

Kloramfenikol Birincil Kalibrant
UME CRM 1301

Raporu Hazırlayanlar

Kevser TOPAL

Alper İŞLEYEN

Ahmet Ceyhan GÖREN

Mine BİLSEL

İlker ÜN

Gökhan BİLSEL

05/12/2014

Tarih



Dr. Mustafa ÇETİNTAŞ
Enstitü Müdürü (V.)

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	3
ÖZET.....	5
GİRİŞ.....	6
KATILIMCILAR.....	6
MALZEME İŞLEME.....	7
HOMOJENLİK.....	7
KARARLILIK.....	11
KARAKTERİZASYON.....	18
ÖZELLİK DEĞERLERİNİN VE BELİRSİZLİKLERİNİN ATANMASI.....	20
İZLENEBİLİRLİK.....	21
KULLANIM TALİMATI.....	22
TEŞEKKÜR.....	22
KAYNAKLAR.....	23
REVİZYON TARİHÇESİ.....	24
EKLER.....	25
EK I: Kütle Denkliği Yöntemi.....	25
EK II: qNMR Yöntemi.....	26

KISALTMALAR

ANOVA	Varyans Analizi (ANalysis Of VAriance)
<i>b</i>	Bağlanım (regresyon) grafiğinin eğimi
CAP	Kloramfenikol
CCQM	Madde Miktarı Danışma Kurulu (Consultative Committee for Amount of Substance)
cKFT	Kulometrik Karl Fisher Titrasyonu
CMC	Kalibrasyon ve Ölçüm Yetenekleri (Calibration and Measurement Capabilities)
GBF	Güvenlik Bilgi Formu
GC-MS/MS	Gaz Kromatografisi sıralı (tandem) kütle spektrometrisi
GUM	Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması Kılavuzu (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements)
HPLC	Yüksek Başarım Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-DAD	Yüksek Başarım Sıvı Kromatografisi Diyot Dizisi Algılayıcı (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector)
HR ICP-MS	Yüksek Çözünürlük Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometrisi (High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
HS-GC	Üst Boşluk (Head Space) Gaz Kromatografisi
ICP-MS	Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometrisi (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
IEC	Uluslararası Elektroteknik Komisyonu (International Electrotechnical Commission)
ISO	Uluslararası Standartlaştırma Organizasyonu (International Standardization Organization)
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)
<i>k</i>	Kapsam faktörü
KD	Kütle Denkliği
KF	Karl Fischer
LGC	İngiltere (yetkilendirilmiş) Metroloji Enstitüsü (Laboratory of the Government Chemist)
$MS_{between}$	Varyans analizinde üniteler arası karelerin ortalaması
MS_{within}	Varyans analizinde ünite içi karelerin ortalaması
<i>n</i>	Ünite başına tekrar sayısı
<i>N</i>	Analiz edilen örnek sayısı
NIST	Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Bilim ve Teknoloji Enstitüsü (National Institute of Science and Technology -USA)
NMIA	Avustralya Ulusal Metroloji Enstitüsü (National Metrology Institute of Australia)
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
qNMR	Nicel Nükleer Manyetik Rezonans
RASFF	Gıda ve Yemler için Hızlı İkaz Sistemi (Rapid Alert System for Food and Feed)
<i>s</i>	Standart sapma
s_{bb}	Üniteler arası standart sapma
SI	Uluslararası birimler sistemi

SRM	Sertifikalı Referans Malzeme
s_{wb}	Ünite içi standart sapma
s_{within}	Varyans analizi ile elde edilen üniteler arası standart sapma
T	Sıcaklık
t	Zaman
t_{crit}	Kritik t değeri
TG	Isıl ağırlık (Thermal Gravimetry)
TRaNS	Tabakalı Rastgele Numune Seçimi yazılımı
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
u	Standart belirsizlik
u_c	Birleştirilmiş standart belirsizlik
U	Genişletilmiş belirsizlik
u_{bb}^*	Yöntem tekrarlanabilirliğince gizlenmiş üniteler arası homojensizlik standart belirsizliği
u_{bb}	Üniteler arası homojen olmama durumundan kaynaklanan standart belirsizlik
u_{char}	Karakterizasyondan gelen belirsizlik bileşeni
u_{CRM}	Sertifikalandırılan değer için bileşik standart belirsizlik
U_{CRM}	Sertifikalandırılan değer için genişletilmiş belirsizlik
u_{Its}	Uzun dönem kararsızlıktan gelen belirsizlik bileşeni
UME	Ulusal Metroloji Enstitüsü
u_{meas}	Ölçüm belirsizliği
US EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (United States Environmental Protection Agency)
u_{sts}	Kısa dönem kararlılıktan gelen belirsizlik bileşeni
\bar{X}	Aritmetik ortalama

ÖZET

Kloramfenikol (CAP), bakteri içerisinde protein sentezini engellemek yoluyla antibiyotik etkisi göstermekte olup veterinerlikte tedavi, koruma ve verimi artırma amaçlarıyla yaygın olarak kullanılmaktadır ^[1,2]. Yasadışı veya uygunsuz kullanımı sonucunda hayvansal gıda zincirine katılmakta ve insanlara geçmektedir. CAP'nin uygunsuz kullanımı nedeni ile ortaya çıkabilecek olumsuzluklar hayati tehlikeler arz edebilmektedir. Olası etkiler alerjik etkilerden kanserojen etkilere kadar çeşitlilik göstermektedir ^[3]. Antibiyotikler ve metabolitleri ülkemizde 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu ve Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik ^[4] gereğince ulusal kalıntı izleme programı ^[5] ve AB ülkelerinde ise 96/23/EC no.lu direktif ^[6] kapsamında izlenmektedirler.

Bu sertifika raporu, ISO Guide 34'e ^[7] göre UME CRM 1301 kodlu kloramfenikol birincil kalibrantı SRM'sinin üretimini ve sertifikalandırılmasını içermektedir. Raporda UME CRM 1301 üretim ve analiz süreçleri, homojenlik, kararlılık ve karakterizasyon çalışmalarına ait bulgular, istatistiksel değerlendirmeler ve yorumlar sunulmuş, ölçümlerin belirsizlik hesaplamaları ISO/IEC Guide 98-3 "Uncertainty Measurement-Part 3: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM:1995)" dokümanına^[8] uygun olarak belirlenmiştir.

Sertifikalandırılan değer aşağıda sunulmuştur:

Malzeme	Parametre	Kütle Kesri* [%]	Belirsizlik** [%]
Kloramfenikol	Saflık	99,58	0,15

* Sertifikalandırılmış değer ve belirsizlik değerleri, qNMR ve kütle denkliği yöntem sonuçlarının ortalamasıdır. Ölçüm sonuçları Uluslararası Birimler Sistemi'ne (SI) izlenebilirdir.

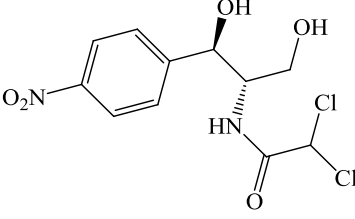
** Sertifikalandırılan değer için belirsizlik, standart belirsizliğin normal dağılım için yaklaşık % 95 güvenilirlik seviyesini sağlayan $k = 2$ kapsam faktörü ile çarpımının sonucudur.

GİRİŞ

CAP (Tablo 1) tedavisi uygulanan hayvanlardan elde edilen ürünler, CAP'ın vücuttan atılımı tamamlanana kadar gıda olarak piyasaya sunulmamalıdır. Bu süreç bazı durumlarda birkaç ay kadar sürebilmektedir. RASFF yıllık verilerinde CAP nedeni ile ihracatı/ithalatı durdurulmuş birçok ürüne rastlanmaktadır ^[11]. CAP miktarı yasalarla belirlenmiş ve bu yüzden düşük seviyelerde de olsa tespiti önemlidir. Hayvansal ürünlerde izin verilen CAP miktarı 0,3 µg/kg olarak raporlanmıştır ^[12].

Güvenilir ve doğru kimyasal ölçüm sonuçlarının elde edilebilmesi ve ölçüm izlenebilirliğinin sağlanması için SRM kullanımını gerekmektedir. Dünyada CAP analizlerinde kullanılabilecek birincil seviye kalibrant bulunmamaktadır. Bu da CAP SRM'sinin üretilmesi ve sertifikalandırılmasının temel dayanağıdır. Bu raporda CAP SRM'sinin üretim süreci verilmiştir.

Tablo 1. Kloramfenikol'ün yapısı ve bazı kimyasal özellikleri

	
CAS No	56-75-7
Molekül Kütlesi	323,13 g/mol
Bileşik İsmi	Kloramfenikol
Kimyasal Formül	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅
IUPAC İsmi	2,2-dichloro-N-[(1S,2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrophenyl)ethyl] acetamide

KATILIMCILAR

Projenin tüm aşamaları TÜBİTAK UME Kimya Grubu Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

Sayfa 7 / 26	TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ	UME CRM 1301
--------------	---	-------------------------------

MALZEME İŞLEME

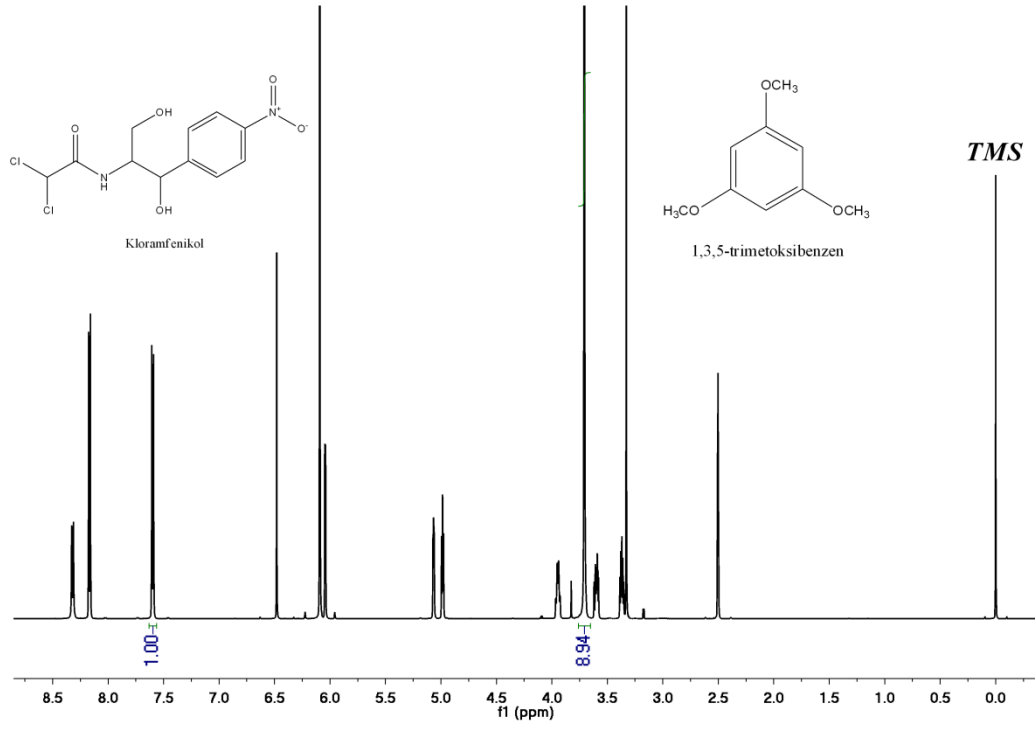
Kloramfenikol, Acros Organics (Belçika) firmasından temin edilmiştir. Firmanın HPLC tekniğine dayalı olarak raporladığı ürün saflığı % 98'dir.

UME CRM 1301, TÜBİTAK UME'de, üç boyutlu karıştırıcıda (WAB-Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Turbula, İsviçre) dört saat süresince karıştırılarak homojenize edilmiş, "glove box" (MBraun, LABmaster, Almanya) içinde argon atmosferi altında el ile tartılıp 500 adet cam amber şişeye doldurularak hazırlanmıştır. Şişeler, içi teflon kaplı alüminyum kıvrım kapak ile kapatılmıştır. Her bir ünite yaklaşık 100 mg CAP içermektedir. Üretilen SRM'ler etiketleme sonrası, üretim sürecinin (homojenlik değerlendirmesi, kararlılık çalışmaları ve karakterizasyon gibi) farklı aşamaları için kullanılacak üniteler ayrı saklama koşullarında saklanmak üzere seçildikten sonra, geri kalan şişeler düzenli sıcaklık kontrolü sağlanarak (25 ± 3) °C'de ve karanlıkta saklanmıştır.

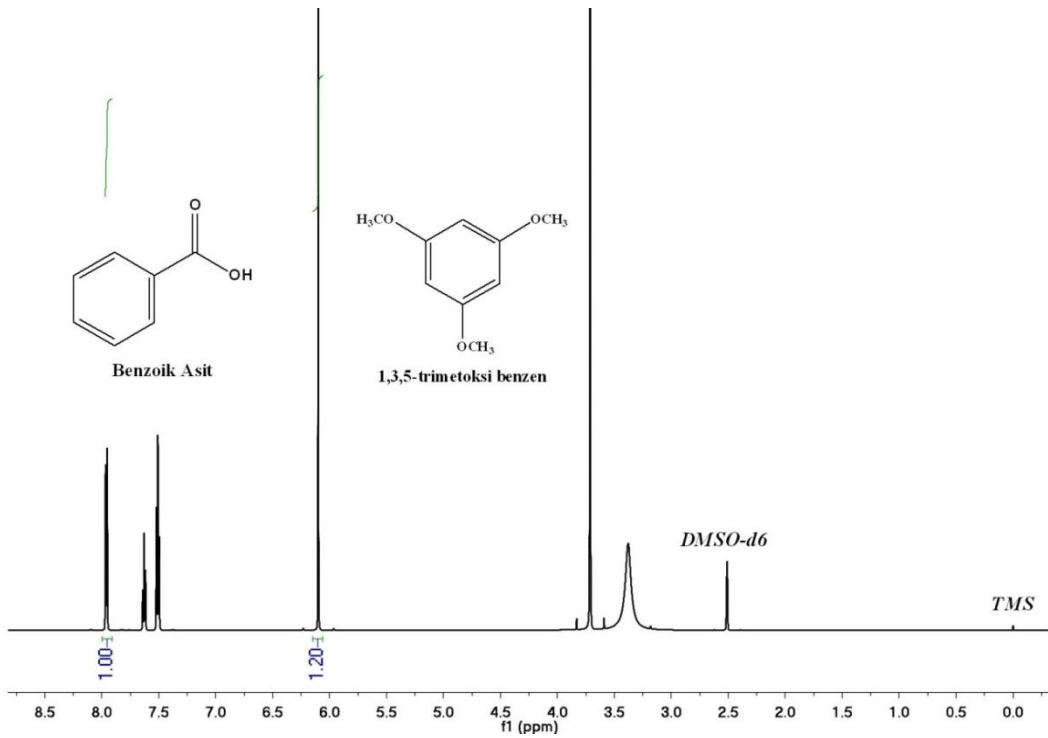
HOMOJENLİK

Sertifikalandırılması planlanan saflık değerinin üniteler arası değişkenliğinin değerlendirmesi için on ünite (toplam ünite sayısının küp kökü on'dan az olduğunda on numune seçilir) UME CRM 1301, TRaNS yazılımı kullanılarak seçilmiştir.

Bu çalışma için seçilmiş örnekler tekrarlanabilirlik koşulları altında TÜBİTAK UME'de geliştirilmiş ve valide edilmiş bir qNMR saflık tayini metodu ile analiz edilmiştir. Ölçümlerde 600 MHz NMR cihazı (Varian VNMRS 600 MHz, Amerika) kullanılmış, iki paralel örnek hazırlanarak altı tekrarlı ölçüm yapılmıştır. Örnek ¹H-NMR spektrumu ve miktar tayini için kullanılan SRM'lere ait spektrum aşağıda verilmiştir (Şekil 1).



(a)



(b)

Şekil 1. Örnek ¹H-NMR spektrumları (a) Kloramfenikol ve 1,3,5-trimetoksibenzen, (b) benzoik asit ve 1,3,5-trimetoksibenzen

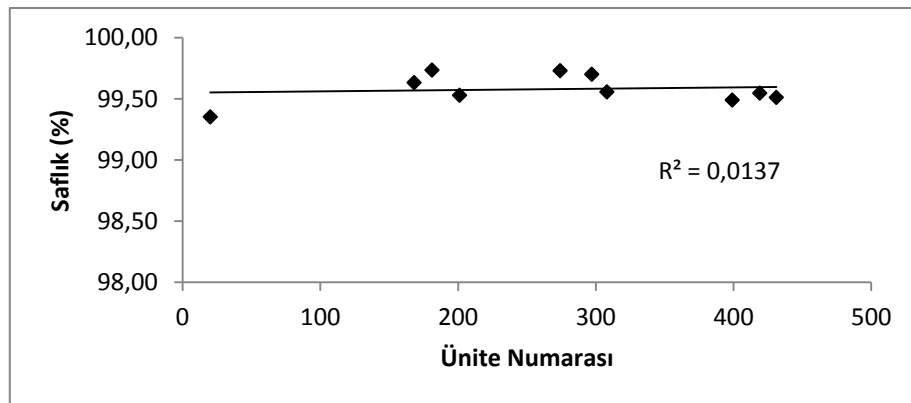
Ölçümler, bulgulardaki varyansın kaynağını doğru tespiti için karışık bir sıra ile alınmıştır. Böylece analiz veya dolumdan gelebilecek olası bir eğilim, malzemenin homojen olmamasından ayırt edilmiş olmaktadır. Veri Tablo 2’de ve qNMR tekniğine ait bilgiler Tablo 13’de (Ek II) sunulmuştur. Farklı üniteler için elde edilen değerler tek tepeli dağılım göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar bağlanım (regresyon) analizi ile incelenmiştir. Eğitimde istatistiksel anlamlılık olup olmadığını sınamak için % 95 güvenilirlik seviyesinde “t-Testi” uygulanmıştır. Analiz ve dolum sıralamasından gelen istatistiksel bir anlamlılık bulunmamaktadır.

Tablo 2. Homojenlik değerlendirmesine ait ölçüm sonuçları.

Ünite No	Safılık [%]	
	Sonuç 1	Sonuç 2
20	99,23	99,48
168	99,62	99,65
181	99,75	99,72
201	99,25	99,81
274	99,77	99,69
297	99,59	99,81
308	99,25	99,87
399	99,58	99,40
419	99,51	99,58
431	99,52	99,50

Veri seti tek ve çift aykırı değer açısından da “Grubbs’ Testi” kullanılarak % 95 güvenilirlik seviyesinde incelenmiştir. Bir aykırı değer gözlenmemiştir. Ünite içi homojen olmama durumu ANOVA ile incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 3’de sunulmuştur.



Grafik 1. Homojenlik çalışmasında elde edilen ölçüm sonuçları.

Tablo 3. Homojenlik ölçüm sonuçları ile elde edilen tek yönlü ANOVA bulguları.

ÖZET			
Gruplar	Tekrar	Ortalama [%]	Varyans
20	2	99,35	0,03
168	2	99,63	0,00
181	2	99,74	0,00
201	2	99,53	0,15
274	2	99,73	0,00
297	2	99,70	0,02
308	2	99,56	0,19
399	2	99,49	0,02
419	2	99,55	0,00
431	2	99,51	0,00

ANOVA					
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	F _{ölçütü}
Gruplar Arasında	0,27	9	0,03	0,70	3,02
Gruplar İçinde	0,42	10	0,04		

$MS_{between}$ (0,03) < MS_{within} (0,04), olduğu durumlarda üniteler s_{bb} hesaplanamaz. Bunun yerine yöntem tekrarlanabilirliğince gizlenmiş üniteler arası standart belirsizlik (u^*_{bb}) aşağıdaki gibi hesaplanır^[13]:

$$u^*_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \sqrt{\frac{2}{N(n-1)}}$$

Bu durumda u^*_{bb} , % 0,10 olarak elde edilir.

ANOVA bulguları dolumdan gelen bir eğilimin olmadığına işaret etmektedir ($F = 0,70 > F_{ölçütü} = 3,02$).

Yüksek saflıkta malzemelerin homojen olması beklenir. Fakat üretimden kaynaklanabilecek herhangi bir kirlenmenin tespiti ve derecelendirilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak ölçümler için kullanılan örnek miktarı seviyesinde (10 mg) malzeme homojendir.

Sayfa 11 / 26	TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ	UME CRM 1301
---------------	---	-------------------------------

KARARLILIK

Sertifikalı referans malzemenin nakliyesi sırasında meydana gelebilecek çevresel şartların (kısa dönem kararlılık) ve depolama koşullarının (uzun dönem kararlılık) test edilmesi için iki ayrı kararlılık çalışması gerçekleştirilmiştir. Birinci çalışma dört haftalık, ikinci çalışma ise sekiz aylık süreçlerde zaman ve sıcaklık gibi kararlılığı etkileyebilecek faktörlerin test edildiği laboratuvar çalışmalarıdır. Bu çalışmalar için belirli sayıda örnek, farklı sıcaklık değerlerine farklı süreler boyunca tabi tutulup, örnek üzerinde herhangi bir değişikliğin olmayacağı (örneğin kararlı olduğu) referans sıcaklığa (-20 °C) aktarılmıştır (eş zamanlı izleme-isochronous setup)^[14]. Süre tamamlandığında tüm örneklerin analizi aynı anda yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik koşulları sağlanarak karışık sıra ile ölçümler yapılmıştır. Tüm üniteler için iki tekrarlı analiz gerçekleştirilmiştir. Deneysel ayrıntılar ve cihaz özellikleri homojenlik deneyleri ile aynıdır ve EK II'de verilmiştir. Zamanın saflık üzerine etkisinin tespiti için örnekler karışık sıra ile analiz edilmiştir.

Kısa Dönem Kararlılık Çalışması:

Kısa dönem kararlılık çalışmasında, her bir sıcaklık için 2 örnek olmak üzere toplam 26 örnek, 4 °C, 25 °C ve 45 °C sıcaklıklarda toplam dört hafta saklanmıştır (Tablo 4). Her bir hafta sonunda, bir sıcaklık için iki örnek, tüm bekleme süresi tamamlanana kadar referans sıcaklığa aktarılmıştır.

Elde edilen veri (Tablo 5), sıcaklık grupları için ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Tablo 6). Sonuçlar, en yüksek ve en düşük değerlerin, aykırı değer olup olmadığının tespiti için "Grubbs' Testi" ile değerlendirilmiş, aykırı değer olmadığı gözlenmiştir.

Buna ek olarak, kütle kesrinin sıcaklık ile değişimi her bir sıcaklık için değerlendirilmiştir. Regresyon doğruları istatistiksel anlamlılık açısından incelendiğinde, eğimin sıfırdan çok fazla sapmadığı gözlenmiştir (% 95 güvenilirlik seviyesinde tüm seçilen sıcaklıklar için Tablo 7, Grafik 2).

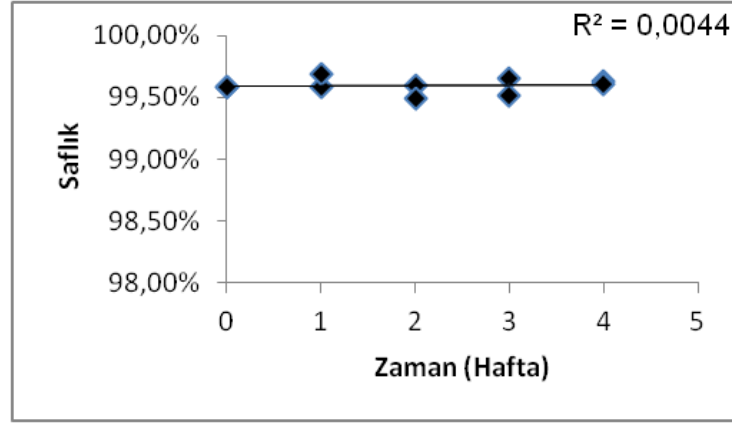
Tablo 4. Kısa dönem kararlılık değerlendirmesine ait eş zamanlı izleme (isochronous setup) verisi.

Ünite No	Sıcaklık [°C]	Zaman [Hafta]
402	-20	0
464	-20	0
416	4	1
454	4	1
74	4	2
100	4	2
433	4	3
458	4	3
73	4	4
266	4	4
370	25	1
375	25	1
326	25	2
212	25	2
197	25	3
247	25	3
292	25	4
305	25	4
112	45	1
152	45	1
11	45	2
126	45	2
60	45	3
345	45	3
7	45	4
141	45	4

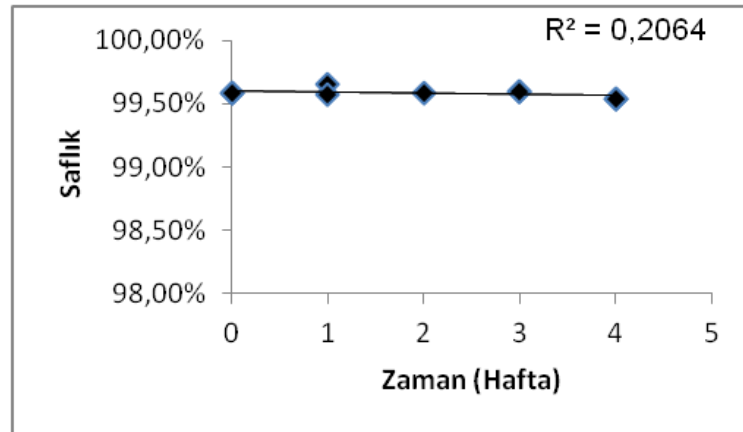
Tablo 5. Kısa dönem kararlılık çalışmasına ait ölçüm sonuçları.

Zaman [Hafta]	Safılık [%]		
	4 °C	25 °C	45 °C
0	99,58	99,58	99,58
0	99,58	99,58	99,58
1	99,59	99,65	99,49
1	99,69	99,57	99,56
2	99,60	99,58	99,50
2	99,50	99,54	99,52
3	99,65	99,59	99,61
3	99,52	99,60	99,58
4	99,64	99,54	99,58
4	99,61	99,54	99,66

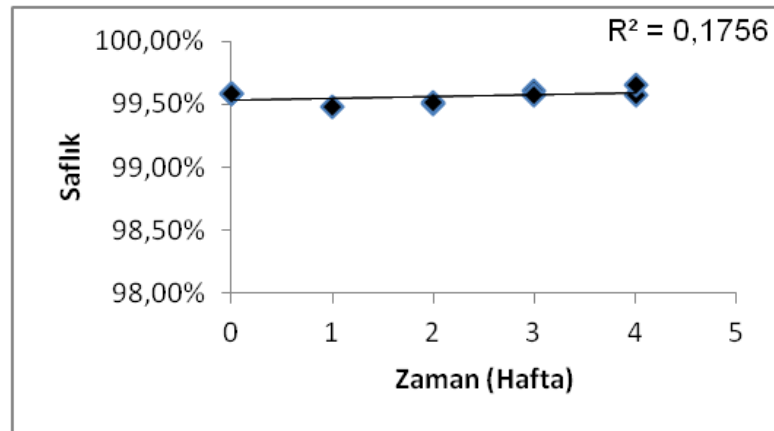
a) 4 °C



b) 25 °C



c) 45 °C



Grafik 2. Kısa dönem kararlılık verisi ile hazırlanmış, farklı sıcaklıklar için a) 4 °C, b) 25 °C ve c) 45 °C için bağlanım (regresyon) eğrileri:

Tablo 6. Kısa Dönem kararlılık ölçüm sonuçlarına ait tek yönlü ANOVA analizi.

Gruplar (saklama sıcaklığı) [°C]	Tekrar Sayısı	Ortalama Kütle kesri [%]	Varyans
-20	2	99,58	0
4	8	99,60	4,22 x 10 ⁻⁷
25	7	99,60	1,49 x 10 ⁻⁷
45	7	99,55	1,48 x 10 ⁻⁷

ANOVA					
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	F _{krit}
Grup içi	1,00 x 10 ⁻⁶	3	3,36 x 10 ⁻⁷	1,42	3,10
Gruplar arası	4,75 x 10 ⁻⁶	20	2,37 x 10 ⁻⁷		
Toplam	5,75 x 10 ⁻⁶	23			

Tablo 7. Bağlanım analizi bulguları.

İstatistiksel Parametreler	4 °C	25 °C	45 °C
Eğim	2,57 x 10 ⁻⁵	3,00 x 10 ⁻⁶	3,07 x 10 ⁻⁵
Eğim / s _b	1,37 x 10 ⁻⁴	8,34 x 10 ⁻⁵	8,71 x 10 ⁻⁵
İstatistiksel anlamlılık (significance)	-	-	-
u _{sts}	% 0,01	% 0,01	% 0,01

Sonuç olarak UME CRM 1301, 45 °C'yi aşmayan sıcaklıklarda herhangi bir soğutma önlemi alınmadan son kullanıcıya ulaştırılabilir.

Uzun Dönem Kararlılık Çalışması:

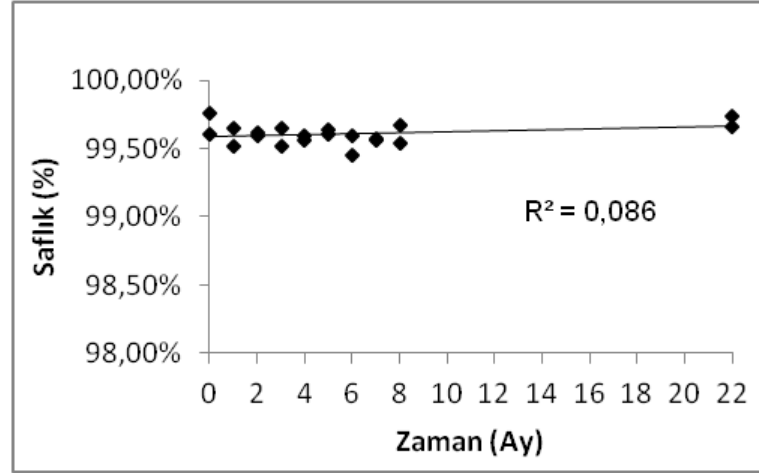
Ticari üretimi yapılan ilk antibiyotik olan kloramfenikol için literatürde toz halinin oda sıcaklığında kararlı olduğu, fakat ısıya maruz kaldığında veya sterilizasyon amaçlı gama ışımaya tabi tutulduğunda bozunma ürünlerinin derişiminde artış olduğu raporlanmıştır ^[9,10]. Buna ek olarak, kısa dönem kararlılık çalışmasında yüksek sıcaklık değeri olarak seçilen 45 °C'de önemli bir bozunma gözlenmemiştir (Grafik 3). Bu bilgi ışığında uzun dönem kararlılık test süresi olarak 8 ay seçilmiştir.

Uzun dönem kararlılık çalışması için, tüm üniteler içerisinde (yedekleri ile birlikte) toplam yirmi örnek, TRaNS yöntemi ile seçilmiş (Tablo 8) ve örnekler sekiz ay boyunca 25 °C'de sabit sıcaklıkta tutulmuştur. Her bir ay sonunda iki örnek (ve iki yedeği) referans sıcaklığa (-20 °C) aktarılmıştır. Ölçümler tekrarlanabilirlik koşulları altında, dolum sırasından farklı bir sıralama ile gerçekleştirilmiştir. Analizler qNMR tekniği (EK II'de raporlanan deney ve cihaz parametreleri kullanılarak) ile gerçekleştirilmiştir. qNMR tekniğinde her bir üniteden iki paralel örnek hazırlanarak ölçüm alınmış ve sonuçlar Tablo 8'de sunulmuştur.

Elde edilen veri istatistiksel olarak incelenmiştir (Tablo 9). Aykırı değer için "Grubbs' Testi" ile analiz yapılmış ve herhangi bir aykırı değere rastlanılmamıştır.

Tablo 8. Uzun dönem kararlılık çalışması ölçüm sonuçları.

Zaman [ay]	Safılık [%]	Ünite No
0	99,76	268
0	99,60	315
1	99,52	367
1	99,65	180
2	99,61	32
2	99,59	327
3	99,65	198
3	99,52	339
4	99,56	481
4	99,59	17
5	99,61	41
5	99,64	65
6	99,59	150
6	99,45	217
7	99,56	280
7	99,58	378
8	99,54	437
8	99,68	494
22	99,74	7
22	99,66	8



Grafik 3. Uzun dönem kararlılık verisi ile hazırlanmış bağlanım (regresyon) eğrisi.

Tablo 9. Uzun dönem kararlılık verisinin istatistiksel değerlendirmesi.

İstatistiksel Parametreler	Değer*
Eğim	$1,79 \times 10^{-5}$
Eğim / s_b	$5,04 \times 10^{-5}$
İstatistiksel anlamlılık (% 95 güvenilirlik seviyesi)	-
u_{lts} [3 yıl]	% 0,18 (% 0,10)

*Parantez içindeki değer 22 aylık izleme sürecine ait veriden 3 yıl için genişletilerek hesaplanan değerdir.

Zamana karşı çizilen saflık grafiğinin eğiminin sıfırdan çok farklı olmadığı (Grafik 3) görülmüştür. İstatistiksel olarak % 95 güvenilirlik seviyesinde değerlendirildiğinde eğimde bir anlamlılık olmadığı tespit edilmiştir.

Üç yıllık raf ömrü için uzun dönem kararlılık ölçümlerinden gelen belirsizlik u_{lts} aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır ^[15]. Formülde RSD_{stab} deney sonucuna ait bağıl standart sapma, X_i , her bir tekrar için zaman dilimi, \bar{X} tüm zaman değerlerinin ortalaması ve x önceden tespit edilmiş raf ömrüdür.

$$u_{lts} = \frac{RSD_{stab}}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2}} \cdot x$$

Veriler, malzemenin 25 °C'de saklamaya uygun olduğunu göstermektedir. Sertifikasyon sonrası izleme yapılarak malzemenin satışta olduğu süre boyunca kararlılığı düzenli olarak izlenecektir.

KARAKTERİZASYON

UME CRM 1301'in saflık değerlendirmesi ISO Guide 34'e uygun olarak iki farklı yöntem ile yapılmıştır. qNMR saflığının doğrudan elde edildiği, kütle denkliği ise safsızlık yüzdeleri üzerinden hesaplamaların yapıldığı metotlardır^[10].

Kütle denkliği yönteminde, HPLC ile CAP saflığı, CAP'a ait pik alanının, tüm pik alanlarının toplamı ile kıyaslanması ile bulunmuştur. CAP saflığı HPLC saflığından, tüm safsızlıkların miktarının çıkarılması ile elde edilmiştir.

$$P_{CAP} = P_{HPLC} - (w_{su} + w_{anorganik\ kalıntı})$$

P_{CAP} : CAP saflığı

P_{HPLC} : HPLC ile alan oranlarından elde edilmiş saflık

w_{SU} : Su miktarı

$w_{anorganik\ kalıntı}$: Anorganik kalıntı miktarı

UV aktif safsızlıklar, yüksek derişimde (5000 mg/L) CAP çözeltilisinin HPLC kromatogramında tespit edilmiş ve sonrasında düşük derişimde (yaklaşık 200 mg/L) pik alanlarının normalizasyonu ile miktarları belirlenmiştir. HPLC saflığı malzemeye ait HPLC kromatogramı ile elde edilen tüm sinyallerin alan toplamının CAP'a ait alana oranı olarak hesaplanır. Analizler için Thermo Finnigan Surveyor PDA Plus Algılayıcı HPLC, (Amerika) cihazı kullanılmıştır. Bu yaklaşım ile elde edilen saflık % (99,59 ± 0,16)'dır (10 değer aritmetik ortalaması ve tekrarlanabilirlik ile hesaplanmış belirsizlik $k = 2$ kapsam faktörü ile genişletilmiştir).

cKFT ölçümlerine göre nem içeriği, on sonucun ortalaması alınarak % (0,0881 ± 0,0016) olarak belirlenmiştir. Bu analizde ölçüm kalitesi NIST SRM 2890 ile kontrol edilmiştir. Analiz Mettler Toledo C30 kulometrik KF titratör (İsviçre) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

TG analizleri için (2 - 6) mg örnek kullanılmıştır. Analizler Exstar SII TG/DTA 7300 (Japonya) cihazı ile yapılmıştır. Deneyler sabit oksijen yüzdesi ile, 50 mL/min hava akış hızında, 10 °C/min ısıtma hızı 25 °C'den 750 °C'ye ısıtılıp 500 °C'de sisteme oksijen verilerek gerçekleştirilmiştir. TG spektrumunda 25 °C ile 150 °C arasında herhangi bir ağırlık kaybı gözlenmemektedir. Buradan örnek bünyesinde serbest su ve herhangi bir organik çözücü olmadığı anlaşılmaktadır. 150 °C'de başlayan erime ile birlikte % 0,3'lük ağırlık kaybı gözlenmiştir ve kaybın termal olarak kararsız bir gruba ait olduğu düşünülmektedir.

Uçucu organik bileşiklerin tayini için CAP örnekleri HS-GC ile de analiz edilmiştir. Ancak malzemedeki uçucu organik bileşiklerin miktarının algılama sınırının altında olduğu tespit edilmiştir. Deneyler GC-MS/MS sistemine bağlı Headspace otomatik örnekleme cihazı Thermo Trace, TSQ Quantum XLS, (Amerika) ile yapılmıştır. HS ve GC Analiz yöntemleri Ek II'de verilmiştir.

İnorganik içeriğin tespiti için önce ICP-MS ile bir ön tarama yapılmış ve malzemede sodyum, magnezyum, potasyum, kalsiyum, demir, vanadyum ve alüminyum olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra HR ICP-MS Thermo Finnigan Element 2 (Almanya) cihazı ile adı geçen elementlerin miktarlarının tayini gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde sodyum için NIST SRM 3152a, magnezyum için NIST SRM 3131a, potasyum için NIST SRM 3141a, kalsiyum için NIST SRM 3109a, demir için NIST SRM 3126a, vanadyum için NIST SRM 3165 ve alüminyum için NIST SRM 3101a kalibrant olarak kullanılmıştır. Analizler US EPA 6020A standart metoduna göre yapılmıştır ^[19]. Bulgular Ek l'de sunulmuştur. Hesaplamalar elementlerin oksit tuzları dikkate alınarak yapılmıştır.

İnorganik kalıntı analizi için örnekler, analiz edilmek üzere (analitik saflıkta) % 10'luk metanol ile 1:200 oranında seyreltilmiştir. İnorganik kalıntı miktarları Tablo 10'da verilmiştir. Sertifika değeri hesaplanırken bu değer oldukça düşük olduğu ve sonucu, raporlandığı haliyle etkilemediği gözlenmiştir.

Tablo 10. İnorganik kalıntı miktarları

Ünite No	Miktar [µg/kg]							Toplam*
	Na	Al	Ca	K	Mg	Fe	V	
57	4,18	0,24	2,28	0,52	0,26	0,11	0,002	Toplam*
261	4,48	0,12	1,05	0,47	0,25	0,12	0,002	
316	4,60	0,12	0,96	0,51	0,26	0,10	0,002	
								217,03

* Toplam miktar elementlerin en çok bulunan oksit tuzları dikkate alınarak hesaplanmıştır.

UME CRM 1301 için qNMR ile belirlenen saflık değeri % (99,67 ± 0,15) ($k = 2$, norm)'dir. qNMR için iki farklı iç standart (benzoik asit ve trimetoksi benzen) kullanılmış, izlenebilirlik NIST SRM 350b üzerinden sağlanmıştır.

ÖZELLİK DEĞERLERİNİN VE BELİRSİZLİKLERİNİN ATANMASI

Sertifikalandırılan değer her iki yöntemin ortalamasıdır (Tablo 11). Belirsizlik değeri karakterizasyon çalışmasına ait belirsizliği içermektedir. Homojenlik çalışmasından, kısa ve uzun dönem kararlılık testlerinden elde edilen belirsizlik değerleri ihmal edilmiştir. Uzun dönem kararlılık testi sonuçları ilk bakışta 8 ay için anlamlı bir bozunmaya işaret etse de, 22 ay sonunda gerçekleştirilen sertifikasyon sonrası izleme ölçümleri malzemenin özellik değerinin bildirilen belirsizliği ile geçerli olduğunu göstermektedir.

Tablo 11. UME CRM 1301'e ait sertifikalandırılmış değer ve belirsizlik.

Parametre	Değer [%]
Safılık (KD)	99,49
Safılık (qNMR)	99,67
Safılık (SRM)	99,58
u_{KD}	0,019
u_{qNMR}	0,074
U_{CRM}	0,15 ($k = 2$, norm)

Sertifika değeri için beyan edilen genişletilmiş ölçüm belirsizliği, standart ölçüm belirsizliğinin normal dağılım için yaklaşık % 95 güvenilirlik seviyesini sağlayan $k = 2$ kapsam faktörü ile çarpımının sonucudur. Karakterizasyon ölçüm belirsizliği, kütle denkliği yöntemi ve qNMR tekniği belirsizlik değerlerinin birleştirilmesi ile aşağıda verilen formüle göre belirlenmiştir.

$$U_{CRM} = k \cdot u_{char} = k \cdot \sqrt{u_{KD}^2 + u_{qNMR}^2}$$

UME CRM 1301 Kloramfenikol Birincil kalibrant sertifikalı referans malzemesine için sertifikalandırılmış kloramfenikol saflığı aşağıda verilmiştir:

$$\% (99,58 \pm 0,15) (k = 2, \text{norm})$$

Sayfa 21 / 26	TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ	UME CRM 1301
---------------	---	-------------------------------

İZLENEBİLİRLİK

Atanmış değer HPLC-DAD, KF ve HR ICP-MS ile elde edilen kütle denkliği yöntemi ve qNMR tekniği ile elde sonuçların bulguların istatistiksel ortalamasıdır. Bu iki yaklaşım birbirinden tamamen farklı numune hazırlama yöntemlerine sahip olduğu için, atanmış değer için örnek hazırlamadan bağımsız olduğu ifade edilir.

HPLC-UV, LC-MS/MS, KF, ICP-MS ve qNMR yöntemleri analitin ayrıştırılması ve ölçülen büyüklüğün tespiti için kullanılmıştır. Mevcut ve uygun olduğu her durumda SRM kullanılmıştır. HPLC yöntemi ile saflık tayininde, yöntem kendi içinde değer ürettiği için SRM kullanımı gerektirmediği genel olarak kabul görmektedir.

UME CRM 1301 sertifikalı referans malzemesinin izlenebilirliği CCQM-K81 (Chloramphenicol as residue in pig muscle) ^[20] ve G3KI-4300 ve G3KI-4400 kodlu “yüksek saflıkta kimyasallar, organik bileşikler (high purity chemicals, organic compounds)” isimli CMC girdileri ^[21] ile desteklenmektedir.

UME CRM 1301'in sertifikalandırılan saflığı SI izlenebilirdir.

Sayfa 22 / 26	TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ	UME CRM 1301
---------------	---	-------------------------------

KULLANIM TALİMATI

Saklama koşulları

Malzeme için önerilen saklama koşulları (25 ± 3) °C sıcaklık ve karanlık ortamdır. Referans malzemelerin -özellikle kapakları açılmış olan- müşteriye ait tesislerde depolanmaları sırasında meydana gelen değişikliklerden TÜBİTAK UME sorumlu tutulamaz.

Güvenlik önlemleri

Genel laboratuvar güvenlik kuralları geçerlidir. Kullanım öncesi malzeme GBF (MSDS) incelenmelidir.

Kullanım Amacı

Bu malzeme izlenebilirliğin sağlanması, metot performansının kontrolü ve metot geçerli kılma çalışmaları için kullanılabilir. Metot başarımının tespiti için ölçülen değerler, sertifikalandırılan değer ile kıyaslanabilir^[22]. Kıyaslama yöntemi kısaca aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Ölçülen değerlerin ortalaması ile sertifikalandırılan değer arasındaki fark hesaplanır (Δm).
- Ölçüm belirsizliği (u_{meas}) ile sertifikalandırılmış değer belirsizliği birleştirilir (u_{CRM}):

$$u_{\Delta} = \sqrt{u_{meas}^2 + u_{CRM}^2}$$

- Genişletilmiş ölçüm belirsizliği (U_{Δ}), standart ölçüm belirsizliğinin (u_{Δ}), normal dağılım için yaklaşık % 95 güvenilirlik seviyesini sağlayan $k = 2$ kapsam faktörü ile çarpılarak belirlenir.

Eğer $\Delta m \leq U_{\Delta}$ ise, ölçülen büyüklük ile sertifika değeri arasında % 95 güvenilirlik seviyesinde fark olmadığı sonucuna ulaşılır.

TEŞEKKÜR

Bernd GÜTTLER (PTB, Almanya) ve Gavin O'CONNOR'a (LGC, İngiltere) ikili gözden geçirmeler, John WARREN (LGC, İngiltere) ve Stephen DAVIES'e (NMIA, Avustralya) qNMR analizleri konusundaki faydalı önerileri, Sn. Simay GÜNDÜZ'e qNMR analizleri için verdiği destek, Sn. Nihal ZORLU'ya su tayini analizleri, Sn. Hasibe YILMAZ ve Gökhan BİLSEL'e TGA ve HS-GS/MS analizleri, Sn. Murat TUNÇ'a HR ICP-MS analizleri, Sn. Nilgün TOKMAN ve Sn. Burcu BİNİCİ'ye belirsizlik hesaplamaları ve TÜBİTAK UME Kimya Grubu laboratuvarları çalışanlarına katkıları için teşekkür ederiz.

Sayfa 23 / 26	TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ	UME CRM 1301
---------------	---	-------------------------------

KAYNAKLAR

1. European Agency for Evaluation of Medicinal Products, Chloramphenicol Summary Report, 1996.
2. Akar, F., "Tavuk eti ve karaciğerlerinde bazı antibiyotik kalıntılarının araştırılması" A.Ü. Vet. Fak. Dergisi (1994) 41(2), 199-207.
3. Lee, M. H., Lee, H. J. and Ryo, P. D. "Public health risks: chemical and antibiotic residues: review" Asian-Australian J. Anim. Sci. (2000), 14, 402-413.
4. Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik
5. Ulusal Kalıntı İzleme Planı- 2011, Türkiye, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü (KKGM) Kontrol Daire Başkanlığı
6. "Commission Decision" 96/23/EC of 29 April 1996; Off. Eur. Commun. 1996, L125/10
7. ISO Guide 34, General requirements for the competence of reference materials producers, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2009
8. ISO/IEC Guide 98-3, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, (GUM 1995), International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2008.
9. Meakin, J.B., Davies, D. J.G., Richardson, N. E., Stroud, N., "Quality Control of Chloramphenicol in Pharmaceutical preparations." Acta Pharm. Tech. (1979), 25, 29-48.
10. Hong L, Altorfer H., "Determination of assay and impurities of gamma irradiated chloramphenicol in eye ointment", J. Pharm. Biomed. Anal. (2001), 24(4), 667-74.
11. RASFF Portal:<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>, son erişim tarihi: 30.07.2013
12. "Commission Decision" 2003/181/EC of 13 March 2003; Off. Eur. Commun. 2003, L71/17.
13. Linsinger, T.P., Pauwels, J., Van der Veen, A.M.H., Schimmel H., Lamberty, A., Homogeneity and Stability of Reference Materials. Accred. Qual. Assur. 6 (2001), 20.
14. Lamberty, A., Schimmel, H., Pauwels, J., The study of the stability of reference materials by isochronous measurements, Fres. J. Anal. Chem. (1998), 360, 359.
15. Linsinger, T.P., Pauwels, J., Lamberty, A., Schimmel, H., Van der Veen, A.M.H., Siekmann, L., "Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs" Fresenius J. Anal. Chem. (2001), 370, 183.
16. Holzgrave, U., Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. (2010), 57, 229.
17. Liu, S., Hu, C., A comparative study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balancemethods. Anal. Chim. Acta. (2007), 602, 114.
18. Hong, L., Horni, A., Hesse, M., Altorfer, H., "Identification and evaluation of radiolysis products of irradiated CAP by HPLC-MS and HPLC-DAD" Chromatographia (2002), 55 (1-2), 13-18.
19. "Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry" EPA Method 6020A , Revision 1, February 2007

Sayfa 24 / 26	TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ	UME CRM 1301
---------------	---	-------------------------

20. BIPM Key Comparison CCQM-K81 Information :
http://kcdb.bipm.org/appendixB/KCDB_ApB_info.asp?cmp_idy=1077&cmp_cod=CCQM-K81&page=
21. BIPM Key Comparison G3KI-4400 ve G3KI-4300 :
http://www.bipm.org/exalead_kcdb/exa_kcdb.jsp?_p=AppC&_q=UME&x=-992&y=-320 (son erişim tarihi: 30.07.2013))
22. Linsinger, T.P.J. Comparison of measurement result with the certified value, ERM Application Note1, July 2005.

REVİZYON TARİHÇESİ

Tarih	Açıklama
05.12.2014	İlk yayın.

EKLER

EK I: Kütle Denkliği Yöntemi

Kütle Denkliği Yöntemine ait detaylar aşağıda verilmiştir.

Tablo 12. HPLC-DAD deney koşulları

Kolon	C18 Synergi MAX-RP 150 x 4,6 mm, 5 µm
Mobil Faz	40:60 Metanol:su (izokratik)
Sıcaklık	25 °C
Akış Hızı	1 mL/min
Dalga boyu	273 nm

Tablo 13. "Head Space" Otomatik Örnekleme Yöntem Parametreleri

Örnek hacmi	2 mL
İnkubasyon zamanı	10 min
Vial fırın sıcaklığı	100 °C
Transfer Sıcaklığı	90 °C
Şırınga sıcaklığı	90 °C

Tablo 14. GC Yöntem Parametreleri

Kolon	HT-5 kolon (15 m x 0,25 mm, Ø 0,10 µm film kalınlığı)
Enjeksiyon modu ve hacmi	Split, 0,35 mL
Enjeksiyon Sıcaklığı	250 °C
Split Oranı	1:20
Taşıyıcı Gaz, akış hızı	He, 1 mL/min
GC fırın programı	40 °C'de 1 min bekleme ardından 10 °C/min artış ile 240°C'ye ulaştırılmıştır. Bu sıcaklıkta 2 min bekletilmiştir.

Tablo 15. HR ICP-MS yöntem parametreleri

Parametre	Değer
Güç	1105 W
Pompa Hızı	15 rpm
Argon soğutma gazı	16 L/min
Argon yardımcı gaz	0,8 L/min
Argon taşıyıcı gaz	1,075 L/min
Sisleştirici	Seaspray
Sisleştirme Odası	Quartz, Cyclonic

EK II: qNMR Yöntemi

NMR deneyleri, dötoro dimetil sülfoksit, DMSO-d₆, içerisinde ¹H ve ¹³C{¹H} NMR için sırasıyla 599,77 MHz ve 150,83 MHz frekanslarında, 5 mm çok çekirdekli sıvı probun kullanıldığı 600 MHz NMR spektrometresinde (Varian VNMRS 600 MHz, USA) yapılmıştır. % 99,9 dötoro atom ile % 0,1 hacim TMS içeren DMSO-d₆, spektroskopik saflıkta (Merck, Almanya, S5566287) herhangi bir saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. ¹H ve ¹³C{¹H} NMR deneyleri sırasıyla 7,4 µs ve 13,8 µs 90° sinyal genişliği kullanılarak alınmıştır. NMR parametreleri Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. NMR parametreleri

Parametre	Değer
Sinyal Açısı	90°
Algılayıcı Kazancı	Autogain
Tarama Sayısı (nt)	32
Durulma Zamanı (d1)	40 s
Sinyalin Uygulanma Süresi (at)	3,4 s
Dönüşüm ölçüsü	64 K
Spektral Genişlik (sw)	9615,4 Hz
Çizgi Genişliği (lb)	0,3 Hz
Sıcaklık	25 °C