bekletilmiş ve 100 µl metanol ile çözülerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Dispersif katı faz ekstraksiyonda MRL düzeyinde analit ihtiva eden 5 ml süt örneği 50 ml'lik bir polipropilen tüpe alınarak üzerine 10 ml etil asetat ilave edilip vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 30 dakika boyunca çalkalanmıştır. Örnek karışımı 5000rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilip ve -20°C'de 6 saat süreyle dondurulmuştur. Ekstrakt bir tüpe aktarılacak şekilde nitrojen altında kuruyana kadar buharlaştırıldıktan sonra 1 ml asetonitril/su çözeltisi (20:80, h/h) içerisinde yeniden çözülmüş, karışım, 50 mg C18 sorbenti içeren 10 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüp 1 dk boyunca kuvvetlice çalkalandıktan sonra 5000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elüat tüpe aktarılacak şekilde nitrojen altında kuruyuncaya dek buharlaştırılmış ve 100 µl metanol ile çözülerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Bulgular

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Parametreleri

Glukokortikoidlerin kantitatif tespitinde, mobil fazın asidik yapısını ayarlayabildiği ve hedef analitin iyonizasyonunu arttırarak polaritesini değiştirmeyi ve kolon alıkonma süresini değiştirdiği için mobil fazda formik asit kullanılmıştır (Dolan, 2017).

Hedef analitlerin kolon alıkonma zamanlarının ve dalga boylarının tespit edilebilmesi için, MRL değerinin 0,5 ve 1 katı düzeyinde analit eklenerek ekstraksiyonu yapılan boş (kör) süt örnekleri, boş (kör) olarak ekstraksiyonu yapılmış cihaz analizinden önce üzerine 0,5 MRL ve 1 MRL düzeyinde analit eklenecek şekilde hazırlanan süt örnekleri (matriks eklenmiş standartlar) ve 0,5 MRL ve 1 MRL çalışma seviyelerinde hazırlanan analit saf standartları halinde hazırlana-

rak aynı koşullar altında HPLC'de analiz edilmiştir. Validasyonlarda matrix-matched kalibrasyon yöntemi kullanıldığı için matrisle güçlendirilmiş standartlar analitik yöntemin performans kriterlerinin araştırılması çalışmalarında yer almıştır. Yapılan bu çalışma sonucu analitlerin, ekstrakttaki alıkonma sürelerinin, ± 0,1 dakikalık bir toleransla kalibrasyon standartlarına, matrisle güçlendirilmiş standartlarına karşılık geldiği 2021/808/EU yönetmeliği gerekliliğini karşıladığı görülmüştür. Daha önce yapılan bir çalışma ile uyumlu olarak, analitlere ait dalga boylarının aynı olduğu görülmüş ve analitlere özgü dalga boyları ve alıkonma zamanları Tablo 1'de sunulmuştur (Anonim, 2011).

Tablo 1. Hedef analitler için alıkonma zamanları ve dalga boyları

Analit	Alıkonma Zamanı (dk*)	Dalga Boyu (nm**)
Betametazon	1.92	254
Deksametazon	1.92	245
Prednizolon	1.92	254
Metilprednizolon	1.92	254

*Dakika **Nanometre

Metot Karşılaştırma Çalışmaları

Çalışmada seçilmiş olan glukokortikoidler nonpolar davranış sergileyen nötr maddelerdir (A. Tölgyesi, L. Tölgyesi, Sharma, Sohn ve Fekete, 2010). Glukokortikoidlerin katı faz ekstraksiyon ve dispersif katı faz ekstraksiyonlarında, hidrofobik etkileşimleri ve yapılarındaki uzun karbon zincirleri nedeniyle polar olmayan analitlerin ekstraksiyonunda tercih edilen C8 ekstraksiyon kartuşları ve C18 sorbentleri kullanılmıştır (Anonim, 2023). Ekstraksiyon solventleri sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyon ve dispersif katı faz ekstraksiyonları için sırasıyla diklormetan/izopropanol (75:25, h/h), trietilamin/etilasetat (10:90, h/h) ve etil asetatdır. MRL düzeyinde analit içeren süt örnekleri üç farklı metotla on tekrar yapılarak analiz edilmiş ve tüm hedef analitler için katı faz ekstraksiyon metodunun en yüksek geri kazanıma ve tekrarlanabilirliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Dispersif katı faz ekstraksiyonda her bir analit için MRL düzeyinde yapılan çalışmalarda HPLC-DAD'da sinyal gürültü ayrımı gerçekleşmemiştir. Katı faz ve sıvı faz ekstraksiyonlara ait tekrarlanabilirlik standart sapması ve % geri kazanım değerleri Tablo 2'de yer almaktadır.

Tablo 2. Katı faz ve sıvı-sıvı faz ekstraksiyonlara ait tekrarlanabilirlik standart sapması ve % geri kazanım değerleri

Analit Adı	Katı Faz Ekstraksiyon		Sıvı Sıvı Faz Ekstraksiyon	
	Geri Kazanım (%) (n=10)	Tekrarlanabilirlik RSD* (%) (n=10)	Geri Kazanım (%) (n=10)	Tekrarlanabilirlik RSD* (%) (n=10)
Betametazon	101	7,0	81,3	17,6
Deksametazon	96,3	9,4	82,8	21,8
Prednizolon	98	4,1	79,3	13,8
Metilprednizolon	99,2	7,2	81,7	18,5

RSD*: Bağıl Standart Sapma

Metot Validasyonu

Çalışmada yer alan glukokortikoidlerin HPLC-DAD'da alıkonma zamanları ve UV spektrumundaki absorpsiyon maksimumları (dalga boyu) aynı olduğu için, yöntemin performans özellikleri her bir glukokortikoid için ayrı ayrı validasyon çalışması yapılarak belirlenmiştir. Yöntem sırası ile betametazon-deksametazon için 0 µg/kg (kör), 0,12 µg/kg, 0,3 µg/kg, 0,45 µg/kg, 0,6 µg/kg, prednizolon için 0 µg/kg (kör), 0,6 µg/kg, 6,0 µg/kg, 9,0 µg/kg, 12,0 µg/kg ve metilprednizolon için 0 µg/kg (kör), 0,2 µg/kg, 2,0 µg/kg, 3,0 µg/kg, 4,0 µg/kg doğrusal çalışma aralıklarında standartla güçlendirilmiş matriks yöntemi kullanılarak HPLC-DAD'da kantitatif tarama metodu olarak geçerli kılınmıştır. Farmakolojik aktif madde grubunda yer alan hedef analitlerin kantitatif tarama metodu olarak geçerli kılma çalışmaları 2021/808/EU yönetmeliğinde yer alan kriterler çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. 2021/808/EU yönetmeliğinde "Spesifik bir farmakolojik aktif madde için, MRL'nin 0,1 katı bir konsantrasyonun doğrulanmasının makul bir şekilde elde edilemediği durumlarda, MRL'nin 0,1 katı olan konsantrasyonun, makul olarak ulaşılabilir olan MRL'nin 0,1 katı ile 0,5 katı arasındaki en düşük konsantrasyon ile değiştirilebilir" ifadesine uygun olarak deksametazon ve betametazon için 0,4 MRL, prednizolon ve metilprednizolon için 0,1 MRL konsantrasyon düzeyi lineer olarak tespit edilmiştir.

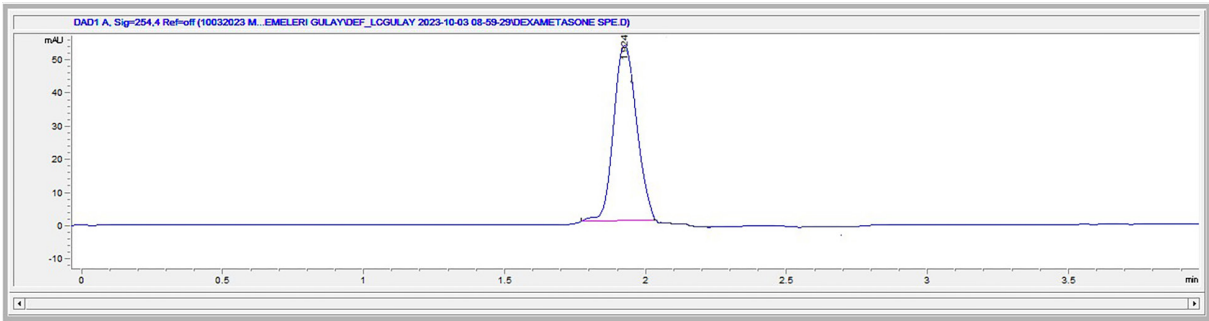
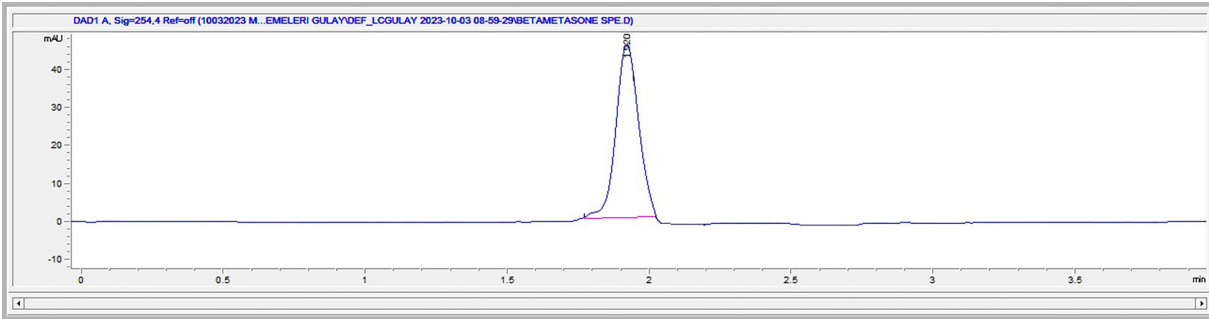
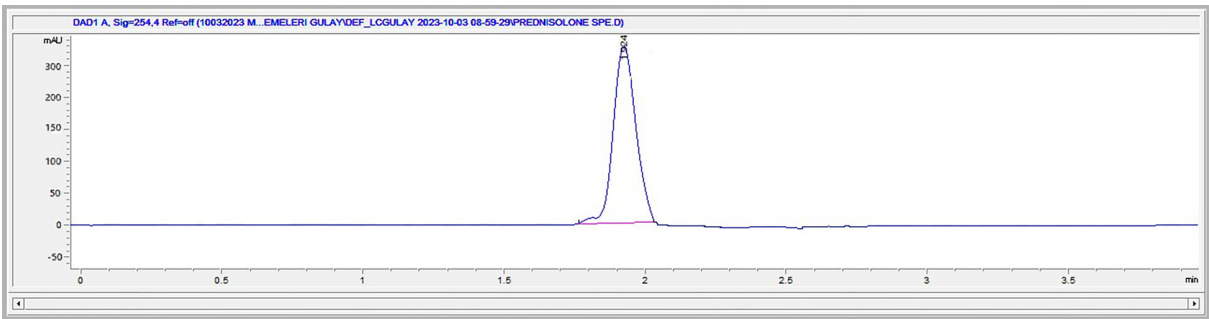
Kalibrasyon eğrileri, analit pik alanlarının analit konsantrasyonlarına karşı oranlarının grafiğinin çizilmesiyle elde edilmiş ve sonuçlar doğrusal regresyon kullanılarak analiz edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri R^2 değerleri 0,996-0,997 aralığında tespit edilmiştir.

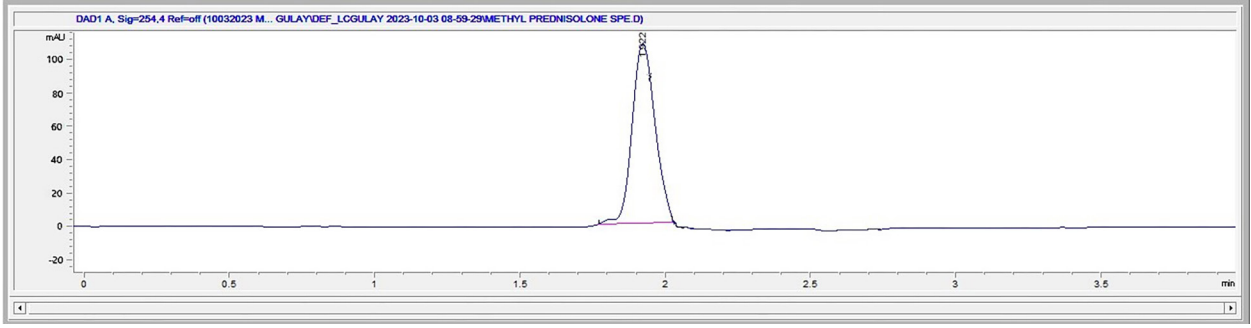
Metodun doğruluğu, gerçeklik (% geri kazanım) ve kesinliği (tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik) belirlenerek değerlendirilmiştir. Geri alımı ve kesinliği (tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik) değerlendirmek için sırası ile betametazon ve deksametazon için 0.12 µg/

kg, 0.3 µg/kg, 0.45 µg/kg, prednizolon için 0.6 µg/kg, 6.0 µg/kg, 9.0 µg/kg ve metilprednizolon için 0.2 µg/kg, 2.0 µg/kg ve 3.0 µg/kg konsantrasyon seviyelerinde standart çözeltileri ile güçlendirilmiş boş (kör) süt örnekleri kullanılmıştır. Her konsantrasyon seviyesinde güçlendirilen örnekler, her biri farklı bir günde ve her biri altı tekrar halinde olmak üzere üç seri halinde analiz edilmiştir. Geri kazanımlar, analit eklenen örneklerin belirlenen konsantrasyonlarını, hedef seviyelerle karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Betametazon 0,12 µg/kg, 0,3 µg/kg ve 0,45 µg/kg seviyesinde analit eklenmiş örneklerin geri alımı %97 ila %102 arasında, deksametazon 0,12 µg/kg, 0,3 µg/kg ve 0,45 µg/kg seviyesinde analit eklenmiş örneklerin geri alımı %97 ila %102 arasında, metilprednizolon 0,2 µg/kg, 2,0 µg/kg ve 3,0 µg/kg seviyesinde analit eklenmiş örneklerin geri alımı %94 ila %100 arasında, prednizolon 0,6 µg/kg, 6,0 µg/kg ve 9,0 µg/kg seviyesinde analit eklenmiş örneklerin geri alımı %97 ila %99 arasında değişmiştir ve 2021/808/EU yönetmeliğine göre minimum kabul edilebilir % geri kazanım değeri sağlanmıştır ($\leq 1 \mu\text{g/kg}$ için %50-%120 ve $> 1 \mu\text{g/kg} - 10 \mu\text{g/kg}$ için %70-%120). t-testi ile kontrol edilen geri alım sonuçları %95 güven aralığında serbestlik derecesi 54 için 1,42 ve 1,60 arasında değişerek t tablo($\alpha=2,00$) değerinden küçük olduğundan gerçek değere yakın olduğu kabul edilmiştir. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik sonuçları Horwitz eşitliğinden hesaplanan $\%RSD_{\text{kritik}}$ değerleri kıyaslanarak $\%RSD \leq \%RSD_{\text{kritik}}$ ($< 10 \mu\text{g/kg}$ için %30) koşulunu sağladığından, sonuçlar uygun olarak değerlendirilmiştir (The European Commission, 2021). Validasyon parametrelerine ait tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik, % geri kazanım, MRL, hedef tarama konsantrasyonu (STC) verileri Tablo 3'te ve MRL düzeyinde güçlendirilmiş örneklerle ait kromatogramlar aşağıda verilmiştir.

Tablo 3:Katı faz ekstraksiyon yöntemi validasyon parametreleri

Analit	Konsantrasyon (µg/kg)	Geri Alım (%)	Tekrarlanabilirlik RSD (%)	Tekrar Üretilbilirlik RSD (%)	MRL (µg/kg)	STC (µg/kg)
Betametazon	0,12	96,6	6,6	7,4	0,3	0,12
	0,3	100,5	6,1	8,4		
	0,45	101,6	6,5	9,9		
Deksametazon	0,12	96,6	12,9	13,9	0,3	0,12
	0,3	99,9	10,1	11,2		
	0,45	101,7	9,5	10,7		
Prednizolon	0,6	96,7	3,2	5,8	6,0	0,6
	6,0	97,9	3,4	5,7		
	9,0	99,3	0,8	2,9		
Metilprednizolon	0,2	94,2	6,3	6,6	2,0	0,2
	2,0	99	6,9	7,2		
	3,0	99,5	5,8	6,4		

**Şekil 1.** Deksametazona ait kromatogram**Şekil 2.** Betametazona ait kromatogram**Şekil 3.** Prednizolona ait kromatogram

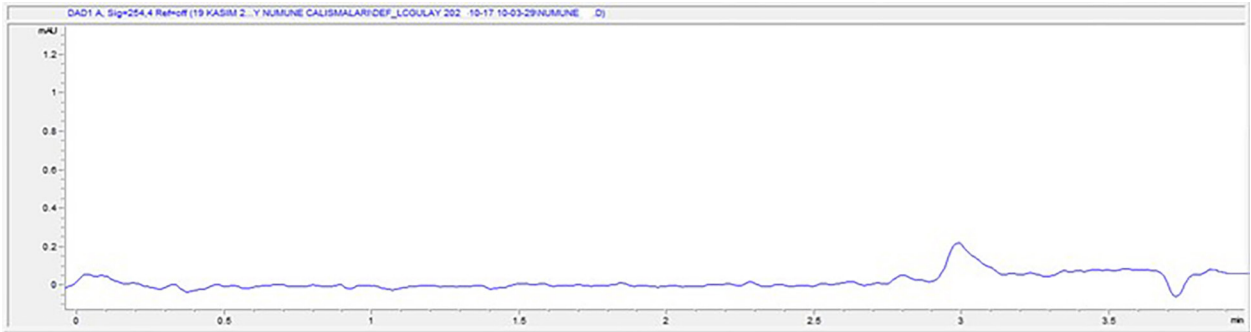


Şekil 4. Metilprednizolona ait kromatogram

Analitlerin matrisi içerisindeki stabilitesinin belirlenmesi için, STC düzeyinde güçlendirilmiş süt örnekleri -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Saklama koşullarının matrisi içerisindeki analit stabilitesine etkisini ölçmek için -20°C 'de muhafaza edilen STC düzeyinde güçlendirilmiş 5 süt örneği ve yeni hazırlanan STC düzeyinde güçlendirilmiş 5 süt örneği geçerli kılınan metot ile analiz edilmiştir. Stabilite çalışması kısa, orta ve uzun aralıkları için üç kez tekrarlanmış ve her çalışmaya ait % geri kazanım ve RSD'ler hesaplanmıştır. Kısa, orta ve uzun dönem stabilite çalışmaları % geri kazanım verileri betametazon için %95,1 deksametazon için %98,8 prednizolon için %98,6 ve metilprednizolon için %94,8 olarak tespit edilmiştir. %RSD verileri betametazon için 6,7 deksametazon için 13,6 prednizolon için 4,1 ve metilprednizolon için 6,4 olarak tespit edilmiş ve STC düzeyinde he-

saplanmış olan metot laboratuvar içi tekrarüretilebilirliği ile anlamlı fark görülmediğinden, saklama koşullarının matrisi içerisindeki analit stabilitesini etkilemediği belirlenmiştir (The European Commission, 2021).

2021/808/EU yönetmeliğinde yer alan uygulamalar doğrultusunda seçicilik / spesifiklik parametresinin belirlenmesi için 20 farklı boş (kör) süt örneği analiz edilmiş ve hedef analite ait pikin görülmesinin beklendiği bölgede herhangi bir sinyal, tepe noktası, pik varlığına rastlanmamıştır. Yine 20 farklı boş (kör) süt örneği hedef analitlerin tanımlanmasına ve/veya niceliğine müdahale edebilecek klenbuterol ile hedef analitlerin MRL seviyesinde güçlendirilecek analiz edilmiş ve analitlerin tanımlanmasını engellemediği görülmüştür. Boş (kör) süt örneğine ait kromatogram aşağıda verilmiştir.



Şekil 5. Boş (kör) örneğe ait kromatogram

HPLC-DAD'da kantitatif tarama yöntemi için dedeksiyon kapasitesi (Detection Capacity, CC β), betametazon için 0,36 $\mu\text{g}/\text{kg}$, deksametazon için 0,58 $\mu\text{g}/\text{kg}$, prednizolon için 0,79 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve metilprednizolon için 0,42 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak belirlenmiştir. CC β 'nin hesaplanma formülü aşağıda yer almaktadır. Birleştirilmiş belirsizlik STC'de hesaplanmış olup birleştirilmiş belirsizliğin bileşenleri laboratuvar içi tekrar üre-

tilebilirlik ve gerçekliktir (The European Commission, 2021).

$$\text{CC}\beta = \text{Tarama hedef konsantrasyonu (STC)} + k(\text{tek taraflı, \%95}) \times \text{STC'de veya üzerinde (birleşik) standart ölçüm belirsizliği.}$$

k-faktörü MRL düzeyinde izin verilen maddeler için 1,64'tür.

Tartışma ve Sonuç

Çalışma süt örneklerinde katı faz ekstraksiyonun, sıvı-sıvı ekstraksiyon ve dispersif katı faz ekstraksiyona göre üstünlüğe sahip olduğunu göstermektedir. Dispersif katı faz ekstraksiyon metodu dondurma basamağı nedeniyle analiz süresini diğer metotlara göre uzatmıştır. Katı faz ekstraksiyonda, sıvı-sıvı ekstraksiyondaki gibi emülsiyon oluşma riski elimine edilmiştir. Katı faz ekstraksiyon manifold sistemi kullanılması nedeniyle aynı anda çoklu örnek analize avantaj sağlamakta ve zaman kaybının önüne geçmektedir. Katı faz ekstraksiyon daha fazla solvent kullanımını gerektirse de örnekteki istenmeyen bileşikleri ortamdaki uzaklaştırması sebebiyle daha temiz analiz sonuçlarına ulaşılmasını sağlamaktadır. Kromatografi sisteminde matriksten gelebilecek bileşiklere ait sinyaller hedef analitin sinyaline girişim yapabileceği riski ve dolayısıyla hedef analitin sinyalinde artış ya da baskılamaya sebep olabilmektedir. HPLC sisteminde cihaz metot süresinin kısa olması ve türevlendirme gibi basamaklara ihtiyaç olmaması yöntemin diğer avantajlarından (Cun, Yinliang, Ting ve Yan, 2010). Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik sonuçları Horwitz eşitliğinden hesaplanan $\%RSD_{kritik}$ değerleri kıyaslanarak $\%RSD \leq \%RSD_{kritik} (< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ için $\%30$) koşulunu sağladığından, yöntemin tekrarlanabilir ve tekrarüretilebilir olduğunu ve HPLC-DAD'da sütte betametazon, deksametazon, prednizolon ve metilprednizolon için kantitatif tarama yöntemi olarak kullanılabilceğini göster-

miştir (The European Commission, 2021). Çalışmada HPLC-DAD'da hedef analitlerin, cihaz kolonunda alıkonma zamanlarının ve dalga boylarının aynı olması, yöntemin tek başına MRL düzeyini aşan hedef analitlerin varlığını ve konsantrasyonunu belirlemek için tarama yöntemi olarak uygulanabileceği, ancak likit kromatografi sıralı kütle spektrometresinde (LC-MS/MS) analitin kendisine özgü ana iyon ve parçalanma iyonlarının identifiye edilerek, doğrulanması gerektiği sonucuna varılmıştır. LC-MS/MS'te kütle/yük (m/z) oranına göre ayrılan moleküller parçalanma sonucu oluşan iyonları üzerinden tespit edilebilmektedir. Betametazon ve deksametazon için ana iyon 437 ve parçalanma iyonları 361 ve 307, metilprednizolon için ana iyon 419 ve parçalanma iyonları 343 ve 309, prednizolon için ana iyon 405 ve parçalanma iyonları 329 ve 295 olup, bahsi geçen iyonlar üzerinden LC-MS/MS'te ayrımları mümkün olabilmektedir (Arioli ve ark., 2022). Betametazon ve deksametazon birbirlerinin izomeri olup, kütle spektrometrede aynı ana iyon ve parçalanma iyonlarını verdiği için çeşitli kolonlarla (Hypercarb kolon gibi) ayırımı gerçekleştirilebilmektedir (Cun, Yinliang, Ting ve Yan, 2010). Kütle spektrometrede, C18 kolon kullanımında betametazon ve deksametazonun kolonda alıkonma süreleri aynı olduğundan ayrımları iyon oranı (ion ratio) farkı ile yapılabilmektedir (Turhan, Kabil, Dudaklı ve Dirikolu, 2018). Sütte glukokortikoidlerin tespiti için yapılan çalışma daha önce yapılan çalışmalarla analitik limitler üzerinden karşılaştırılmış ve Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4. Sütte glukokortikoidlerin belirlenmesi için önerilen yöntemin diğer bazı yöntemlerle karşılaştırılması

Analit	Matriks	Analiz Yöntemi	Analitik seviye ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Kaynak
Deksametazon	Süt	Likit Kromatografi Sıralı Kütle Spektrometri (Katı Faz Ekstraksiyon, Doğrulama Yöntemi)	CC β : 0,76	(Cherlet, De Baere ve De Backer, 2004)
Deksametazon, Prednizolon, Betametazon	Süt	Sıralı Kütle Spektrometri (Katı Faz Ekstraksiyon, Doğrulama Yöntemi)	CC β : 0,45-8,67	Mcdonald, Granelli ve Sjöberg, 2007)
Betametazon, Deksametazon, Prednizolon, Metil Prednizolon	Süt	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Diyot Dizi Dedektörü (Katı Faz Ekstraksiyon, Tarama Yöntemi)	CC β :0,36-0,58-0,79-0,42	Çalışma verileri

En iyi sonuçları gösteren C8 kartuş ile valide edilmiş ekstraksiyon yöntemi basit ve güvenilir olmakla birlikte sütte deksametazon, betametazon, prednizolon ve metilprednizolonun kantitatif tarama metodu olarak günlük laboratuvar uygulamalarında uygulanabileceği ancak HPLC-DAD'da hedef analitlerin kolondaki alıkonma zamanları aynı ol-

duğundan, HPLC-DAD'ın analitlerin identifikasyonu için tek başına yeterli olmayacağı, bu nedenle ileri doğrulama yöntemi olarak LC-MS/MS'te analitlerin kendilerine özgü ana iyon ve parçalanma iyonlarının identifiye edilerek, doğrulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Teşekkür: Katkılarından dolayı Ekrem ERDOĞAN, Dr. T. Zilhan ÇABUK, Dr. Ali ERKURT, Dr. Selçuk PEK-KAYA'ya teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Çalışmada etik kurul iznine ihtiyaç olmamıştır.

Makale orijinal araştırma makalesi olup daha önce herhangi bir organizasyonda (kongre, çalıştay, sempozyum, tezden üretilen yayın vs.) sunulmamıştır.

Kaynaklar

- Arioli, F., Gamberini, M.C., Pavlovic, R., Di Cesare, F., Draghi, S., Bussei, G., Mungiguerra, F., Casati, A. ve Fidani, M. (2022). Quantification of cortisol and its metabolites in human urine by LC-MSn: applications in clinical diagnosis and anti-doping control. *Anal Bioanal Chem*, 414, 6841-6853. doi: 10.1007/s00216-022-04249-3
- Buchwald, P. ve Bodor, N. (2004). Soft glucocorticoid design: structural elements and physicochemical parameters determining receptor-binding affinity. *Die Pharmazie*, 59, 396-404.
- Caretti, F., Gentili, A., Ambrosi, A., Rocca, M.L., Delfini, M., Di Cocco, M.E. ve D'Ascenzo, G. (2010). Residue analysis of glucocorticoids in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 2477-2490.
- Cherlet, M., De Baere, S. ve De Backer, P. (2004). Quantitative determination of dexamethasone in bovine milk by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 805, 57-65. doi:https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.015
- Courtheyn D., Le Bizet, B., Brambilla, G., De Brabander, H.F., Cobbaert, E., Van De Wiele, M., Vercammen, J. ve De Wasch K. (2002). Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Analytica Chimica Acta*, 473, 71-82.
- Comparison Between Reversed Phase C18 and C8 SPE Cartridge. Hawach Scientific. <https://www.specartridge.com/comparison-between-reversed-phase-c18-and-c8-spe-cartridge/>
- Cun, L., Yinliang, W., Ting, Y. ve Yan, Z. (2010). Rapid simultaneous determination of dexamethasone and betamethasone in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry with isotope dilution. *Journal of Chromatography A*, 1217, 411-414. doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.015
- Dirikolu, L. (2013). Glucocorticoids, Mineralocorticoids and Adrenolytic Drugs. Riviere, J. Ve Papich, M. (Ed.), *Veterinary Pharmacology And Therapeutics*, 9.
- Dolan, J.W. (2017). Back to Basics: The Role of pH in Retention and Selectivity. *LCGC International*, 35, 22-28.
- Guo, C., Wu, C., Zhang, Z., Tan, S., Chen, S. ve Chen, G. (2024). Simultaneous determination of 58 glucocorticoid residues in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1719. doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464734
- Islas, G., Ibarra, I.S., Hernandez, P., Miranda, J.M. ve Cepeda, A. (2017). Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review. *Hindawi International Journal of Analytical Chemistry*, 2017. doi: https://doi.org/10.1155/2017/8215271
- Kyle, P.B. (2017). Toxicology: GCMS. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*, 131-163. doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00007-9
- Luo, Y., Uboh, C.E., Soma, L.R., Guan, F.Y., Rudy, J.A., ve Tsang, D.S. (2005). Simultaneous analysis of twenty-one glucocorticoids in equine plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 1245-1256.
- Malone, E.M., Elliott, C., Kennedy, D.G. ve Regan, L. (2010). Screening and Quantitative Confirmatory Method for the Analysis of Glucocorticoids in Bovine Milk Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal Of Aoac International*, 93, 1656-1665. doi: 10.1093/jaoac/93.5.1656
- Mcdonald, M., Granelli, K. ve Sjöberg, P. (2007). Rapid multi-residue method for the quantitative determination and confirmation of glucocorticosteroids in bovine milk using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 588, 20-25. doi:https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.01.075
- Ötles, S. ve Kartal, C. (2016). Solid-Phase Extraction (Spe): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*, 15(1), 5-15. doi: 10.17306/J.AFS.2016.1.1
- Schacke, H., Döcke, W.D. ve Asadullah, K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 23-43.
- Schimmer, B.P. ve Funder, J.W. (2022). Adrenocorticotrophic Hormone, Adrenal Steroids, and the Adrenal Cortex. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13.
- TC Tarım ve Orman Bakanlığı. (2017). Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. (30000).
- The European Commission. (2021). Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2021/808/oj 'den erişilmiştir.
- Tölgyesi, A., Tölgyesi, L., Sharma, V.K., Sohn, M. ve Fekete, J. (2010). Quantitative determination of corticosteroids in bovine milk using mixed-mode polymeric strong cation exchange solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 53(4), 919-928. doi: https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.06.026
- Turhan, E., Kabil, E., Dudaklı, G. ve Dirikolu, L. (2018, Mart). A New Approach For The Determination Of Betamethasone And Dexamethasone By Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). (Poster). International Conference Of Racing Analysts And Veterinarians, Dubai.
- UHPLC Separation of Nine Corticosteroids in Under Four Minutes. Thermo Scientific. https://lcms.cz/labrulez-bucket-strap-i-h3hsga3/AB_123_HPLC_Corticosteroids_UHPLC_28_Jan2011_LPN_2729_8e265e33bf/AB123-HPLC-Corticosteroids-UHPLC-28Jan2011-LPN2729.pdf 'den erişilmiştir.