

## **Balda Sülfonamit Kalıntılarının Analizlerinde LC ve LC/MS Yöntemleri**

H. Nilgün Budak<sup>1\*</sup>, Nurullah Şanlı<sup>2</sup>, Güleren Alsancak<sup>2</sup>, Zeynep Güzel-Seydim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Gelendost Meslek Yüksekokulu , İsparta

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, İsparta

<sup>3</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, İsparta

\*nilgun@sdu.edu.tr

### **Özet**

Bal, üstün beslenme değeri ve eşsiz aroma özellikleri sebebi ile tüketimi yaygın olan bir gıdadır. Günümüzde arı yetiştiriciliğinde sülfonamit grubu antibakteriyellerin kullanımı çok yaygındır. Sıklıkla kullanılan ilaç, polisulfamid, sulfotiazol, sulfoasetamid ve sulfometazin içermektedir. Ayrıca karbamat grubu bir herbisit olan asulamın kullanımı dolayısıyla oluşan sulfonilamitin varlığı balda ve vakslarda, bu antibakteriyellerin tayinini gerekli kılmaktadır. Günümüzde ilaç kalıntıları için tolerans düzeyleri belirlenmiş olup, Türk Gıda Kodeksi verilerine göre sülfonamit grubu için bu değer 0,01 mg/kg'dır. Balda sülfonamit kalıntılarının belirlenmesinde kesinliği ve doğruluğu yeterli analitik yöntemlerin kullanımı da giderek önem kazanmıştır. Kalıntı sülfonamit saptanmasında yüksek performans sıvı kromatografisi (LC) ve bir çoklu teknik olarak LC/MS yöntemleri kullanılmaktadır. Ters faz sıvı kromatografi ile sülfonamitlerin analizinde UV ve DAD dedektör kullanılarak veya kolon sonrası türevlendirme yapılarak floresans dedektör kullanılarak çalışılabilir. Ayrıca LC/MS kombinasyonu kullanılarak hem tespit sınırını aşağılara çekmek hem de bileşiğin konfirmasyonunu sağlamak mümkündür. Bu derlemede balda sülfonamit kalıntılarının bu analitik yöntemlerle belirlenmesiyle ilgili yapılan son çalışmalar ve bulgular değerlendirilmiştir.

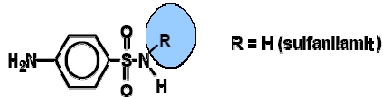
**Anahtar Kelimeler:** Bal, Sülfonamit kalıntıları, LC, LC/MS

### **Giriş**

Bal, *Apis mellifera* isimli bal arıları tarafından çiçeklerden ve meyve tomurcuklarından alınarak yutulan nektarın arıların midesinde invertaz enzimi sayesinde kimyasal değişime uğramasıyla oluşan ve kovadaki petek hücrelerine yerleştirilen çok faydalı bir besindir. Nektarın bala çevrilmesi için arıların salgıladıkları invertaz enzimiyle sakkaroz inversiyona uğratarak früktoz ve glikoz şeklinde basit şekerlere dönüştürülür ve fermantasyonun oluşumunu önleyecek miktarda suyu uçurulur. Kovana yerleştirilen ve üzeri mumdan bir kapakla örtülen bal istenilen tat ve kıvama gelir (1). Balda, insan sağlığını tehdit eden *Clostridium botulinum* ve diğer hiçbir patojen mikroorganizma, parazit ve/veya parazit yumurtası bulunmamalıdır; Türk Gıda Kodeksi Şeker Tebliğinde yer alan şekerleri içermemelidir. Balın rengi su beyazından koyu amber renge kadar değişebilir. Bala hiçbir katkı maddesi katılamamalıdır. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nin Pestisit

Kalıntıları bölümüne uygun olmalıdır. Bu kurallara ek olarak balda maksimum pestisit kalıntı limiti en fazla 0,01 mg/kg olmalıdır (2).

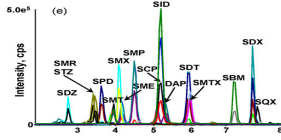
Dünyada herhangi bir kaynağı tüketmeden üretimde bulunabilen tek canlı arıdır. Dünyada 52 milyon, ülkemizde ise 4 milyon civarında arı kolonisi bulunmaktadır. Arıcılık sektöründe ülkemiz, arı kolonileri bakımından dünyada 3. sırada, bal üretimi açısından 4. sırada yer almaktadır. Bu veriler, ülkemizde bal üretiminin beklenen düzeyde olmadığını göstermektedir. Arıların belirli hastalıklara maruz kalması, bal verimini etkilemektedir (3). Sülfonamidler, yapılarında benzen halkası, amin grubu ve sülfonamid grubu bulunduran geniş spektrumlu, bakteriyostatik etkili ilaçlardır. Gerek insan sağlığı ve gerekse veterinerlik uygulamalarında yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (4). Sülfonamid grubu antibakteriyeller, Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizmalara karşı aktivite gösterirler. Sübstitüe sülfonamidler, aromatik amino grubu azotu (N<sup>4</sup>) ve amido grubu azotu (N<sup>1</sup>) üzerinden sübstitüsyonlarla hazırlanırlar. Bütün sülfonamidlerin antibakteriyel aktivitesi N<sup>1</sup>-sübstitüe türevleri olması halinde gözlenir ve bu bileşikler ilaç olarak kullanılmaktadır. Hayvan ürünlerindeki et, süt, yumurta ve bal gibi hayvansal ürünlerdeki sülfonamid kalıntıları, alerjik özelliklerinden dolayı potansiyel sağlık riskleri oluşturmaktadır (5). Sülfonamid grubu antibakteriyellerin balda bulunmasına izin verilen üst limit değerleri, her ülkeye göre farklılık göstermektedir. Balda sülfonamid kontaminasyonunun belirlenmesinde kesinliği ve doğruluğu yeterli analitik yöntemlerin kullanımı giderek önem kazanmıştır. Kalıntı sülfonamid saptanmasında yüksek performans sıvı kromatografisi (LC) ve bir çoklu teknik olarak LC/MS yöntemleri kullanılmaktadır. Ters faz sıvı kromatografi ile sülfonamidlerin analizinde UV ve DAD dedektör kullanılarak veya kolon sonrası türevlendirme yapılararak floresans dedektör ile çalışılabilir. Ayrıca LC/MS kombinasyonu kullanılarak hem tespit sınırını aşağılara çekmek hem de bileşiğin yapısı hakkında yeterli bilgi sağlamak mümkündür.



Şekil 1. Sülfonamidlerin genel yapısı

Martel ve Zeggane (6), bal numunelerinde sülfotiazol tayininde bileşiği fluoressamin ile türevlendirmişler ve oluşan floresans özellikteki üründen yararlanmışlardır. Sülfometizol, internal standart olarak seçilmiştir. Çalışmada Hypersil BDS C-18 (250 x 4 mm, 5 µm) analitik kolon ve mobil faz olarak akış hızı 1,0 mL/dakika olan %2 asetik asit – asetonitril (60:40, v/v) (pH 4,5) karışımı kullanılmıştır. 405 nm eksitasyon ve 490 nm emisyon dalga boyunun uygun olduğu belirtilmektedir. Balda sülfotiazolün kantitasyon limitinin 10 µg/kg olduğu vurgulanmıştır. Çalışma Fransa'da toplanan bal örneklerine uygulanmıştır. Maudens vd. (7), bal numunelerinde 12 adet sülfonamidin tayininde türevlendirici olarak yine fluoressamin kullanmışlar ve oluşan floresans özellikteki ürünleri sıvı kromatografik yöntemle ayırmışlardır. Purospher Star RP-18 end-capped analitik

kolon (150 x 4,6 mm, 5 µm) kullanılan çalışmada mobil faz akış hızı, 0,7 mL/dakikadır. Gradient çalışılma, 0,02 M asetat tamponu-asetonitril (98:2 (v/v), pH 4,75) ve asetat tamponu-asetonitril (68:32, (v/v)) kullanılmıştır. Belçika'da bal üretimi yapan şirketlerden toplanan bal örneklerine uygulanmıştır. Bal örnekleri farklı çiçeklerin yanı sıra tek çiçekten toplanabilen farklı reolojik orijine sahiptir. Örnekler 4°C de karanlık bir ortamda saklanmıştır. HPLC-floresans tekniği hassas ve seçici bir teknik olarak belirlenmiştir. Analiz sonucunda belirlenen değerler, Avrupa Birliği limit değerlerinin altında olduğu ifade edilmektedir. Zotou ve Vasiliadou (8), sulfoasetamit, sulfotiazol, sulfopiridin, sulfomerazin, sulfometoksipiridazin ve sulfometaksazol olmak üzere 6 adet sülfonamitin bal numunelerinde analizini HPLC-UV yöntemi ile yapmışlardır. Çalışmada Inertsil ODS-3 (250 x 4 mm, 5 µm) analitik kolon ve mobil faz olarak akış hızı 1,0 mL/dakika olan metanol- 0,05 M asetat tamponu (pH 3,6) %1 (v/v) asetik asit (20:80,v/v) kullanılmıştır. Kafein, internal standart olarak seçilmiştir. Analitlerin ortalama geri kazanımlarının %80-117 arasında ve dedeksiyon limitlerinin 20-25 µg/kg arasında olduğu vurgulanmıştır. Kalıntı sülfonamit saptanmasında yüksek performans sıvı kromatografisi (LC) yanında çoklu teknik olarak LC/MS yöntemleri kullanılmaktadır. Kütle spektrometrisinin dedektör olarak kullanıldığı yöntemler, yüksek seçicilik ve duyarlılığından dolayı son yıllarda özellikle bal numunelerinde sülfonamit kalıntılarının tayinlerinde tercih edilmektedir. Thompson ve Noot (9), sülfodiazin, sulfotiazol, sulfopiridin, sulfomerazin, sulfometazin, sulfodoksin, sulfodimetoksin ve sulfokloropridazin olmak üzere 8 adet sülfonamitin bal numunelerinde analizini LC-MS/MS yöntemi ile yapmışlardır. Çalışmada Oasis HLB katı faz kartuşu kullanılmıştır. Gradient çalışmada birinci mobil faz, formik asitin sulu çözeltisi (%0,1 v/v); ikinci mobil faz, formik asitin asetonitrildeki çözeltisi (%0,1, v/v) olup üçüncü mobil faz olarak TFA'nın asetonitrildeki çözeltisi (%2, v/v) kullanılmıştır. Çalışmada numuneler, şeker sülfonamit arasındaki bağı kırmak için asit ile hidroliz edilmiştir. 600 adet bal örneğine bakılmış, analitlerin ortalama geri kazanımlarının %67-114 arasında ve dedeksiyon limitlerinin 0,5 ile 2 µg/kg arasında olduğu vurgulanmıştır. Hammel vd. (10), elektrospay ionizasyon tandem kütle spektrometresi (LC-ESI-MS/MS) yöntemini kullanarak 5 tetrasiklin, 7 makrolit, 3 aminoglikosit, 8 β-laktam, 2 amfenikol ve 17 adet sülfonamit içeren 42 veteriner ilaç kalıntısını tespit ve tayin etmişlerdir. Gradient çalışmada kolon olarak Zorbax SB-C18 ters faz kolon (2,1x50 mm, 1,8µm) kullanılmıştır. Çalışılan bileşiklerin bal numunelerinden ekstraksiyonu için genel olarak sıvı/sıvı ekstraksiyon yöntemini uygulamışlardır. Çalışılan bileşikler için dedeksiyon limiti 27-80 µg/kg aralığında bulunmuştur. Mobil fazlardan birincisi 1mM nonafloropentanoik asit (NFPA) ve %0,5 (v/v) formik asit karışımıdır. İkinci mobil faz, %0,5 (v/v) formik asit içeren asetonitril/metanol (50/50, v/v) çözeltisidir.



Şekil 2. LC-ESI-MS/MS yöntemi kullanılarak elde edilen sülfonamid kromatogramı (Hammel vd., 2008)

## Sonuç

Bal verimini ve arı hastalıklarının önlemek amacı ile uygulanan bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucu kalıntı oluşumu, ülkemiz için sorun teşkil etmektedir. Arıcılıkta özellikle çok yanlış bir uygulama olan ve bazı arıcılarımızın halen yapmakta olduğu “arı sağlığını koruma maksadı ile antibiyotik kullanımı” incelemeye alınmalıdır. Bu uygulama kalıntı sorununa sebep olmanın yanı sıra, arıların bağışıklık sistemini zayıflatmakta ve hastalık yapıcı bakterilerin antibiyotiklere direnç kazanmasına sebep olmaktadır (11). Avrupa Birliği sürecine girdiğimiz bu günlerde uygulanan işlemlerin kontrolü ve buna ilişkin yaptırımların göz ardı edilmesi sonucu ülkemizden bal ithalatına yasak getirilebileceği bilinmektedir. Antibiyotik kalıntı analizlerinin süratle yapılması ve çok düşük derişimlerin bile tespit edilmesini sağlayacak yeni tekniklerin gelişmesi ve rutin analizler arasında yer alması ile ülkemizdeki üreticiler bilinçlendirilmeli ve ürünlerimizin kalitesinin yükselmesi sağlanmalıdır. Kalıntı sülfonamid saptanmasında ters faz yüksek performans sıvı kromatografisi (RPLC), farklı dedektörleri ile yaygın şekilde kullanılmaktadır. Sıvı kromatografik çalışmalarda alıkonma, sülfonamidlerin yapılarına ve iyonlaşma özelliklerine bağlıdır. Bu yüzden mobil fazın polaritesi ve pH'sı kromatografik ayırmada önemli rol oynamaktadır (12). Bir çoklu teknik olarak LC/MS yöntemleri sülfonamid kalıntı analizlerinde polar bileşiklerle çalışmadaki avatajları nedeniyle giderek tercih edilmektedir. Bu çalışmalarda LC/MS kombinasyonu kullanılarak hem tespit sınırını aşağılara çekmek hem de bileşiğin yapısını belirlemenin mümkün olduğu tespit edilmiştir (13)

## Kaynaklar

1. Anonim. 2007. Bal. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Bal>. (20.06.2007).
2. Türk Gıda Kodeksi. 2005. Bal Tebliği. <http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2005-49.html> (18.06.2007).
3. Konak F. 2004. Arıcılıkta verim artırıcı üretim teknikleri. Sunum, Arıcılık Araştırma Enstitüsü, Ordu.
4. Mandell GL, Sande MA. 1990. Sülfonamidler, trimetoprim-sülfametoksazol, kinolonler, ve ajanlar için idrar yolu enfeksiyonları. The Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New York, pp. 1047–1064.
5. Pastor-Navarro N, Gallego-Iglesias E, Maquieira A, Puchades R. 2007. Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides; Application to bee honey analysis. Science Direct, Talanta 71: 923–933.
6. Martel AC, Zeggane S. 2003. HPLC Determination of Sulfathiazole in French Honeys. Journal of liquid chromatography & related Technologies. 26 (6) 953–961.
7. Maudens KE, Zhang GF, Lambert WE. 2004. Quantitative analysis of twelve sulphonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. Journal of Chromatography 1047:85–92.
8. Zotou A, Vasiladou C. 2006. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. Chromatographia, 64, 5/6, 307-311.
9. Thompson TS, Noot DK. 2005. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Science Direct, Analytica Chimica Acta 551, 168–176
10. Hammel YA, Mohamed R, Gremaud E, LeBreton, MH, Guy PA. 2008. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1177, 58–76.
11. Doğaroğlu M, Samancı T. 2006. Balda yörelere göre kalıntı hile ve orijin tespit projesi, Teknoloji ve Yenilik Destek Programları Başkanlığı (TEYDEB) arıcılık raporu, Ankara.
12. Şanlı N., 2007. Bazı Sülfonamidlerin Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Tayini. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 2007.
13. Fuh MRS, Chan SA. 2001. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-electrospray –mass spectrometry. Talanta, 55, 1127-1139.