

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAVUK ETİNDE ANTİBİYOTİK KALINTILARININ HPLC YÖNTEMİYLE
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba YILDIZ

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

OCAK 2014

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAVUK ETİNDE ANTİBİYOTİK KALINTILARININ HPLC YÖNTEMİYLE
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba YILDIZ

(509101105)

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birsen Demirata ÖZTÜRK

OCAK 2014

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509101105 numaralı Yüksek Lisans / Doktora Öğrencisi **Tuğba YILDIZ**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**TAVUK ETİNDE ANTİBİYOTİK KALINTILARININ HPLC YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Yrd. Doç. Dr. Ferah Çalışır**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Sema Demirci Çekiç
İstanbul Üniversitesi

Teslim Tarihi : **16 Aralık 2013**
Savunma Tarihi : **21 Ocak 2014**

Canım Aileme,

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca sürekli beni destekleyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yön veren değerli hocam ve tez tanışmanım Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK'e, Eksiklerimde bana yardımcı olan F. Ayça ÖZDEMİR, Dilek ÖZYURT ve K. Işıl BERKER hocalarıma,

Tez çalışmalarım boyunca manevi olarak sürekli yanımda olan arkadaşım Semanur SARIBUĞA' ya,

Kısıtlı zamanına rağmen çalışmamda bana yardımcı olan Nur KILINÇ'a ve diğer arkadaşlarıma,

Kendi yüksek lisans çalışmalarına rağmen daima benim yanımda olan ve manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen canım kardeşim Kübra YILDIZ'a,

Beni bu yaşa kadar getirip, attığım her adımda arkamda duran anneme, babama ve abime teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ocak 2014

Tuğba YILDIZ

(Kimyager)

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Antibiyotik	3
2.1.1 Antibiyotiklerin tavuklarda kullanılması.....	3
2.1.2 Antibiyotiklerin etki mekanizması	6
2.1.3 Antibiyotiklerin olumsuz etkileri	7
2.1.4 Antibiyotik kalıntılarının insan sağlığı üzerine etkileri	7
2.2 Hayvanlarda Antibiyotik Kalıntısının Nedenleri.....	8
2.3 Türkiyede Veteriner İlaç Kontrolü	8
2.3.1 Mevzuat.....	9
2.3.2 MRL (Maksimum kalıntı limiti)	9
3. ANTİBİYOTİKLERİN SINIFLANDIRILMALARI	11
3.1 Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılmaları	11
3.1.1 Bakteriyostatikler	11
3.1.2 Bakterisidler	12
3.2 Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları.....	12
4. TAVUKLARDA EN ÇOK KULLANILAN ANTİBİYOTİK ÇEŞİTLERİ... 17	17
4.1 β-Laktamlar	17
4.1.1 Penisilinler.....	18
4.1.1.1 Penisilinlerin etki spektrumlarına göre sınıflandırılmaları.....	19
4.1.1.2 Penisilin G	20
4.2 Tetrasiklinler.....	21
4.2.1 Tetrasiklinlerin etki spektrumu	23
4.2.2 Tetrasiklinlerin yan etkileri	24
4.2.3 Oksitetrasiklin	24
5. HPLC SİSTEMİ.....	27
5.1 Normal Faz Kromatografi	28
5.2 Ters Faz Kromatografisi.....	28
5.3 Katı Faz Ekstraksiyonu Sistemi.....	29
6. ÇALIŞMANIN AMACI VE İÇERİĞİ.....	31
6.1 Tavuklarda Antibiyotik Kalıntısı İle İlgili Önceki Çalışmalar.....	31
7. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
7.1 Materyal.....	35
7.1.1 Kullanılan cihaz	35
7.1.2 Laboratuvar gereçleri	35
7.1.3 Kullanılan kimyasallar	36

7.1.4	Tampon çözeltilerin hazırlanması.....	36
7.1.4.1	McIlvaine tamponu	36
7.1.4.2	Fosfat tamponu	36
7.1.5	Örnek hazırlamada kullanılan çözeltilerin hazırlanması	37
7.1.5.1	%20'lik TCA Çözeltisi.....	37
7.1.5.2	%5'lik MeOH çözeltisi.....	37
7.1.5.3	% 0,1'lik Formik asit çözeltisi	37
7.1.5.4	0,03 M Metanolik okzalik asit çözeltisi	37
7.1.5.5	0,025 M KH ₂ PO ₄ çözeltisi	37
7.1.6	Stok standart çözeltilerin hazırlanması.....	37
7.1.6.1	Tetrasiklin stok standardı (1 mg/mL).....	37
7.1.6.2	Oksitetrasiklin stok standardı (1 mg/mL).....	37
7.1.6.3	Penisilin G stok standardı (1 mg/mL)	38
7.1.7	Çalışma standart çözeltilerin hazırlanılması	38
7.1.7.1	Tetrasiklin ve oksitetrasiklin çalışma standartları (10 µg /mL)	38
7.1.7.2	Tetrasiklin ve oksitetrasiklin çalışma standartları (20 µg /mL)	38
7.1.7.3	Tetrasiklin ve oksitetrasiklin çalışma standartları (40 µg /mL)	38
7.1.7.4	Tetrasiklin ve oksitetrasiklin çalışma standartları (80 µg /mL)	38
7.1.7.5	Tetrasiklin ve oksitetrasiklin çalışma standartları (160 µg /mL) ...	38
7.2	Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin için Geliştirilen Yöntem	39
7.2.1	Örnek hazırlama	39
7.2.2	HPLC ile tetrasiklin ve oksitetrasiklin analizi	39
7.3	Penisilin G için Geliştirilen Yöntem	41
7.3.1	Örnek hazırlama	41
7.3.2	HPLC ile Pen G analizi	42
7.4	Yöntem Parametreleri	43
7.4.1	Tayin limiti (LOD)	43
7.4.2	Ölçüm limiti (LOQ).....	43
7.4.3	Geri kazanım oranı	44
8.	SONUÇLAR VE YORUMLAR.....	47
	KAYNAKLAR.....	55
	EKLER.....	59
	ÖZGEÇMİŞ.....	63

KISALTMALAR

mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
MRL	: Maximum Residue Limit (Maksimum Kalıntı Limiti)
ppb	: Milyarda bir ölçü birimi
ppm	: Milyonda bir ölçü birimi
TC	: Tetrasiklin
OTC	: Oksitetrasiklin
PEN G	: Penisilin G
TCA	: Trikloroasetik asit
MeOH	: Metanol
ACN	: Asetonitril
FDA	: Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Teskilatı)
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
FAO	: Food and Agriculture Organization (Besin ve Tarım Örgütü)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
KFE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
LC	: Liquid Chromatography
ADI	: Acceptable Daily Intake (Kabul Edilebilir Günlük Alım)
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Yıllara Göre Antibiyotik Büyütme Faktörlerinin Yasaklanması.	5
Çizelge 2.2: Antibakteriyellerin etki spektrumu.....	10
Çizelge 3.1: Bakteriyostatik etkili antibiyotikler.....	11
Çizelge 3.2: Bakterisid Etkili Antibiyotikler	12
Çizelge 3.3: Bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive	12
Çizelge 3.4: Sitoplazma membran permeabilitesini bozanlar... ..	13
Çizelge 3.5: Ribozomlarda protein sentezini bozanlar.....	13
Çizelge 3.6: Bakteri genetik materyali üzerine etki yapanlar.....	13
Çizelge 3.7: Bakteriyel antimetabolitler.....	14
Çizelge 3.8: B-laktam antibiyotiklerinin sınıflandırılması.....	14
Çizelge 3.9: Tetrasiklin, Nitrofuranlar ve Sülfonamidler.....	15
Çizelge 3.10: Aminoglikozitler, Makrolidler.....	15
Çizelge 3.11: Çeşitli organ hastalıklarında tercih edilen antibiyotik çeşitleri.....	16
Çizelge 4.1: Dar spektrumlu penisilinler.....	19
Çizelge 4.2: Genişçe spektrumlu penisilinler.....	19
Çizelge 4.3: Geniş spektrumlu penisilinler (Antipsödomonal).....	20
Çizelge 4.4: Tetrasiklinlerin Gruplandırılması.....	23
Çizelge 4.5: Antibiyotiklerin bulunuş ve kullanım tarihleri.....	25
Çizelge 5.1: Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi karşılaştırılması.....	29
Çizelge 7.1: Tetrasiklin grubunun gradient programı.....	40
Çizelge 7.2: Tetrasiklin ve Oksitrasiklin'in alıkonma zamanları.....	40
Çizelge 7.3: Penisilin G'nin alıkonma zamanı.....	42
Çizelge 7.4: Antibiyotiklerin LOD ve LOQ değerleri.....	44
Çizelge 7.5: HPLC Yöntemiyle Tavuklarda Bulunan Antibiyotikler.....	44
Çizelge 7.6: Örnek C'ye ait pen G, oksitetrasiklin ve tetrasiklinin geri kazanım oranları	45

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4.1: Penisilin G' nin (benzilpenisilin) kimyasal yapısı	21
Şekil 4.2: Tetrasiklinin Kimyasal Yapısı.....	23
Şekil 4.3: Oksitetrasiklinin Kimyasal Yapısı.....	25
Şekil 5.1: Vakum manifoldu.....	29
Şekil 5.2: KFE yöntemi ile maddelerin ayrılma aşaması (Macherey 2004).....	30
Şekil 7.1: Oksitetrasiklinin Kalibrasyon Grafiği.	41
Şekil 7.2: Tetrasiklinin Kalibrasyon Grafiği.	41
Şekil 7.3: Penisilin G'nin Kalibrasyon Grafiği.	43
Şekil 8.1: 80 ppm oksitetrasiklin standart çözeltisine ait kromatogram.....	48
Şekil 8.2: 80 ppm tetrasiklin standart çözeltisine ait kromatogram.....	48
Şekil 8.3: Tavuk örneğine ait kromatogram.	49
Şekil 8.4: 20 ppm TC katkılı tavuk örneğine ait kromatogram	50
Şekil 8.5: 20 ppm OTC katkılı tavuk örneğine ait kromatogram	51
Şekil 8.6: 80 ppm Penisilin G standart çözeltisine ait kromatogram.....	52
Şekil 8.7: Penisilin G kalıntısı saptanan tavuk örneğine ait kromatogram.....	52
Şekil 8.8: 20 ppm Pen G katkılı tavuk örneğine ait kromatogram	53
Şekil A.1: Ekler bölümünde D örneğine ait kalıntı spektrumu.....	60
Şekil A.2: Ekler bölümünde G örneğine ait kromatogram.	60
Şekil A.3: Ekler bölümünde E örneğine ait kalıntı spektrumu.....	61
Şekil A.4: Ekler bölümünde B örneğine ait kromatogram.	61
Şekil A.5: Ekler bölümünde A örneğine ait kromatogram.	62
Şekil A.6: Ekler bölümünde I örneğine ait kromatogram.....	62

TAVUK ETİNDE ANTİBİYOTİK KALINTILARININ HPLC YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

ÖZET

Tavuk (*Gallus gallus domesticus*), sülüngüler (Phasianidae) familyasından evcilleştirilebilir bir kuş türüdür ve genelde çiftliklerde eti ve yumurtası için yetiştirilir. Tavuk üretimi, 2. Dünya savaşından sonra endüstrileşmiş olup, daha hızlı büyüyen ve daha fazla beyaz et verecek şekilde “kar” arttırıcı seçici üretim yöntemleri ile yapılmaktadır. Bu tesisler, tavukların dar alanlarda hareket edemeyecek sıklıkta yetiştirilmesi (minimum enerji harcayacak şekilde) prensibiyle kurulmuşlardır. Bu üretim yönteminde yemden maksimum verim elde etmek (bakterilerin yem tüketimini önlemek için) ve hastalıklara karşı direnç arttırmak ve tedavi etmek için yemlere antibiyotik katılması uygulamaları yer almaktadır.

Antibiyotik, bir mikroorganizma tarafından (bakteri, mantar, virüs, vb.) yapılan ve başka mikroorganizmaları öldüren veya üremelerine mani olan maddelerdir. Antibiyotikler ilk olarak 1928 yılında bulunmuş ancak rutin olarak kullanılmaya 1940’lı yıllarda, ikinci dünya savaşı döneminde başlanmış ve insan sağlığının düzeltilmesinde hayati bir öneme sahip olmuştur. Antibiyotikler, yaygın bir şekilde hayvanlara hem tedavi edici olarak hem de yardımcı olarak kullanılır. Antibiyotikler enfeksiyöz hastalıkların sağaltımında ve gıda değeri olan çiftlik hayvanlarının büyümelerini ve verimlerini teşvik edici olarak geniş çapta kullanılmaktadırlar. β -laktam, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, spektinomisin, linkozamid, sulfonamid, nitrofuran, nitroimidazol, trimetoprim, polimiksin, kinolon ve makrosiklik grubu ilaçlar belirtilen amaçlar için sahada en fazla kullanılan ilaçlardır. Ancak bu ilaçların sahada uygun olmayan şekillerde ve yasal olmayan kullanımları sonucu et, süt, yumurta, bal ve hayvanların yenilebilir diğer dokularında kalıntılar oluşmaktadır.

Son yıllarda yem katkı maddesi adı altında çok değişik ürünlerin kullanıldığı ülkemizde, yem katkı maddelerinin ithalatında ciddi kontroller yapılmamaktadır. Ülkemizde karma yem fabrikalarının ürettiği yemlerin denetimini etkin ve iyi bir şekilde yapıldığını söylemek imkânsızdır. Üretici tarafından beyan edilen ham besin maddeleri ve enerji düzeyi tutulamadığından üretici firmaya uygulanan yaptırımlar son derece yetersizdir.

Beta-laktam antibiyotikler yan etkilerinin azlığı ve bakterisid olmaları nedeniyle günümüzde en sık kullanılan antibiyotik grubudur. En önemli üyesi penisilindir. Penisilin ilk bulunan en önemli antibiyotiklerdendir. Etki spektrumu dar bir madde olan penisilin ana molekülü üzerinde yapılan çalışmalar sonucu ampicilin, amoksisilin, azlosilin, karbenisilin gibi spektrumu geniş ve çok sayıda yarı sentetik penisilin türevi bulunmuş ve sağaltımda kullanılmaya başlanılmıştır. Penisilin veterinerlikte kullanılan β -laktam antibiyotiklerindendir. Penisilin, günlük ortalama kilo artışında, beslenme etkinliğini artırmada, kronik solunum yolları ve nonspesifik enfeksiyöz enterit tedavisinde kullanılır. Kullanım dozu 2,4-100 g/ton’dur. Tavuk

dokularında penisilinin maksimum kalıntı limiti $50\mu\text{g}^{-1}$ 'dir. Tetrasiklin için MRL değeri kasta $100\mu\text{g kg}^{-1}$, ciğerde $300\mu\text{g kg}^{-1}$, yağda ve böbrekte $600\mu\text{g kg}^{-1}$ 'dir. Tetrasiklin grubu antibiyotikler, geniş spektrumlu olmaları ve toksik etkilerinin düşük olması dolayısıyla kanatlı yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ucuz olmaları ve yan etkilerinin az olması en önemli avantajlarıdır. Yan etki spektrumları nedeniyle gebelerde ve sekiz yaşın altındaki çocuklarda kullanımları uygun değildir. Kullanıma girişlerinden itibaren hayvan yemlerinde kullanılmaları direnç sorununu da birlikte getirmiştir.

Bu çalışmanın amacı, tetrasiklin, oksitetrasiklin ve penisilin G antibiyotiklerinin tavuklar üzerindeki etkisinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografiyle (HPLC) analiz etmek, uyguladığımız metodun doğruluğunu kanıtlamak ve kullanılan antibiyotik miktarlarını MRL değerleriyle karşılaştırmaktır. Çalışmada tetrasiklin, oksitetrasiklin ve penisilin G antibiyotiklerinin seçilmesinin nedeni; tetrasiklinin hayvanlarda aşırı kullanımının sakıncalı olması, penisilinin analizinin bu gibi örneklerde uzun ve zor olmasından dolayıdır. Bu nedenle penisilinle ilgili çok fazla çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Yapılan önceki çalışmalarda antibiyotik kalıntı analizlerinde kromatografik, spektrofotometrik, v.b. birçok yöntem kullanılmıştır.

Bu tez kapsamında hızlı, duyarlı ve sonuçlarının doğruluğu nedeniyle HPLC yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak her bir antibiyotik bileşiğinin stok çözeltileri hazırlanmıştır. HPLC ile yapılan analizlerde örnek hazırlama önemli bir aşamadır. Örnekler katı faz ekstraksiyonu, rotary, mikrofiltrasyon işlemleri kullanılarak analize hazır hale getirilmiştir. Katı faz ekstraksiyonu, günümüzde etkili bir örnek hazırlama yöntemi olarak birçok laboratuvarında kullanılmaktadır. Katı faz ekstraksiyon metodu, klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon ile karşılaştırıldığında daha hızlı, az çözücüye ihtiyaç duyan, emülsiyon oluşumun şekillenmediği, çok daha ucuz bir tekniktir. Bunun yanında katı faz ekstraksiyonu ile daha temiz ekstrakt ve yüksek geri kazanım (recovery) oranları elde edilebilmektedir.

Çalışmada antibiyotik kalıntılarının belirlenebilmesi için çeşitli tampon ve mobil faz bileşimleri değiştirilerek kromatogramlar alındı ve hangi tamponun ve mobil fazın uygun olduğuna karar verildi. Penisilin ve tetrasiklin antibiyotik kalıntısında farklı tampon ve mobil faz kullanıldı. Literatürde yapılan çalışmalarda tetrasiklin antibiyotiklerinin penisilin grubu antibiyotiklerin kromatogramda görünmesine engel olduğu rapor edilmiştir. Denemelerimizde belirlediğimiz bu durumdan dolayı her iki antibiyotik grubuna farklı yöntem uygulandı. İlk olarak antibiyotiklerin belirli derişimlerde çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon grafikleri çizildi. Daha sonra tavuk örneklerine belirlediğimiz yöntemler uygulandı. Aynı tavuk örneklerine antibiyotik standartlarından spike yapılarak analizler tekrarlandı. Bu şekilde tavuklardaki kalıntı miktarı saptandı.

Çoğu ülkede antibiyotiklerin büyütme faktörü olarak kullanımı yasaklanmıştır. Üretici firmalar kısa sürede hızlı üretim için yemlerde/sularda yüksek miktarlarda antibiyotikler kullanarak insan hayatını ve çevreyi tehlikeye atmaktadır. Bunun sonucunda hastalıkların çoğalmasına, hastalıklarla mücadele edilememesine neden olmaktadır. Yapılan bu tez kapsamında bazı tavuk örneklerinde bulunan kalıntı miktarı maksimum kalıntı limitlerinin (MRL) üzerinde çıkmıştır.

Bu tez çalışmasının sonuçları, ülkemizde hangi antibiyotik türlerinin ve izinli miktarlarının üzerinde kullanıldığına dikkat çekerek üretici firmaların yüksek kuruluşlar tarafından daha sıkı kontrolünün gerektiğini ortaya koymuştur. Ayrıca tüketicilerin hayvansal gıdalar konusunda daha bilinçli ve seçici olmaları gerektiğini ortaya koymuştur. Çünkü hayvanlarda antibiyotik kullanımı ile ilgili ana sorun, bunları besin olarak tüketen canlılarda antibiyotik direncinin artması tehlikesidir. Gıdalardaki veteriner ilaç kalıntılarına bağlı olarak, bakteriler arasında çoklu direnç özelliğinin gelişmesi ve bu direncin patojen bakterilere aktarılması sonucu, insanlarda çoğu kez antibiyotik tedavisine cevap alınamamaktadır. Bu durum, daha fazla antibiyotik kullanımına yol açarak, hem toplum sağlığını hem de ülke ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir.

DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESIDUES IN CHICKEN MEAT BY HPLC METHOD

SUMMARY

The chicken (*Gallus gallus domesticus*) is a kind of bird family which can reclaim from Phasianidae. In general, it is raised for meat and eggs in farms. Chicken production is industrialised after World War II. It is done as a increasing “profit” with selective breeding methods for giving faster growing and more white meat. These facilities were established for the growth of chickens (way to spend minimum energy) without moving in tight area. This manufacturing process is preconditioned the application which is added antibiotic in feed in order to achieve maximum efficiency from feed (in order to prevent feed consumption of bacteria) and for treating disease and increasing resistance against diseases. Animals are treated routinely with antibiotics to prevent, treat, or control disease. Even under the best conditions of agricultural management, crowding and stress can lead to disease. While historically there have also been nontherapeutic uses of antibiotics, typically as production tools to improve endpoints such as feed efficiency and weight gain. Antibiotic is a substance that occurs by a microorganism and also destroys or prevent the growth of the other microorganism. First antibiotics are discovered in 1928, but start to use them in 1940s routinely during the second world war. They have been an important role interms or medical treatment of human health. Antibiotics are commonly administered to food animals both therapeutically and subtherapeutically. Several classes of antibiotics are used in livestock veterinary medicine. Antibiotics have been widely used for treating infectious diseases and for promoting food-producing animals growth and yields too. β -lactam, tetracyclines, chloramphenicol, the macrolides, spectinomycin, lincosamides, sulfonamide, nitrofurans, nitroimidazole, trimethoprim, polymyxine, quinolones and macrocyclics groups are the most commonly used drugs for these purposes. However, their improper and illegal use may produce residues in meat, milk, eggs, honey and the other edible tissues of animals. Up to now about 40 000 antibiotics have been found and about 80 of them are in therapeutic use. They are isolated primarily from metabolic products of living cells. Beta-lactam antibiotics are the most widely used group of antibiotics due to low side effect and being bactericidal. Penicillin is the most important member. Penicillin is one example of a β -lactam antibiotic historically used in veterinary medicine. Penicillin used for the avarage daily weight gain, increases the effectiveness of nutrition, treating chronic respiratory and nonspecific infectious enteritis. Dose of usage is 2,4-100 g / ton. Penicillin was the first microbial metabolite to distinguish between toxicity to the bacterial cell and toxicity to the mammalian host to permit its use in the systemic treatment of infections caused by gram-positive and -negative organisms in humans and animals. Despite their generally non-toxic nature, β -lactams appear to be responsible for most of the reported human allergic reactions to antimicrobials. The maximum residue limit

(MRL) for benzylpenicillin (penicillin G) is 50 mg kg^{-1} in chicken tissue. Tetracycline antibiotics produced by from gram-positive to negative bacterias. Tetracycline group of antibiotics are used widely in poultry breeding due to the fact that they are broad-spectrum and low toxic effects. They are antibiotics with a broad antibacterial spectrum and bacteriostatic activity, and have a good activity against acute disease caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria, including the species *Spirochete*, *Actinomyces*, *Rickettsia* and *Mycoplasma*. These characteristics, together with the low cost and the paucity of major side effects (except in children and pregnant women) have made the tetracyclines a widely used class of antibiotics. Moreover, the discovery that tetracyclines can be used as growth promoters has resulted in their use in animal feeds. Because of this, tetracycline-resistant pathogens has limited their usefulness in clinical practice. The use of tetracyclines is increasing, as they are used not only in treatment but also prevention of illnesses. Besides TCs are given to animals destined for human consumption to promote growth and may potentially result in the presence of residues in edible animal tissues, which can be toxic and hazardous for human health and potentially cause allergic reactions. The determination of residual TCs in animal products is consecutively very important. The maximum residue limit for tetracycline is $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ in muscle, $300 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ in liver, $600 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ in fat and kidney.

The aim of this project is to analyse the effect of tetracycline, oxytetracycline and penicillin G antibiotics on chicken by HPLC method, to prove the accuracy of method and compare the used antibiotic amounts with MRL values. In this study the reasons of selection penicillin G and tetracycline, oxytetracycline are their common objectionable usage in animals and In such a study, analysis of penicilline is difficult and time is very important. Many methods have been used to determine the antibiotic residue. For example, High performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography (LC), thin layer chromatography, spectrophotometer, quadruple plate test, agar diffusion method, the disk diffusion method. HPLC will be used because of accuracy of analysis results in previous studies and analysis speed of equipment. The moment that the equipment being used is chosen, the antibiotic amount which give to chicken will determine. First of all, stock standard solution of each antibiotic compound will be prepared. When samples with these solution is passed from some steps (e.g extraction, rotary), they will be ready to give in HPLC. Sample preparation is a considerable step before modern instrumental analysis (High Performance Liquid Chromatography, Gas Chromatography etc). Today, solid phase extraction is a powerful method for sample preparation and is used by most laboratories. Compared to classical liquid-liquid extraction, SPE is faster, uses less solvent, eliminates emulsions, and saves money. In addition, solid phase extraction provides clean extracts and high recoveries. In study, various buffers and mobile phases were tried for determining antibiotic residues and which buffer and mobile phase were judged to be appropriate. Different buffer and mobile phase were used for determining tetracycline and penicillin residues. Because it was proved that tetracycline antibiotic prevent the penicillin antibiotic to appear the chromatogram. Because of that the different method was applied for these antibiotics. Although tetracyclines form complexes with metal ions which adsorb on the silanol groups in the reversed-phase causing peaks tailing, symmetrical non-tailed peaks could be obtained when introducing 0.03 M oxalic acid into the mobile phase. As a extraction, solid phase extraction may be the chosen technique for the clean up of TCs extracted from biological matrixes. Nevertheless, the elution of TCs from reversed-phase sorbent is difficult since these compounds are amphoteric drugs and they contain

more than one nitrogen atom. To overcome this difficulty, large elution volume, i.e. 10 ml of 0.01 M methanolic oxalic acid, was used for complete eluting TCs. The use of antibiotics to bring about improved performance in growth and feed efficiency, to synchronize or control of reproductive cycle and breeding performance also often lead to harmful residual effects. Concern over antibiotic residues in food of animal origin occurs in two times; one which produces potential threat to direct toxicity in human, second is whether the low levels of antibiotic exposure would result in alteration of microflora, cause disease and the possible development of resistant strains which cause failure of antibiotic therapy in clinical situations. A withdrawal period is established to safeguard human from exposure of antibiotic added food. Antibiotics are prohibited to use as a growth factor due to the fact that in studies, amounts of residue are high in most countries. Most of the manufacturing companies endanger the creature life by using high antibiotic at food in a short time. As a result, this event is caused the proliferation of diseases, not to fight with diseases. tetracycline and penicillin antibiotics which are two of the most commonly used varieties in chicken can be compare in residues of chicken body. Thus we can learn both which one is more used in industry and relevant institutions will be controlled to producing company. In addition to this, Human will be conscious during consuming the animal product. Because one of the main issues associated with the use of antibiotics in food animals is the concern of developing antibiotic resistance. Human may be exposed to these resistant bacterial populations during the preparation or consumption of food. In humans often can not be taken respond to antibiotic treatment due to use antibiotic very much in animal. Investigations on the development of antibiotic resistance have reported that enteric pathogen bacteria commonly emerged from poultry meat have a crossresistance to the antibiotics used in human medicine because of prophylactic and growth promoter usage of antibiotics in low concentrations for a long time in poultry production. Whenever antibiotics are used in animal feed, consumers could be exposed to their residues via food chain. It is considered within food safety, some risks can appear for human health. The systematic intake of antibiotics by human beings results in various allergic reactions, metabolic diseases, and dysbiosis; it inhibits the activity of some enzymes, adversely affects gut organisms, contributes to the appearance of resistant microorganisms, etc. The presence of antibiotics in food raw materials can change the course of a process and, finally, impair the quality of finished products (for example, in the manufacture of fermented milk and meat products). In many cases the long-term effects of antibiotics on human health are not known, but they can, for example, provoke strong allergic reactions in sensitive people. An allergic reaction may be triggered by antimicrobial residues in a previously sensitized individual.

1. GİRİŞ

Son senelerde tavuk eti, sağlıklı, besleyici ve ucuz olmasından dolayı en çok tüketilen gıda ürünleri arasına girmeyi başarmıştır. Özellikle fiyat açısından uygun olması, diğer et ürünlerine oranla protein, temel aminoasitler gibi maddeler bakımından zengin oluşu, ayrıca kolay sindirilir, düşük kalorili ve yağ oranının az oluşundan dolayı hasta diyetlerinde de kullanılması tavuk eti ürünlerinin, tüketimi en fazla gıda grubu içerisinde yer almasına neden olmaktadır (İnal, 1992). Antibiyotikler, geliştirilmelerinden kısa bir süre sonra, tedavi amacıyla ilk olarak süt sığırlarında kullanılmaya başlanmıştır. Penisilinler 1940'dan itibaren tedavi amaçlı olarak kullanılırken, büyümeyi arttırıcı özelliklerinin 1950 yılında keşfedilmesiyle bu alanda da kullanılmaya başlanılmıştır (Mitchel ve ark. 1998; Güley ve Akbulut 2000). Kaya ve ark. (1992)'a göre gelişmenin hızlandırılması amacıyla yem katkı maddesi halinde antibiyotiklerin yaygın bir şekilde kullanılması duyarlı bakterilerin dirençli tedavilerin ortaya çıkması gibi problemler yaratmıştır ki, bundan dolayı bu tür antibiyotikler kullanım ömrünü tamamlamak zorunda kalmıştır. Dünya nüfusunun artmasıyla birlikte yeterli miktarda besin üretebilmek için tarımsal teknikler geliştirilmiştir ve önemli adımlar atılmıştır. Ama üretim ihtiyacını karşılamadığı için, farklı yollara başvurulmuştur. Antibiyotik kullanımının normal miktarından fazlaştırmak, hayvanlarda kilo artışı sağlayıp kesim işlemine başlamışlar ve bu yolda hem hayvanlar hem de hayvanları tüketen insanlar ciddi problemlere neden olmaktadır. Çünkü tedavi amacıyla verilen antibiyotiklerin dozunu arttırıp, hayvanlar daha alınan antibiyotiği vücut dışına atmadan kesilmektedirler. Ungemach (2000)'a göre yapılan araştırmalarda; 5 460 000 kg antibiyotik insan tedavilerinde, 3 465 000 kg hayvan hastalıklarında tedavi için, 1 575 000 kg ise hayvanlarda büyümeyi arttırmak için kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin aşırı ve uygun olmayan kullanımları ile bu maddelere karşı dirençli bakterilerin gelişmesi sonucu, Avrupa Birliği tarafından antibiyotik kökenli büyütme faktörlerinin tavuk gibi kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde kullanılmasının 1998-1999 yıllarında büyük oranda yasaklandığı bildirilmiştir (Casewell ve ark., 2003). Kalıntı yönünden antibiyotiklerin diğer

farmakolojik etkili maddelere göre daha önemli olduğu belirtilmektedir. Bunun nedenleri, hayvanlara öngörülen dozlardan fazla ilaç verilmesi ve özellikle de ilaç uygulanan hayvanların ilacın yasal bekletme süresine uyulmadan kesime sevk edilmesi olarak ifade edilmektedir. Bunun sonucunda, antibiyotiklerin tamamen metabolize olmaması veya vücuttan tamamen atılmamasına bağı olarak, hayvanların doku ve organları ile bunlardan elde edilen hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntısı bulunabilmektedir. Bu kalıntıların hayvansal gıdaları tüketen insanlara geçmesi ve hastalıklara sebep olması da kaçınılmazdır. Bunun için, ilaç verilen hayvanlarda ilacın vücuttan arınma süresine uyularak kesimin yapılması sağlanmalı ve beraberinde bilimsel bir kalıntı izleme planının geliştirilerek, etkili bir biçimde uygulanması için devletin sıkı kontrol önlemleri alması gerekmektedir.

2 . GENEL BİLGİLER

2.1 Antibiyotik

Antibiyotikler, bakteri ve mantar gibi canlı mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen veya sentezle hazırlanan, düşük yoğunlukta bile bakterilerin gelişmesini etkileyen ya da onları öldüren maddelerdir. “Antibiyotik” kelimesi Yunanca ‘karşı’ anlamına gelen ‘anti’ ve ‘yaşam’ anlamına gelen ‘bios’ kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur. İlk bulunan antibiyotik ise penisilindir (Akkan ve ark. 2003).

2.1.1 Antibiyotiklerin tavuklarda kullanılması

Dünya nüfusunun artmasıyla birlikte insanların tüketebileceği hem uygun fiyata hem de besin değeri açısından zengin yiyeceklere ihtiyaç duymaktadır ve üreticilerin bunu karşılamak için birçok yola başvurmuştur. Antibiyotiğin hayvanlara verilme nedenleri, hayvanların beslenmesi, hastalıkların tedavisi ve hayvanlarda kilo artışı sağlamak içindir. Genelde, antibiyotiklerin fazla dozda verilmesi, hayvanlarda büyütme faktörü olarak kullanılmak istenmesinden dolayıdır. Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde gelişmeyi hızlandırıcı yem katkı maddeleri arasında antibiyotiklerin önemli bir rolü vardır. Gustafson RH ve ark (1997)’a göre ilk olarak antibiyotiklerin anabolik etkiye sahip oldukları 1940’lı yıllarda ABD’de civciv rasyonlarına belli miktarda katıldığında canlı ağırlık artışında hızlanma sağlanması şeklinde belirtilmiştir. Büyütme faktörü olarak kullanılan antibiyotik ve benzeri maddelerin etkileri birkaç görüş ile ifade edilmiştir. Bu görüşlere göre;

- 1) Besinlerin emilimini engelleyen zehirli metabolitlerin üretimini engelleyerek
- 2) Gastrointestinal sistemdeki patojen mikroorganizmaların gelişimini önleyerek,
- 3) Subklinik infeksiyonları azaltarak veya önleyerek etkili oldukları düşünülmektedir (Butaye ve ark. , 2003).

Antibiyotikler, 1950’lerden sonra tedavi yanında hayvanlarda büyümeyi teşvik edici amacıyla kullanılması yaygınlaştırılmıştır. Tedavi amacıyla verilmesi gereken

dozdan fazla verilmesi durumunda, bakterilerde bu antibiyotiklere karşı direnç gösterecektir ve tedavi imkânı daha da zorlaşacaktır. Böylece hem tavukların hemde tavukları tüketen insanlarda tedavi süreci imkânsız hale gelmeye başlanacaktır. Antibiyotiklerin büyütme faktörü olarak kullanımı ile ilgili yapılan ilk kontrol adımı 1969 da, İsveç Komitesi tarafından yapılmıştır. Bu komite reçetesiz antibiyotiklerin büyütme faktörü olarak kullanımını yasaklamıştır. Avrupa Birliği, 1970’lerin başlarında hayvansal yemlerde, tedavi için kullanılan çeşitli ana antibiyotiklerin ruhsatlarını geçici olarak yürürlükten kaldırmaya başlamıştır (Tuncer, 2007). Avrupa Birliği’ne aday bir ülke olarak Türkiye’de Avrupa Birliği’nin antibiyotiklerin büyütme faktörü olarak kullanımı konusundaki yasaklama kararlarını uygulamış ve 1997 yılından itibaren bu ajanların kullanımını yasaklamıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1997 yılında “The Medical Impact of the Use of Antimicrobials in Food Animals” adı altında Berlin’de bir toplantı düzenlemiş ve bu konuda uluslararası bir fikir ve uygulama birlikteliği sağlamak için ilk adımı atmıştır. Buna ek olarak 2000 yılında Cenevre’de düzenlenen toplantı sonrasında “The World Health Organization Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food” dokümanında bu konuda uygulanmasını önerdikleri kurallar yayınlanmıştır. Bu kurallardan bir tanesi, gıda amaçlı üretilen hayvanlarda kullanılacak antimikrobiyaller için ulusal kullanım düzeyleri belirlenmelidir. Veteriner hekimler için antibiyotik kullanımı protokolleri oluşturulmalı ve tüm antimikrobiyallerin kullanımında veteriner hekim tarafından reçetelendirme mecburi kılınmalıdır kuralıdır (WHO consultation, 2000). Antibiyotiklerin hangi ülkede kaç yılında yasaklandığını Çizelge 2.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1: Yıllara Göre Antibiyotik Büyütme Faktörlerinin Yasaklanması

YIL	ÜLKE	KARAR
1969	İsveç	Antibiyotik büyütme faktörleri bilimsel olarak yasaklandı.
1970	Avrupa Birliği	Antibiyotik büyütme faktörlerinde geçici sınırlandırmalar başladı
1971	Avrupa Birliği	Tetrasiklin yasaklandı.
1971	İsveç	Tetrasiklin ve Antibiyotik büyütme faktörlerinin bir kısmı yasaklandı.
1986	İsveç	Antibiyotik büyütme faktörlerinin tümü yasaklandı.
1997	Avrupa Birliği	Avoparcin yasaklandı.
1998	Hollanda	Olaquinox yasaklandı.
1998	Danimarka	Virginamycin ve Antibiyotik büyütme faktörlerinin tümünü yasakladı.
1998	İsviçre	Antibiyotik büyütme faktörlerinin tümü yasaklandı.
1998	Avrupa Birliği	Tylosin phosphate, zinc bacitracin, spiramycin, virginiamycin yasaklandı.
1999	İngiltere	Tylosin phosphate, zinc bacitracin, spiramycin, virginiamycin yasaklandı.
01/01 2006	Avrupa Birliği	Antibiyotik büyütme faktörlerinin tümü yasaklandı.
21/01 2006	Türkiye	Antibiyotik büyütme faktörlerinin tümü yasaklandı.

(Tuncer, 2007)

2.1.2 Antibiyotiklerin etki mekanizması

Bütün bakterilerde yavaş gelişme, hızlı gelişme ve dinlenme dönemlerinden oluşan üç çoğalma devresi vardır. Antibiyotikler bakterilerin hızlı ve yavaş gelişme dönemlerinde etki gösterirler. Bu etkileşim ya bakterilerin öldürülmesi (bakterisid etki) veya bakterilerin gelişimi ve üremesinin durdurulması (bakteriostatik etki) şeklinde olur. Örneğin penisilinler, aminoglikozidler, sefalosporinler, vankomisin, florokinolonlar ve basitrasin bakterisid etkiye, tetrasiklinler, makrolidler ve sülfonamidler bakteriostatik etkiye sahiptirler (Başoğlu, A. 2000).

Antibiyotikler;

1. Hücre duvarı sentezini engelleyerek
2. Sitoplazmik zarın geçirgenliğini değiştirerek
3. Nükleik asit sentezini önleyerek
4. Ara metabolizmayı bozarak
5. Protein sentezini engelleyerek bakteri hücresi üzerinde etkilerini gösterirler (Dökmeci ve ark. 1992).

Antibiyotiklerin 1950'lerin başında hayvan yemlerinde kullanılmaya başlanmasından sonra, yetiştiricilikte yeni bir dönem başlamıştır. Ancak, profilaktik veya gelişmeyi hızlandırıcı olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğu, insan ve hayvanlarda patojen bakteri türleri (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.) arasında ortaya çıkan dirençli suşların hızla artması nedeniyle kullanım ömrünü tamamlamak zorunda kalmışlardır (Doyle, 2006).

Büyütme faktörü olarak antibiyotiğin kullanımı;

Gelişmenin hızlandırılması, yemden yararlanmanın artırılması ve sağaltıcı amaçla kullanılırlar. Bu türden maddelerin etki şekilleri tam bilinmemekte;

- Gizli seyreden enfeksiyonların etkenlerini etkilerler,
- Gelişme hızın azaltan bakterileri engelleyerek,
- Besin maddesi sentezleyen bakterilerin gelişimini
- Vitamin ve büyütme faktörlerinin sentezini uyararak,
- Bağırsakların emme yeteneğini artırarak (Butaye, 2003).

Etkileri: Bakteri/mikropla bulaşık ortamlarda daha etkilidirler. Kanatlılarda gelişme hızı/yemi değerlendirme %5-25 artar. Yem tüketimi %6 azalır. Etki yaşa göre değişir. Sindirim kanalı bakteriyel florası ile ilgilidir.

Kullanım sakıncaları:

○ **Dirençlilik durumu**

- Hastalıklara karşı tedavi şansı / başarısı azalır
- Sağaltıcı kullanılanlar gelişme hızlandırıcı olarak kullanılmamalı
- Uzun etkili müstahzarlar kullanılmamalı.

○ **Kalıntı durumu**

Besin değeri olan hayvanlarda 2 neden öne sürülmektedir;

- Kesim öncesi bekletme süresine, kullanım aralığına uyulmalı, ilaçlı yemin karıştırma/yedirme hataları
- Kalıntı ile karsinogenik etki

○ **Bağışıklık sistemi**

- Bazıları çok küçük miktarları ile alerjik tepkimeler
- Kloramfenikol ölüme neden olabilecek kemik iliği
- Penisilinle aplastik anemi sıklığı 1/65 000 (Kaya ve ark. 2000).

2.1.3 Antibiyotiklerin olumsuz etkileri

Mikroorganizmalarda, özellikle patojen olanlarında direnç oluşturabilir, insanlarda antibiyotik alerjisi oluşturabilmektedir. Ayrıca hayvansal gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntıları çeşitli patojen mikroorganizmaları baskı altında tuttuğu için, bu tür gıdaların bakteriyolojik laboratuvar analizlerinde yanlış değerlendirmelere neden olabilmektedir. Dolayısıyla Salmonella gibi patojen etkenler ette mevcut oldukları halde tespit edilememeleri Veteriner Halk Sağlığı açısından oldukça büyük tehlike yaratır (Demir, 2010).

2.1.4 Antibiyotik kalıntılarının insan sağlığı üzerine etkileri

Antibiyotiklerin yetiştiricilikte kullanılması, başta hayvanlardan elde edilen gıdalar olmak üzere, insan sağlığı açısından da ciddi tehlikeleri ortaya çıkarabilmektedir. Hayvansal kaynaklı gıdalar, insan patojeni olan pek çok mikroorganizmanın

gelişebilmesi için uygun bir besi ortamı oluşturmaktadır. Et ürünlerinde bulunan patojen bakteriler birçok yolla insanlara geçebilmekte ve hastalık etkeni olabilmektedir. Alınan ilaçlar başta böbrek ve karaciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularda birikmektedirler. Bu şekilde ilaç kalıntısı içeren gıdaları tüketen insanlarda, alerjik reaksiyonlar, toksik belirtiler, üreme bozuklukları, bağırsak florasında değişiklikler ile dirençli bakterilerin gelişimi gözlenebilmektedir (Doyle, 2006). Antibiyotiklere dirençlilik plazmidler, transpozonlar ve integronlar aracılığıyla konak hücre bölünmesi sırasında vertikal olarak geçtiği gibi, karışık bakteriyel popülasyonlardaki aynı veya farklı tür ve soylardaki patojen veya apatojen bakteriler arasında transdüksiyon, konjugasyon veya transformasyon aracılığı ile horizontal olarak da geçebilmektedir. Gıdalarda tolerans düzeyinin üzerinde insan sağlığı açısından tehlikeli olup, böyle gıdaların tüketilmemesi gerekmektedir (Rose ve ark. ,1999). Gıdalarda ilaç kalıntılarına ilişkin mevzuatta tolerans düzeyleri çiğ dokulardaki düzeyleri göstermektedir. Bununla birlikte et, süt ve yumurta gibi hayvansal gıdalar genellikle değişik pişirme işlemleri uygulandıktan sonra tüketilmektedir. Çeşitli araştırmacılar tarafından, başta antibiyotikler olmak üzere, çeşitli ilaç kalıntılarının değişik pişirme işlemleri ve depolama sırasında yıkımlanarak etkisiz metabolitlerine dönüşebildiği bildirilmiştir (Fischer ve ark. 1992)

2.2 Hayvanlarda Antibiyotik Kalıntısının Nedenleri

Tavuk gibi hayvansal ürünlerde antibiyotik kalıntılarına rastlanmasının birçok nedeni vardır. Bunlar;

- Verilmesi gerekenden fazla ilaç kullanımı
- İlaç verildikten kısa süre sonra hayvanların kesilerek satışa sunulması
- İlaçların yemlere katılarak, az yemden fazla verim elde etmek istemeleri
- İlaçların hatalı kullanımı (Kaya, 2002).

2.3 Türkiyede Veteriner İlaç Kontrolü

Tüketim için sunulan hayvansal gıdaların, yasaklanmış ilaçlarının kullanımını durdurmak için hayvanlara verilen ilaçlarda ki kalıntı düzeylerinin MRL'nin altında olduğunu kesinleştirmek için çeşitli yöntemlerle belirleyebilirler. Türkiye'de son

zamanlarda veteriner ilaç kalıntı konusunda AB ile uyumlu çalışılmış ve bu konuda büyük adımlar atılmıştır. Ancak şu ana kadar yapılmak istenen fikirler, hedeflerine tam olarak ulaşamamıştır.

2.3.1 Mevzuat

Besinlerde antibiyotik kalıntılarının kötü etkileri farkedildikten sonra ABD, İngiltere ve Batı Avrupa ülkeleri ile Dünya Sağlık Örgütü (W.H.O), Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) sorun ile ayrıntılı bir şekilde ilgilenmişlerdir. İlk kez Swann başkanlığında kurulan bir komisyon, 1969 da tamamlanan çalışma raporuyla hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotik ilaçların yarattığı çok yönlü sağlık risklerini ortaya koymuşlardır (Önal ve ark. 1993). Hayvansal üretimde kullanılan ilaçları kontrol etmek için önemli çalışmalar yapan çok fazla uluslararası organizasyon bulunmaktadır. Söz konusu olan bu mekanizmalar, ilacın dağıtımının kontrolünü, kullanımını, güvenli kalıntı miktarı seviyelerinin belirlenmesi ve kullanılan kalıntı belirleme tekniklerini kapsamaktadır (Mitchel ve ark. 1998). Kalıntı izleme programlarında kalıntısı aranacak maddelerin listesi veya grubu ile kalıntı aranacak gıda maddeleri AB'nin 96/23/EC direktifinde ifade edilmiştir. Bu yöndeki uygulamalar Türkiye'de "Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik" (17.12.2011 tarih ve 28185 sayılı RG) ile düzenlenmiştir (Yarsan 2012). Bu kalıntı risklerinden korunmak için ülkelerin birçoğunda, Avrupa Birliği'nce belirlenen MRL(maksimum kalıntı limiti) değerlerine uymak zorundadır.

2.3.2 MRL (Maksimum kalıntı limiti)

Maksimum kalıntı, veteriner ilacı veya veteriner ilaçlarına ait metabolitlerin bir gıda maddesinde bulunmasına izin verilen (en yüksek) miktarıdır. Bu limitin aşılmamasına dikkat edilmelidir. Çünkü bu limitin aşılmasıyla insan sağlığına büyük risk teşkil etmektedir. Bu yüzden, hayvansal gıdalarda bu limitin aşılmaması çok önemlidir. Maksimum kalıntı limitinin belirlenmesinde ADI'da (kabul edilebilir günlük miktar) önemlidir. Hayvansal gıdalarda günlük verilmesi gereken miktar arttıkça kalıntı riski de artacaktır. Bu nedenle verilen antibiyotik miktarları, maksimum kalıntı limitleri aralığından olması çok fazla önem kazanmaktadır. Antibiyotiklerin antibakteriyel etki spektrumuna göre gruplandırılması Çizelge 2.2'de yapılmıştır.

Çizelge 2.2 : Antibakteriyellerin etki spektrumu

Gram pozitif	Gram negatif	Genis etki spektrumlu	Mycoplasmalara etkili
Penisilin	Polimiksin B	Ampisilin	Eritromisin
Eritromisin	Kolistin	Streptomisin	Tiamulin
Basitrasin	Flumekuin	Kloramfenikol	Baytril
Linkomisin	Baytril	Tetrasiklinler	Tylosin
Tylosin		Spektinomisin	Linkomisin
		Sulfonamidler	Tetrasiklinler
		Nitrofuranlar	

(Şanlı 1981)

3 . ANTİBİYOTİKLERİN SINIFLANDIRILMALARI

Antibiyotik ve kemoterapötikleri çeşitli ölçütlere göre sınıflandırmak mümkündür. Ancak bugün en fazla kullanılan sınıflandırma, bu ilaçların etki mekanizmalarına ve etki güçlerine göre yapılanlarıdır.

3.1 Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılmaları

Antibiyotikler; canlıların vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki gruba ayrılır ve Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’ de gösterilmiştir.

3.1.1 Bakteriyostatikler

Bunlar bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önlerler. Gelişmesi ve üremesi duran bakteriler, vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilirler. Bakteriyostatik etki gücünün göstergesi “Minimum İnhibitör Konsantrasyon = MİK” dur.

Çizelge 3.1: Bakteriyostatik etkili antibiyotikler

BAKTERİYOSTATİKLER	
	Tetrasiklinler
	Makrolitler
	Sülfonamidler
	Amfenikoller
	Linkozamidler
	Metronidazol
	Mikonazol

3.1.2 Bakterisidler

Bunlar bakteri hücrelerini dolaysız olarak yok ederler. Bakterisid etki gücünün göstergesi “Minimum Bakterisid Konsantrasyon =MBK”dur.

Çizelge 3.2: Bakterisid Etkili Antibiyotikler

BAKTERİSİDLER
Poliipeptidler
Florokinolonlar
Vankomisin
Rifamisin
Beta-Laktamlar
Penisilin, Sefalosporin, Monobaktam, Karbapenem
Beta-laktamaz inhibitörler (Sulbaktam, Tazobaktam)
Teikoplanin

(Akalin, 1994)

3.2 Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları

Çizelge 3.3- 3.7’ de antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaları yapılmıştır.

Çizelge 3.3: Bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive edenler

ANTİBİYOTİKLER
Beta-Laktamlar
[Penisilinler, Sefalosporinler, Monobaktamlar (Aztreonam), Karbapenemler (İmipenem, Meropenem)]
Ristosetin
Sikloserin
Basitrasin
Teikoplani
Vankomisin

Çizelge 3.4: Sitoplazma membran permeabilitesini bozanlar
(Deterjan etkisi yapanlar)

ANTİBİYOTİKLER	
Polimiksinler	
Gramisidin	
Nistatin	
Amfoterisin B	
Kandisein	
Ketokonazol ve diğer antifungal imidazoller	
Flukonazol ve diğer antifungal trizoller	
Hekzaklorofen	
Katyonik deterjanlar	

Çizelge 3.5: Ribozomlarda protein sentezini bozanlar

ANTİBİYOTİKLER	
Tetrasiklinler	Aminoglikozidler
Makrolitler	Amfenikoller
Linkozamidler	Füsidik asid

Çizelge 3.6: Bakteri genetik materyali üzerine etki yapanlar

(=DNA ve RNA sentezini bozanlar)

ANTİBİYOTİKLER	
Florokinolonlar	Rifamisinler
Nalidiksik asid	Metronidazol
Aktinomisinler	Mitomisinler
Bleomisin	Asiklovir
Doksorubisin	Metotreksat
Daunorubisin	

Çizelge 3.7: Bakteriyel antimetabolitler

ANTİBİYOTİKLER	
Sülfonamidler	Sülfonlar
PAS	İzoniazid (INH)
Etambutol	Trimetoprim
Temosilin	

Çizelge 3.8: B-laktam antibiyotiklerinin sınıflandırılması

β-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER	
PENİSİLİNLER	SEFALOSPORİNLER
Penisin G	Sefradin
Penisilin V	Sefaleksim
Fenetisilin	Sefaloglisin
Azidosilin	Sefadroksil
Ampisilin	Sefaklor
Amoksisilin	Sefatrizin
Hetasilin	Sefalotin
Pivampisilin	Sefalazin
Bakampisilin	Sefapirin
Talampisilin	Sefasetril
Episilin	Sefamandol
Siklasilin	Sefoksitin
Mezlosilin	Sefuroksim
Azlosilin	Sefaloridin
Piperasilin	Sefotetan
Karbenisilin	Sefotaksim
Tikarsilin	Sefoperazon
Oksasilin	Seftazidim
Kloksasilin	Seftriakson
Dikloksasilin	Seftizoksim
Nafsilin	Sefaksazol
Metisilin	Sefaksazol

Çizelge 3.9: Tetrasiklin, Nitrofuranlar ve Sülfonamidler

TETRASİKLİNLER	NİTROFURANLAR	SÜLFONAMİDLER
Oksitetrasiklinler	Nitrofurazon	Sülfatiazol
Klortetrasiklinler	Furazolidon	Sülfadiazin
Tetrasiklinler	Nitrofurantoin	Sülfadimidin
	Furaltadon	Sülfomerazin
	Nifuraldazon	Sülfobromometazin
		Süfometaksazol
		Sülfasitin
		Sülfakloropridazin
		Sülfakloropirazin
		Sülfadimetoksin
		Sülfametoksidiiazin
		Sülfafenazol
		Sülfasomizol

Çizelge 3.10 : Aminoglikozitler, Makrolidler

AMİNOGLİKOZİTLER	MAKROLİDLER
Streptomisin	Eritromisin
Dihidrostreptomisin	Oleandomisin
Neomisin	Spiramisin
Kanamisin	Tilozin
Gentamisin	Josamisin
Tobramisin	Tilmikosin
Amikasin	Karbomisin
Paromomisin	
Lividomisin	
Spektinomisin	
Apramisin	
Netimisin	
Sisomisin	
Viyomisin	
Framisetin	

Çizelge 3.8’de Beta laktam antibiyotikler, Çizelge 3.9’da Tetrasiklin, Nitrofuranlar ve Sülfonamidler, Çizelge 3.10’ da ise Aminoglikozitler, Makrolidlerin sınıflandırılması yapılmıştır. Çeşitli hastalıkların tedavisi için tercih edilen antibiyotikler ve bu antibiyotiklerin etkilediği doku ve organların bilinmesi çok önemlidir. Herhangi bir antibiyotik grubunun birden fazla doku-organda etkili olduğu Çizelge 3.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11 : Çeşitli organ hastalıklarında tercih edilen antibiyotik çeşitleri

Etkilediği Doku-Organ	Dağılımı iyi olan antibiyotikler
Akciğer	Penisilin-G, Ampisilin, Tetrasiklinler, Eritromisin-Spiramisin, Florokinolonlar
Kemik	Metisilin, Sefalozin, Pristinamisin, Linkomisin-Klindamisin
Kan-beyin bariyerini aşabilen	Fluorokinolonlar, Sefalosporinler, Penisilinler, Ampisilin,
İdrardan aktif şekilde elimine edilen	Ampisilin, Sefalosporinler, Aminosidler, Kinolonlar
Safradan aktif şekilde elimine edilen	Ampisilin, Tetrasiklinler, Tiamfenikoller, Makrolidler

(Dökmeci ve ark.1992)

4 . TAVUKLARDA EN ÇOK KULLANILAN ANTİBİYOTİK ÇEŞİTLERİ

4.1 β -Laktamlar

Beta-laktam antibiyotikler yan etkilerinin azlığı ve bakterisid olmaları nedeniyle günümüzde en sık kullanılan antibiyotik grubudur. Bakterilerin peptidoglikan tabakasının sentezini bozarak etki ederler (Akçam ve ark. 2004).

Bakterilerin hücre duvarında yer alan peptidoglikan (müreın) tabakası mikroorganizmanın yapısını ve bütünlüğünü sağlar. Bu tabaka çapraz bağlanan kısa peptid zincirleri ile sağlamlaşır. Bu çapraz bağlantı N-asetil muramik asitin yapısında yer alan D-alanin D-alanin moleküllerinin transpeptidasyon reaksiyonu ile birleşmeleri sonucu oluşur. Transpeptidaz reaksiyonu oluşturan enzimlere penisilin bağlayan proteinler “PBP” adı verilir. Betalaktam antibiyotiklerin temel hedefi işte bu penisilin bağlayıcı proteinlerdir. Hücre duvar yapısı bozulan bakteride ozmotik direnç kaybı ve ölüm meydana gelmektedir (Gür D. 2002).

Betalaktamların analizleri başlıca, et ve süt gibi hayvan ürünleri ve doku analizleri üzerinde odaklanmıştır.

Beta laktam antibiyotikler başlıca 5 grupta toplanırlar:

- 1) Penisilinler
- 2) Sefalosporinler
- 3) Monobaktamlar
- 4) Karbapenemler
- 5) Beta-laktamaz inhibitörleri (klavulonat, sulbaktam, tazobaktam)

4.1.1 Penisilinler

Penisilin ilk bulunan en önemli antibiyotiklerdendir. 30 yıldan daha uzun bir süredir veteriner ilacı olarak kullanılmaktadır ve en önemli antibiyotik gruplarından. Bütün penisilinler normal şartlarda düşük toksisiteye sahiptirler. Penisilinlerin en olumsuz tarafı, bir hayli aşırı duyarlı reaksiyonlardır ve ciltte döküntülere neden olurlar. Şimdiye kadar terotek etkisi bulunamamıştır. Penisilin antibiyotiklerinin ekstrasellüler sıvılardaki dağılımı sınırlıdır ama alevlenme onların doku içine dağılımını artırır. Penisilinler aktif olarak; böbrek, beyin ve ciğer içine taşınabilirler. Çoğu penisilinler; minimal karaciğer metabolizmasından sıkıntı çeker (Korolkovas ve ark. 1976).

Etki spektrumu dar bir madde olan penisilin ana molekülü üzerinde yapılan çalışmalar sonucu ampicilin, amoksisilin, azlosilin, karbenisilin gibi spektrumu geniş ve çok sayıda yarı sentetik penisilin türevi bulunmuş ve sagaltımda kullanılmaya başlanmıştır. Penisiline ilişkin ilk bilgileri 1928'de A. Fleming vermiştir. Araştırmacı, petri kutularında stafilocok kolonilerine bulasan penisilyum küfünün çevresindeki bakterilerin üremedini görmüş ve bunu antibiyotik olarak kaydetmiştir. Anılan küfün stafilocokların üremesini engelleyen bir madde sekillendirdiği ve salgıladığından şüphelenmiştir ve buna penisilin adını vermiştir. Di Vigneaud 1956'da penisilini sentezlemiş ve bundan bir yıl sonra da Batchelor, Doyle, Meyler ve Robinson'dan oluşan grup penisilin ana çekirdeği olan 6-amino penisillanik asitin (6-APA) senteziyle ilgili metotları geliştirmiştir (Vaden ve Riviere, 2001).

Penisilin büyük ölçüde *Penicillium notatum* ve *Penicillium chrysogenum* mantarlarından elde edilir. Günümüze kadar 40'dan fazla penisilin türevi hazırlanmıştır. Bunların bazıları doğal kültür ortamından, bazıları kültür ortamına ön maddelerin katılmasıyla biyosentetik ve bazıları da 6-APA'ya değişik grupların bağlanmasıyla yarı-sentetik olarak elde edildiği bildirilmektedir (Wilson ve Schild, 1952; Grollman ve Grollman, 1970; Huber, 1974; Kaya ve Ünsal 2000; Anon, 1987). Penisilinler emildikten sonra vücutta genellikle hücre dışı sıvıda dağılırlar. İyonize halde bulundukları ve suda iyi çözündükleri için, biyolojik zarları zor aşarlar. Penisilinlerin hepsinde olan ve en çok rastlanan yan etkileri alerjik tabiatlıdır. Ortaya çıkan belirtiler çok değişik şekillerde olabilir. Örneğin; ürtiker, cilt döküntüleri, serum hastalığıdır (Özdemir, 1997).

4.1.1.1 Penisilinlerin etki spektrumlarına göre sınıflandırılmaları

Çizelge 4.1 : Dar spektrumlu penisilinler

Pen G ve Depo	Fenoksi (Aside dayanıklı)	Beta-Laktamazlara (Penisilinaz) Dayanıklı
Pen-G (Benzil Penisilin)	Pen V (Fenoksimetil Penisilin)	Metisilin
Klemizol	Fenetisilin (Fenoksietil Penisilin)	Nafsilin
Prokain	Propisilin (Fenoksipropil Penisilin)	İzoksazolil Penisilinler
Takviyeli prokain		(Oksasilin, Kloksasilin)
Benzatin		Dikloksasilin, Flukloksasilin)

(Akkan 1997)

Çizelge 4.1’de belirtildiği üzere dar spektrumlu penisilinleri kendi aralarında depo, aside dayanıklı ve penisilinaz dayanıklı olmak üzere üç grupta tasnif edilmiştir.

Çizelge 4.2 : Genişçe spektrumlu penisilinler

Aminopenisilinler
Amoksisilin
Ampisilin ve esterleri
Hetasilin
Siklasilin
Episilin

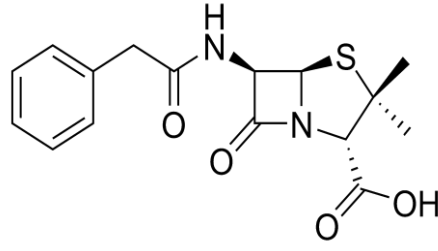
Yukarıda yer alan Çizelge 4.2 ve 4.3 ’de penisilin grubu antibiyotiklerin etki spektrumlarına göre sınıflandırılması belirtilmiştir.

Çizelge 4.3 : Geniş spektrumlu penisilinler (Antipsödomonal)

Karboksipenisilinler	Asilüreido Penisilinler	Diğer Penisilinler
Tikarsilin	Mezlosilin	Amidinopenisilinler
Karbenesilin ve esterleri (Karindasilin, karfenesilin)	Azlosilin Piperasilin	(Amdinosilin)

4.1.1.2 Penisilin G

Kimyasal yapısı Şekil 4.1’de verilen Penisilin G (Benzilpenisilin), fenilasetik asid içeren bir ortamda *Penicillium chrysogenum*’un fermentasyonundan elde edilen doğal bir penisilindir. Penisilin G, Gram-pozitif bakterilere, Gram-negatif koklara ve bazı Gram-negatif bakteriler ile spiroketler ve aktinomiçeslere karşı bakterisid etkinlik gösteren bir beta laktam antibiyotığıdır. Bu etkinliğini duyarlı mikroorganizmalara karşı aktif üreme devrelerinde, hücre duvarı sentezlerini bozarak gösterir. Penisilnaz ve β - laktamaza duyarlıdır (Öncül, 2002). Benzilpenisilin, intramüsküler ve subkutan enjeksiyonu takiben hızla emilir. Oral yol ile alımı tatmin edici değildir çünkü penisilin g mide asiti ve bakteriyel hareketler tarafından aşırı şekilde parçalanır. Penisilin G birçok sayıda farklı tuzları mevcuttur. Bunlar ya sodyum, potasyum içeren inorganik iyonlu, ya da prokain be benzatin içeren organik katyonludurlar. Sodyum ve potasyum tuzları, hızlı bir şekilde absorbe olurlar ama plazma konsantrasyonu 4 saatten daha fazla sürede tesirli değildir. Prokain tuzları, düşük çözünürlüğü vardır. Benzatin tuzu ise az oranda çözünür. Penisilin G, kan dolaşımında hızlıca absorbe olabilirler. Penisilin G’nin enjeksiyon işleminden sonraki ilk birkaç saat boyunca; kandaki kalıntı derişimi, ciğer ve böbrek hariç diğer dokulara ve süte göre daha yüksektir (Botsoglou ve ark., 2001).



Şekil 4.1 : Penisilin G' nin (benzilpenisilin) kimyasal yapısı

Farmakokinetik özellikleri: Asit olan Penisilin G'nin daha stabl hali Na ve K şeklindedir. Ağız yolundan verildiğinde mide asiti tarafından parçalanır ve çok az kısmı emilir. Penisilin G, kemik iliği ve sinir sistemi hariç vücudun her yerine dağılır fakat konsantrasyonları farklıdır. Penisilin V ise mide asidine karşı dayanıklıdır (Rolinson, 1986).

4.2 Tetrasiklinler

Tetrasiklinler yapıca birbirine çok yakından benzeyen ve tetrasiklik bir bileşik olan naftasenkarboksamid'den türeyen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. İlk tetrasiklin antibiyotik 1948 yılında *Streptomyces aureofaciens*'ten izole edilen klorotetrasiklinlerdir. İzole edilişinden bu yana tetrasiklin kimyasal işlemlerle modifiye edilerek yaklaşık 1000 türev elde edilmiştir. Ancak bu türevlerin çoğu ekonomik olmayan, dayanıksız ve etkisiz türevlerdir. Tetrasiklinler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle bakteriyostatik etki oluştururlar (Kayaalp, 1998).

Bakteri hücresi içine girdikten sonra ribozomların 30 S alt birimine bağlanırlar ve böylece 50 S alt birimlerinin akseptör noktasına aminoasil transfer RNA'nın bağlanmasını bloke ederler ve peptid zincirine aminoasit eklenmesini olanaksız duruma getirirler. Klinik bir öneme sahiptirler çünkü aerobik ve aneorobik gram pozitif ve gram negatif bakterilerine karşı çok çeşitli antimikrobiyal etkiye sahiptirler. Tetrasiklinler oldukça fazla sayıda ve çeşitli gruplardan bakterilere ve ayrıca riketsiyalara, klamidyalara, spiroketlere, mycoplasmalara, leptospiralara ve bazı protozoonlara karşı etkilidirler. Bu nedenle en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin (tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklin) geniş spektrumlu olmaları ve toksik etkilerinin düşük olması

dolayısıyla kanatlı yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanıldıkları bildirilmiştir(Klein ve ark 1995).

Tetrasiklinin genel formülü “ $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot 2H_2O$ ”dur. Tetrasiklinler, sadece belli hastalıkları iyileştirmek veya belli hastalıklardan korumak için değil aynı zamanda hayvanların gelişimlerini sağlamak için de kullanılmaktadır. Tetrasiklinler, oral ve parenteral olarak uygulanırlar. Hemen hemen polisiklik naftasenkorboksomidin türevi ile ilişkilidir. Asitlerde, bazlarda ve alkollerde çözünürler ama kloroform gibi organik çözücülerde tam olarak çözünmezler. Serbest şeklinin çözünürlüğü kısıtlı olduğu için hidroklorür tuzları veya fosfat kompleksleri kullanılır. Ultravioleto spektrumları 270 ve 360 nm civarında güçlü absorpsiyon gösterirler (Nötral ve asidik çözeltilerde).

Tetrasiklinler, alkali koşullar altında veya metal iyonları varlığında hızlıca floresans ürünlerine dönüşürler. Aşırı polar karakterinden dolayı, tetrasiklinler konjuge oluşturmak için proteinlerle bağlanır ki buda biyolojik matrikslerden ekstrakte etmeyi zorlaştırır, kolaylıkla metal iyonlarıyla şelat kompleksi oluşturur. Seyreltik mineral asit kullanımı bu zorluğu aşmaya yardımcı olur. Tetrasiklin antibiyotikler, antibakteriyel spektrumları bakımından genelde fark göstermezler ama belirli bir mikroorganizma türüne karşı etki güçlerine karşı kısıtlı bir farklılık gösterebilmektedir. Bir tetrasikline rezistans olan bir mikroorganizma diğerine de rezistantır (Meyers 2005).

Tetrasiklinler, amfoterik maddeler olup asitler ve bazlarla tuz oluşturma yeteneğine sahiptirler. Serbest şeklinin çözünürlüğü sınırlı olduğu için genellikle hidroklorür tuzları veya fosfat kompleksleri kullanılır (Seymour ve ark. , 1995).

Aralarında farmokokinetik yönden farklılıklar vardır. Bu nedenle tetrasiklin antibiyotikleri Çizelge 4.4’deki gibi gruplandırılır;

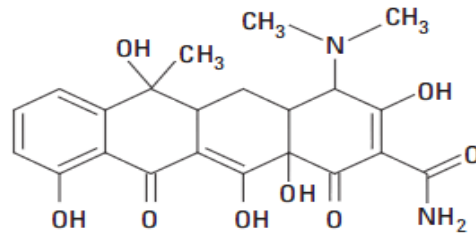
Çizelge 4.4 : Tetrasiklinlerin Gruplandırılması

KISA SÜRE ETKİLİ	ORTA SÜRE ETKİLİ	UZUN SÜRE ETKİLİ
Tetrasiklin (Doğal)	Demetilkortetrasiklin	Doksisiklin
Oksitetrasiklin (Doğal)	Metasiklin	Minosiklin

(Meyers 2005).

4.2.1 Tetrasiklinlerin etki spektrumu

Birinci ve ikinci kuşak tetrasiklinler aerob ve fakültatif anaerob mikroorganizmalara etkilidirler. Tüm tetrasiklinlerin etkiledikleri organizmalar aynıdır ama bu gruptaki değişik ajanların belli mikroorganizmalara etkinlikleri arasında farklar olabilir. Örneğin minosiklin lipid çözünürlüğünün biraz daha fazla olması nedeniyle en aktif bileşiktir, minosiklini hemen arkasından doksisiklin takip eder (Meyer, 2005). Tetrasiklinler birçok aerobik Gram pozitif ve Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilen geniş spektrumlu bakteriostatik antibiyotiklerdir (S. pneumoniae ve Gram negatif bakterilere bakterisidaldirler). Penisiline dirençli pnömokoklar genel olarak tetrasiklinlere de dirençlidir. Gonokok ve meningokoklar genel olarak tetrasiklinlere duyarlıdır. Ancak burada da penisiline dirençli gonokoklar tetrasiklinlere de dirençlidir. Toplum kökenli Escherichia coli'ler tetrasiklinlere duyarlıdır. Üriner konsantrasyonlarının da iyi olması nedeniyle akut komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonları ve akut üretritlerin tedavisinde etkilidirler. Atipik pnömoni etkenlerine, diyareyle seyreden hastalıklara ve akne olgularına etkilidirler (Schnappinger, 1996). Kimyasal yapısı da Şekil 4.2'deki gibidir.



Şekil 4.2: Tetrasiklinin Kimyasal Yapısı

4.2.2 Tetrasiklinlerin yan etkileri

Gastrointestinal yan etkiler: Oral tetrasiklin kullanımında doz ilişkili yan etkiler görülebilir. Karında rahatsızlık hissi, epigastrik ağrı, bulantı, kusma ve anoreksia olabilir. Tetrasiklinler bağırsak florasını değiştirerek sulu dışkılama ya da ishale neden olabilir.

Alerji ve deri reaksiyonları: Tetrasiklinlerin kullanımında aşırı duyarlılık reaksiyonları oluşabilmektedir. Güneş ışığına maruz kalma durumunda deride büller tarzında reaksiyonlar oluşabilmektedir.

Dişler ve Kemikler: Sekiz yaş altı çocuklarda dişlerde kahverengi sarı renk değişikliği meydana gelmektedir. Tetrasiklinler, aynı zamanda kemik gelişimini olumsuz etkilemektedir.

Hematolojik bozukluklar: Tetrasiklinler kan pıhtılaşma mekanizmasını bozarlar. Nadiren hemolitik anemi yapmaktadırlar.

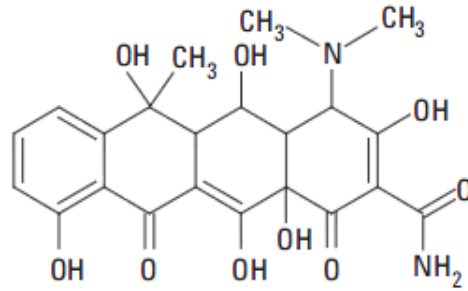
Fototoksosite: Güneş ve ultraviyole ışığa karşı aşırı duyarlılık oluşturmaktadırlar. Cilt rengi ne kadar açık olursa bu reaksiyonun görülme olayı daha yüksektir.

Karaciğer ve Böbrek: Nadirde olsa karaciğer ve böbrekte de olumsuz etkileri vardır. Özellikle karaciğer yetmezliği olan hastalara ve hamile kadınlara çok fazla miktarda verilmişse karaciğerde yağlı dejenerasyon yapabilmektedir. (Perdue ve ark., 1999).

4.2.3 Oksitetrasiklin

Streptomyces rimosus tarafından üretilen ikinci tür tetrasiklin sınıfı antibiyotiği olan oksitetrasiklin, geniş spektrumlu olduğu için birçok farklı enfeksiyonun tedavisinde kullanılır. Formülü 1953 yılında Robert Woodward tarafından keşfedildi. Woodward'ın bu keşfi daha sonraları oksitetrasiklinin bir türevidir ve bugün belki de en yaygın kullanılan tetrasiklin antibiyotiği olan doksisisiklin'in sentezi için çok önemli bir adımdır. Hem tedavi için hem çoğu bakteriyel enfeksiyonlarının kontrolü için hemde büyüme artış miktarları için kullanılmaktadır. Herhangi bir normal yollarla verilebilmektedir. Şekil 4.3'de kimyasal yapısı verilen oksitetrasiklin, hızla üreyen ve gelişme gösteren bakteriler üzerinde etkili olmaktadır. Normal tedavi dozlarında bakteriostatik nitelikte etki gösterirken, yüksek konsantrasyonları duyarlı

bakteriler üzerinde bakterisit etki oluşturur. Antibakteriyel etkisi etkinleşmiş RNA'nın ribozomlara bağlanmasını engelleyerek protein sentezinin durdurulması esasına dayanır. İkinci derecede olmak üzere bakteriyel enzimlerin yapısında bulunan metaller ile şelat oluşturarak da onların etkinliklerini engeller. Pek çok ortak patojen bakterilere karşı diğer tetrasiklinlere oranla daha zayıf bir aktivite gösterirler. Mide-bağırsak kanalından oldukça iyi absorbe olurlar. Çoğu memeli hayvanlarda kolayca bağırsaklarda absorbe olmaktadır ama kümes hayvanlarındaki bağırsak emilimi kısıtlıdır. Oksitetrasiklin kolayca vücutta dağılması, tedavi edici seviyesini devam ettirmesi yönünden çok kullanışlıdır (Kayaalp, 1998).



Şekil 4.3 : Oksitetrasiklinin Kimyasal Yapısı

Çizelge 4.5'te belirtildiği üzere 1978 yılına kadar birçok antibiyotik türü bulunmuştur. Fakat geçmiş yıllardan bugüne kadar bu antibiyotiklere ek olarak başka antibiyotik grubunun varlığında tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5 : Antibiyotiklerin bulunuş ve kullanım tarihleri

Antibiyotikler	Bulunuş Tarihi	Kliniksel Kullanımı
Penisilin	1940	1943
Tetrasiklin	1948	1952
Eritromisin	1952	1955
Vankomisin	1956	1972
Gentamisin	1963	1967
Florokinolonlar	1978	1982
Streptomisin	1944	1947

(Davies JE, 1997; Soussy, 1998; O'Brien, 1997)

5 . HPLC SİSTEMİ

Kromatografi, bir karışımın gözenekli bir ortamda, hareketli bir çözücü etkisiyle, karışım bileşenlerinin farklı hareketleri sonucu birbirinden ayrılması olgusuna dayanır. Hareket eden faza hareketli faz, bahsedilen gözenekli ortama ise adsorban veya sabit faz denir. Kromatografi türlerinden biri olan sıvı kromatografi bir ayırma tekniğidir. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tesbit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC) denir. Yüksek performans sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) ; en yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerden bir tanesidir. Kromatografik prosesler, durgun ve hareketli fazlar arasında kütle transferini kapsayan ayırma teknikleri olarak tanımlanırlar (Skoog ve ark. 1999). HPLC, bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında sıvı hareketli fazı kullanır. Bu bileşenler ilk olarak çözücüde çözünürleştirilirler ve daha sonra yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanırlar. Analiz süresince kullanılan mobil fazın içeriğinde gerçekleşen değişim ve mobil fazı oluşturan çözümlerin karıştırılma prensbine göre HPLC sistem türleri genel olarak 2 farklı kategoride gruplandırılmaktadır. Bunlar izokratik ve gradient sistemidir. Sabit bir bileşimli tek bir çözücü ile yapılan elüsyon (ayırma) izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Polarlıkları birbirlerinden farklı iki veya daha fazla çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniğe de gradient elüsyon denir. Bu teknikte iki çözücünün oranı önceden programlanmış olarak bazen sürekli bazen de kademeli bir şekilde değiştirilir (Kılınç, 2010). Standart HPLC donanımı temel olarak 4 bileşenden

oluşmaktadır. Bu bileşenler sırasıyla pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektördür (Kılıç, 1997).

Pompa, temel olarak pompa mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlar, degazörden mobil fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir. Akış hızı aralıklarına göre pompalar.

Enjektör, örneğin sabit faz (kolon) öncesinde mobil faza enjekte edilmesi için kullanılır. Elle kumanda edilen manuel ve oto-enjektörler olmak üzere 2 çeşidi bulunmaktadır.

Kolon (Sabit Faz), maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar.

Dedektör, hareketli fazda meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişiklikleri izleyerek kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına imkan sağlayan elektronik araçlardır (Skoog ve ark. , 1997)

5.1 Normal Faz Kromatografisi

Sabit faz polar (Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış $-CN$, $-NO_2$ veya NH_2 dolgu maddeleri) mobilfaz non-polar ya da düşük polariteye sahiptir (Etiler, Kloroform, Hekzan vb. çözücüler ve karışımları). Düşük polariteye sahip olan analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için düşük polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle apolar analit polar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir (Skoog ve ark. , 1999).

5.2 Ters Faz Kromatografisi

Ters faz kromatografisi sabit fazın mobil fazdan daha polar olduğu durumları açıklamak için kullanılır. Genelde sabit faz hidrokarbondur. 18 karbonlu bir n-alkan olan kimyasal bağlı oktadesilsilan (ODS) en yaygın olarak kullanılan sabit fazdır. Bunun yanı sıra C8 ve kısa alkil zincirleri ve aynı zamanda sikloheksil ve fenil grupları alternatif olarak kullanılmaktadır. Hareketli (mobil) faz genellikle su karışımları veya suda çözülebilir çeşitli sulu tamponlardan oluşmaktadır. Başlıca tercih edilen solventler; metanol, asetonitril, etanol, propanol,

tetrahidrofuran'dır (Skoog ve ark. , 1999). Ters-faz sıvı ve normal-faz sıvı kromatografisinde madde, polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakın olan maddeler kolonu önce terk eder. Ayrıca normal faz ile ters fazın karşılaştırılması Çizelge 5.1'de yapılmıştır.

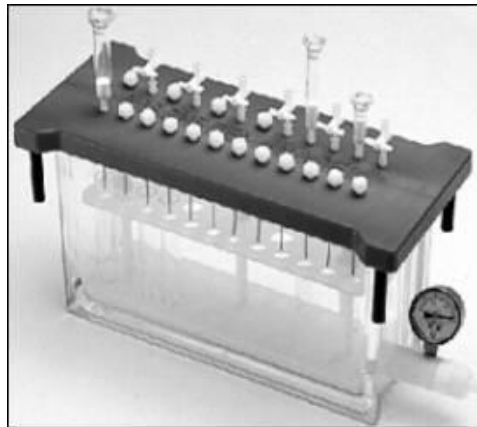
Çizelge 5.1: Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi karşılaştırılması

	Ters-faz	Normal-faz
Hareketli Faz Polaritesi	Ortadan yükseğe	Ortadan düşüğe
Elüsyon sırası	Polar önce	Az polar
Sabit Faz Polaritesi	Düşük	Yüksek

(Meyer, 1988)

5.3 Katı Faz Ekstraksiyonu Sistemi

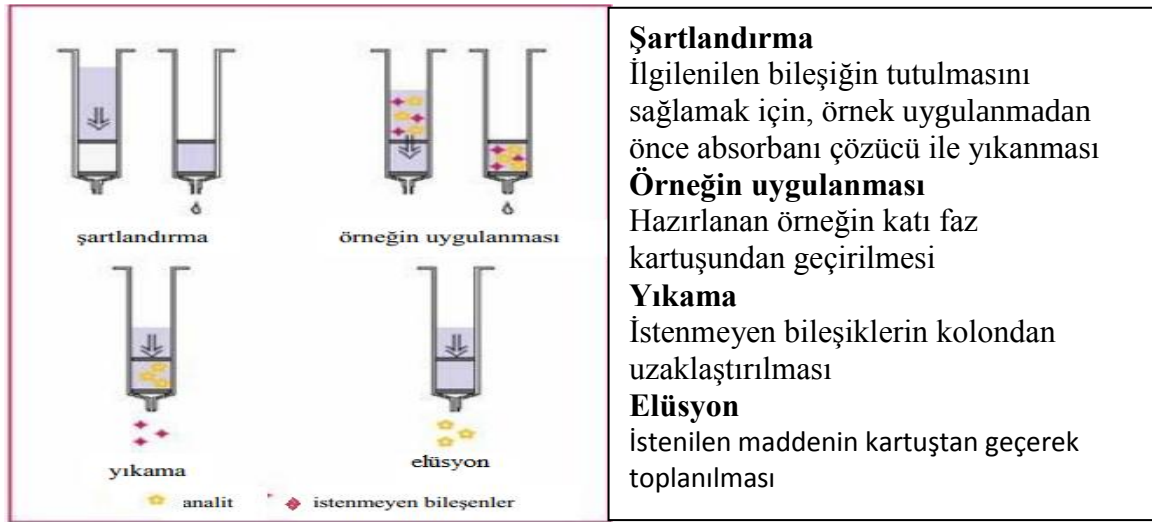
SPE yöntemi, temel olarak küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolon veya disklerine çeşitli tutucu maddelerin doldurulması ve sıvı örneklerini istenmeyen bileşenlerden ayırma (temizleme), yoğunlaştırma ve ileriki analiz aşamaları için örnek matriks yapısının değiştirilmesi amaçlarıyla hazırlanmış olan kolon ve disklerden geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Sıvı örneğin kolondan geçirilmesi, yerçekimi vasıtasıyla (manual) gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybının önüne geçmek amacıyla Şekil 5.1'de ki sisteme vakum pompası takılarak yapılabilir (Zief, 2005).



Şekil 5.1: Vakum manifoldu

Özellikle yüksek geri kazanımlara sahip olması, daha saf süzüntüler elde edilebilmesi ve çok sayıda örneğin kısa zamanda işlenmesine olanak verecek şekilde otomasyon sağlayabilmesi nedeniyle hemen hemen bütün ilaç ve benzeri maddelerin analizinde SPE yaygın olarak kullanılmaktadır.

SPE metodunda kolondan geçirilme sırasında örnek molekülleri ile tutucu madde arasında kimyasal bir etkileşim meydana gelir. Bu etkileşimden faydalanarak maddelerin ayrılma işlemi Şekil 5.2'deki gibi gerçekleştirilmektedir. Birinci aşamada, analiz edilecek bileşik tutucu maddeye bağlanarak kolon içinde tutulurken, çözelti ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi bir etkileşime girmezler. Daha sonra istenmeyen bileşenler uygun yıkama çözeltisi ile uzaklaştırılır ve analiz edilecek bileşen tutucu maddeden uygun bir çözelti yardımıyla çözdürülerek alınır. Bu yüzden kullanılacak kimyasal çözücüler ona göre seçilmelidir.



Şekil 5.2: KFE yöntemi ile maddelerin ayrılma aşaması (Macherey 2004).

6 . ÇALIŞMANIN AMACI VE İÇERİĞİ

Tavuklarda kullanılan tetrasiklin ve β -laktam türü antibiyotiklerin, tavuk kesildikten sonra onların bünyesinde bulunan antibiyotik miktarının tespiti HPLC cihazıyla analiz yapılmış ayrıca çalışmada kullanılan metodun doğruluğunun kanıtlanması amaçlanmıştır. Bu çalışmada tetrasiklin, oksitetrasiklin ve β -laktam grubundan olan penisilin G'nin seçilmesinin nedeni, üreticilerin gıdalarda çoğunlukla bu antibiyotikleri kullanmalarıdır. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda penisilin antibiyotiğinin kalıntı analizinin çok fazla yapılmadığı görülmüştür. Bu nedenle sunulan tez çalışmasında bu antibiyotik seçilerek incelenmiştir. Antibiyotik alan tavuklar, antibiyotikler tamamen vücutlarından atılmadan tüketicilere sunulduğunda alerjik reaksiyonlar, toksik belirtiler, üreme bozuklukları, bağırsak florasında değişiklikler gibi etkilere sebep olmaktadır (Ergün ve ark., 2000). Buna ek olarak dirençli bakterilerin gelişimine sebep olduğu görülmektedir. Gelişen dirençli bakteriler herhangi bir tedavi için alınan antibiyotiğe vücudun tepki verememesine sebep olmaktadır (Gustafson ve ark.,1997). Kanatlı etlerinden sıklıkla izole edilen enterik patojen bakterilerin insanlarda kullanılan antibiyotiklere karşı çapraz direnç geliştirdiği ve vücut için yararlı bakterileri de yok ettiği çeşitli bilimsel çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu çalışmada tetrasiklin ve penisilin antibiyotiklerinin tavuklardaki kalıntı miktarları ile üreticinin Avrupa Birliği tarafından belirlenen MRL (en fazla atık) değerlerine uygunluğu belirlenecektir.

6.1 Tavuklarda Antibiyotik Kalıntısı İle İlgili Önceki Çalışmalar

Kore'de Ji Young, Soo ve ark. (2011) yaptığı çalışmada LC/MC/MC ile sığır kasına, tavuğa, süte ve balıklara uygulanmıştır. 128 örneğe uygulanan penisilin antibiyotiğinde,benzilpenisilin 15 örnekte, kloksasilin 7 örnekte, oksasilin 2 örnekte belirlenmiştir. Belirlenen kalıntı seviyeleri, penisilin için MRL değerinin altında bulunmuştur.

2006 yılında Malezya’da dörtlü plak test ile 47 adet tavuk eti  rneği antibiyotik kalıntıları yönünden incelendiğinde, 17 örnekte (%36,17) kalıntı bulunarak, örneklerde beta-laktam ve tetrasiklin kalıntılarının daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir.

 in’de (2003) HPLC yöntemiyle yapılan çalışmalarda tavuk etlerinde %74.7-86,5 oranında s lfametazin ve sülfametoksazol kalıntıları bulunmuştur.

Türkiye’nin bir çok şehrinden sağladığı 200 tavuk eti ve 200 tavuk karaciğer örneğini HPLC tekniği ile tetrasiklin grubu antibiyotik (tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklin) kalıntıları incelemiştir. Çalışmanın sonucunda tavuk etlerinde %8.1 oranında oksitetrasiklin, %7 tetrasiklin ve %5.5 klortetrasiklin; tavuk karaciğerlerinde ise %74 oranında oksitetrasiklin, %47 tetrasiklin ve %5.5 klortetrasiklin kalıntısı bulunmuştur.

Başka bir çalışmadan bahsedecek olursak , yurtdişında bazı ülkelerde (1999), broyler pili lerine 480 mg/kg tetrasiklin ve yumurta tavuklarına 840 mg/kg oksitetrasiklin ağız yoluyla 7 gün boyunca verilerek, çalışmanın sonucunda HPLC metodu ile göğüs etinde ve yumurtada %76 oranında kalıntı tespit edildiği bildirilmiştir.

Lou ve Ang (2000), tavuk kas örneklerini LC (Liquid Chromatography) metodu ile amoksisilini incelediklerinde, yaklaşık olarak 20  g/g düzeyinde, %81,7-82,9 oranında kalıntıya rastladıklarını bildirmişlerdir.

 in’de, Chen-Hao (Andy) Zhai 2008 yılında yayınladıkları çalışmalarında HPLC metoduyla tetrasiklin tayini yapmışlardır ve yapılan deneyler sonucunda tavuklardaki yabancı maddeler minimum bulunmuş ve tetrasiklin kalıntısı MRL değerlerinin altında bulunmuştur.

Van Egmond ve ark (2000), domuz etinde çeşitli antibiyotik kalıntıları üzerine ısıtma etkisini incelediklerinde, penisilin, amoksisilin, ampisilin, kloksasilin, oksitetrasiklin, doksisisiklin, kolistin, dihidro-streptomisin ve sülfametoksazol kalıntılarının 134  C’de 3 atmosfer basınç altında 20 dakika süre ile sterilizasyon işlemi sonucunda tamamen yıkımlanmadığını ve yaklaşık %10’unun ette kaldığını saptamışlardır.

Baydan ve arkadaşları (2000) etlik piliç dokularındaki florokinolon grubu ilaçlardan enrofloksasin kalıntıları üzerine çeşitli pişirme işlemleri (ızgara, tuz katılarak ve katılmadan haşlama) ile -18 °C’de farklı sürelerdeki (5, 20 ve 30 gün) saklamanın etkisini araştırmışlardır. Izgara işleminin ilaç kalıntısının azalması yönünde olumlu bir etkiye neden olmadığı, haşlama işlemi ile ise dokudan suya geçiş şeklinde bir değişikliğin bulunduğu bildirilmiştir. -18 °C’de 5, 20, 30 gün muhafaza sonucu, kalıntı düzeyinin göğüs dokusunda sırasıyla %20, %65 ve %78; but dokusunda %7, %53.5, %78.5; karaciğer dokusunda %8.6, %47 ve %84 oranında bir azalma gösterdiği saptanmıştır.

YA-MIN ve ark. (2000), yılında Tayvan’da 25 tavuk ve domuz kaslarına yapılan 13 ilaç kalıntısı tayininde sadece bir tane tavuk kasında 1,23 ppm sülfakinoksaliz bulunmuştur.

Rose ve ark. (1999), tavuk etlerinde dimetridazol ve ronidazol gibi nitroimidazol grubu ilaç kalıntılarının pişirme işlemine dayanıklı olduklarını ortaya koymuşlardır. Buna rağmen, yumurtadaki kalıntılarının pişirme işlemi ile sırasıyla %14, %32 düzeylerinde azaldığını gözlemlemişlerdir.

Naoto Furusawa (2000), marketten alınan 30 farklı tavuğun ciğer ve göğsüne katı faz ekstaksiyon işlemini takiben sülfadimetoksin ve onun hidroksi metabolitlerinin HPLC ile belirlemişler ve örneklerde hiçbir antibiyotik kalıntısına rastlanmadığı, ayrıca kromatogram sonuçlarında yabancı maddeye de rastlamadıklarını yayınlamışlardır.

İran’da (2006), Tahran mezbahasından 270 tavuk kası, ciğeri ve böbreği toplanarak HPLC ile enrofloksazin analizi yapılmıştır. 8 kas, 12 ciğer ve 22 böbrek örneğinde MRLs değerlerinin üzerinde kalıntıya rastlanılmıştır (Salehzadeh ve ark.).

Ji Young Song ve arkadaşları (2011), penisilin için çoklu kalıntı analiz metodları geliştirmiştir. Sığır etinde, tavukta, sütte ve balıkta LC/MS/MS ile penisilin kalıntısı bakılmıştır. Metod, 128 örneğe uygulanmıştır ve 15 örnekte benzilpenisilin, 7 örnekte kloksasilin, 2 örnekte de okzasilin bulunmuştur. Penisilin miktarları MRL değerlerinin altında bulunmuştur.

2012 yılında etinkaya ve arkadaşları Bursa'daki süpermarketlerden temin ettiği 60 tavuk örneğinde, sıvı kromotografi-ikili kütle spektrometre ile tetrasiklin grubu araştırmışlardır. 6 tavuk örneğinde, 19,9 ile 35,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ arasında doksisiklin belirlenmiştir. 1 tavuk örneğinde 17,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tetrasikin bulunmuştur. Hiç bir tavuk örneğinde oksitetrasiklin ve klorotetrasikline rastlanılmamıştır.

2001 yılında Muriuki ve arkadaşlarının Kenya'da yaptığı bir çalışmada 250 sığır etinde tetrasiklin grubu antibiyotikleri HPLC yöntemiyle araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada; örneklerin 110 tanesinde (%44) oksitetrasikline, 4 tanesinde de klorotetrasikline rastlanılmıştır. Belirlenen tetrasiklin kalıntılarının MRL üzerinde olduğu bulunmuştur.

7. MATERİYAL VE YÖNTEM

7.1 Materyal

Tavuklarda en çok kullanıldığı görülen tetrasiklin (tetrasiklin ve oksitetrasiklin) ve β -laktam (penisilin G) incelenmek üzere seçilmiştir. Antibiyotikler sigma marka alınıp, buzdolabında muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan çeşitli markaların tavuk örnekleri, İstanbul'daki marketlerden rastgele yöntemle temin edilmiştir. Bu örnekler, homojenize hale getirildikten sonra -20°C 'de saklanmıştır.

7.1.1 Kullanılan cihaz

Çalışmada, HPLC/Perkin Elmer Seriesi kullanılmıştır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazının seçilmesinin sebebi analiz sonuçlarının doğruluğu ve cihazın hızlı analiz etmesidir. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) cihazı tip ve özellikleri: Çalışmada ters fazlı, C18 kolonlu, Foto diod array dedektörlü bir HPLC kullanılmıştır. Ayrıca saflaştırma işlemi için de katı faz ekstraksiyon sistemi kullanılmıştır.

7.1.2 Laboratuvar gereçleri

- Hassas Terazî (Gec Avery)
- Mikro Pipetler
- Santrifüj (MSE Mistral 2000)
- Vorteks (Heidolph)
- Rotary Evaporatör (Heidolph)
- Ultrasonik Banyo (Bandelin Sonorex)
- Katı faz ekstraksiyonu (Macherey-nagel)
- pH metre (Knick)

7.1.3 Kullanılan kimyasallar

Tetrasiklin standard (Sigma)

Oksitetrasiklin standard (Sigma)

Penisilin G standard (Sigma)

Metanol HPLC Grade (Merck)

Asetonitril HPLC grade (Merck)

Oksalik asit dihidrat (J.T.Baker)

Trikloroasetik asit (J.T.Baker)

Formik asit (Carlo Erba)

Sodyum hidrojen fosfat dihidrat (J.T.Baker)

EDTA.Na (Carlo Erba)

Sitrik asit monohidrat (Merck)

Potasyum fosfat dibasic (J.T.Baker)

Potasyum hidrojen fosfat (J.T.Baker)

Amonyum asetat (Merck)

Ultra saf su

7.1.4 Tampon çözeltilerin hazırlanması

7.1.4.1 McIlvaine tamponu

2,95 g sitrik asit monohidrat, 3,43 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 8,41 g etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu ultra saf suda çözülerek 250 mL'ye tamamlandı.

7.1.4.2 Fosfat tamponu

2,18 g potasyum fosfat dibazik, ultra saf suda çözülerek 250 mL'ye tamamlandı ve pH 8,5 olacak şekilde ayarlandı.

7.1.5 Örnek hazırlamada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

7.1.5.1 %20'lik TCA Çözeltisi

10 g TCA distile suda çözülerek 50 ml'ye tamamlandı.

7.1.5.2 %5'lik MeOH çözeltisi

2,5 ml metanol distile su ile 50 ml'ye tamamlanır.

7.1.5.3 % 0,1'lik Formik asit çözeltisi

0,05 ml formik asit distile su ile 50 ml'ye tamamlanır.

7.1.5.4 0,03 M Metanolik okzalik asit çözeltisi

1,89 gram okzalik asit dihidrat distile suda çözülerek 500 ml'ye tamamlandı ve ultrasonik banyoda yarım saat bekletildi.

7.1.5.5 0,025 M KH_2PO_4 çözeltisi

1,70 gram potasyum dihidrojen fosfat distile suda çözülerek 500 ml'ye tamamlandı ve derişik fosforik asit ile pH 3'e ayarlandı.

7.1.6 Stok standart çözeltilerin hazırlanması

7.1.6.1 Tetrasiklin stok standardı (1 mg/mL)

10± 0,01 mg tetrasiklin standardından tartılarak 10 ml'lik balon jojeye konulur ve üzerine biraz metanol eklendikten sonra manyetik karıştırıcı ile homojen hale getirildikten sonra tekrar balon joje çizgisine kadar metanol ile tamamlanır ve 1000 ppm standart çözeltisi hazırlanmış olmaktadır (-10 °C'de buzdolabında ve karanlıkta 1 ay saklanabilir.).

7.1.6.2 Oksitetrasiklin stok standardı (1 mg/mL)

10± 0,01 mg oksitetrasiklin standardından tartılarak 10 ml'lik balon jojeye konulur ve üzerine biraz metanol eklendikten sonra manyetik karıştırıcı ile homojen hale getirildikten sonra tekrar balon joje çizgisine kadar metanol ile tamamlanır ve 1000 ppm standart çözeltisi hazırlanmış olmaktadır (-10 °C'de buzdolabında ve karanlıkta 1 ay saklanabilir.).

7.1.6.3 Penisilin G stok standardı (1 mg/mL)

10± 0,01 mg penisilin g standardından tartılarak 10 ml'lik balon jojeye konulur ve üzerine biraz metanol eklendikten sonra manyetik karıştırıcı ile homojen hale getirildikten sonra tekrar balon joje çizgisine kadar metanol ile tamamlanır ve 1000 ppm standart çözeltisi hazırlanmış olmaktadır (-10 °C'de buzdolabında ve karanlıkta 1 ay saklanabilir.).

7.1.7 Çalışma standart çözeltilerin hazırlanılması

7.1.7.1 Tetrasiklin ve oksitetrasiklin çalışma standartları (10 µg /mL)

Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin stok çözeltilerinden her birinden ayrı ayrı 50'şer µl alınarak, methanol ile 5 mL'lik balon joje içerisinde çizgisine kadar dilüe edilir ve iyice karıştırılır. Çözeltiler günlük hazırlanır.

7.1.7.2 Tetrasiklin ve oksitetrasiklin çalışma standartları (20 µg /mL)

Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin stok çözeltilerinden her birinden ayrı ayrı 100'er µl alınarak, methanol ile 5 mL'lik balon joje içerisinde çizgisine kadar dilüe edilir ve iyice karıştırılır. Çözeltiler günlük hazırlanır.

7.1.7.3 Tetrasiklin ve oksitetrasiklin çalışma standartları (40 µg /mL)

Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin stok çözeltilerinden her birinden ayrı ayrı 200'er µl alınarak, methanol ile 5 mL'lik balon joje içerisinde çizgisine kadar dilüe edilir ve iyice karıştırılır. Çözeltiler günlük hazırlanır.

7.1.7.4 Tetrasiklin ve oksitetrasiklin çalışma standartları (80 µg /mL)

Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin stok çözeltilerinden her birinden ayrı ayrı 400'er µl alınarak, methanol ile 5 mL'lik balon joje içerisinde çizgisine kadar dilüe edilir ve iyice karıştırılır. Çözeltiler günlük hazırlanır.

7.1.7.5 Tetrasiklin ve oksitetrasiklin çalışma standartları (160 µg /mL)

Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin stok çözeltilerinin her birinden ayrı ayrı 800'er µl alınarak 5 mL'lik balon jojeye konur ve metanol ile 5 mL'ye seyreltilir. Çözeltiler günlük hazırlanır.

7.2 Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin için Geliştirilen Yöntem

7.2.1 Örnek hazırlama

İstanbuldaki marketlerden rastgele yöntemle 9 adet marka tavuk göğsü alındı. Doku örnekleri parçalayıcı yardımıyla kıyma haline getirilip homojenize edildi. Homojenize olan tavuk örneklerinden 5 ± 0.1 g tartılarak santrifüj tüpüne konuldu ve üzerine 2 mL %20'lik TCA ve 20 mL McIlvaine tamponu eklendi. Çözücüler eklendikten sonra numune vortex yardımı ile 5 dakika boyunca karıştırıldı. Karıştırıldıktan sonra 3500 rpm de 15 dk santrifüjlendi. Santrifüjlenen tavuk numuneleri katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırıldı. Tetrasiklin ve oksitetrasiklinin katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırılması için C18 kartuşu seçildi. Kartuş 3mL metanol ve 2 mL ultra saf suyla şartlandırıldı ve saflaştırma işlemine uygun hale getirildi. Daha sonra santrifüj yapılan tavuk örneği kartuştan geçirildi. Örnek geçirildikten sonra kartuş, 10 mL %5'lik metanol ile yıkanılarak istenmeyen bileşenler uzaklaştırıldı. En son olarak 10 mL 0,01 M metanolik okzalik asit ile elue edilerek antibiyotik çözeltileri temişlenmiş olarak alındı. Elde edilen çözelti rotary yardımıyla uçurulur ve kalan kalıntı 2,5 mL metanol ile çözülür. En son olarak alınan metanol çözeltisi 0,45-µm PTFE filtreden geçirilerek HPLC'ye verildi.

7.2.2 HPLC ile tetrasiklin ve oksitetrasiklin analizi

Hazırlanan örnek çözeltisinden 20 µL HPLC sistemine enjekte edildikten sonra, hareketli faz olarak seçilen metanol, asetonitril ve okzalik asit çözeltileri Çizelge 7.1'de verilen program uygulanarak yürütülmüştür.

Kromatografik Koşullar

Kolon sıcaklığı: 30 °C

Kolon akış hızı: 1mL/dk

Mobil faz: Metanol (A), Asetonitril (B), 0.03 M Okzalik Asit (C)

Dalga boyu aralığı: 220nm-400nm

Dedektör tipi: Photo diode array (PDA)

Analiz Süresi: 20dk

Çizelge 7.1 : Tetrasiklin grubunun gradient programı

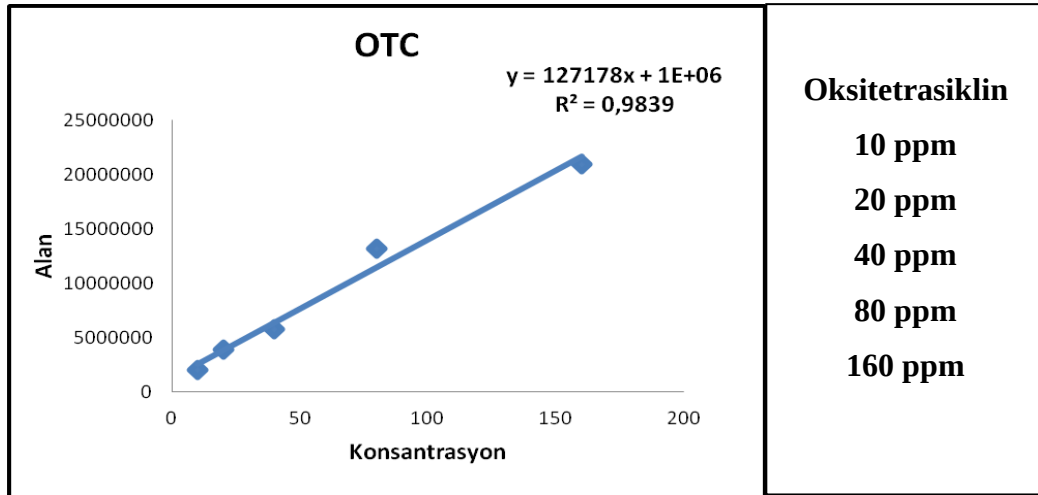
Zaman	%MeOH	%ACN	%Okzalik Asit
0	0	8	92
2	0	18	82
2.1	5	20	75
7	5	20	75
10	10	25	65
13	15	20	65
15	15	20	65
18	0	8	92

Alınan kromatogramlarda örneklerin geliş zamanları ve spektrumları incelenmiş, önemli piklerin 254 nm ve 351 nm’ dalga boylarında çıktığı gözlenmiştir. Değerlendirilen kromatogramlarda 351 nm’deki pikler seçilerek nicel analiz bu dalga boyunda yapılmıştır. Alıkonma zamanları Çizelge 7.2’de görüldüğü gibi saptanmıştır.

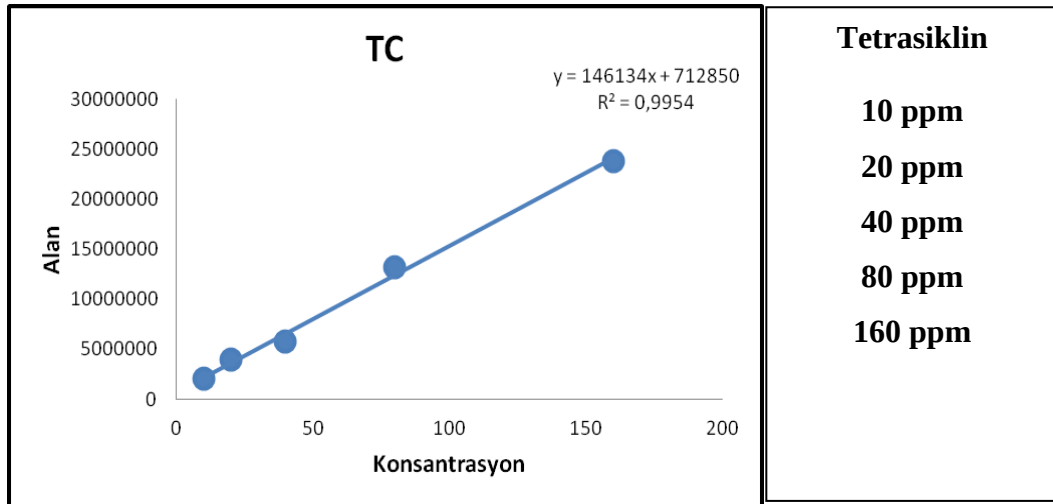
Çizelge 7.2 : Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin’in alıkonma zamanları

Antibiyotik	Alıkonma Zamanları
Tetrasiklin	9 dk 15sn
Oksitetrasiklin	8 dk 3sn

HPLC yöntemi ile oksitetrasiklin ve tetrasiklin standartları 10, 20, 40, 80, 160 ppm hazırlanarak kalibrasyon grafikleri çizildi. OTC ve TC’nin kalibrasyon grafikleri Şekil 7.1 ve 7.2’ de verilmiştir. Kalibrasyon grafikleri çizilen antibiyotiklerin denklemleri bulundu ve bu denklemler sayesinde antibiyotik kalıntı miktarları hesaplandı.



Şekil 7.1 : Oksitetrasiklinin Kalibrasyon Grafiği



Şekil 7.2 : Tetrasiklinin Kalibrasyon Grafiği

7.3 Penisilin G için Geliştirilen Yöntem

Penisilin G antibiyotiğinin çalışma standartları tetrasiklin antibiyotiğinin çalışma standartlarının hazırlanması ile aynıdır.

7.3.1 Örnek hazırlama

İstanbuldaki marketlerden rastgele yöntemle 9 adet marka tavukgöğsü alındı. Doku örnekleri parçalayıcı yardımıyla kıyma haline getirilip homojenize edildi. Homojenize olan tavuk örneklerinden 5 ± 0.1 g tartılarak santrifüj tüpüne konuldu ve üzerine 2 mL %20'lik Formik asit ve 20 mL hazırladığımız Fosfat tamponu (pH:8.5) eklenir. Çözücüler eklendikten sonra numune vortex yardımı ile 5 dakika boyunca karıştırıldı. Karıştırıldıktan sonra 3500 rpm de 15 dk santrifüjlendi. Santrifüjlenen

tavuk numunesine katı faz ekstraksiyonu yapıldı. C18 kartuşu ilk olarak 3mL metanol ve 3 mL %0,1'lik formik asit (ultra saf suyla hazırlanmış) ile şartlandırıldı ve saflaştırma işlemine uygun hale getirildi. Daha sonra santrifüj yapılan tavuk örneği kartuştan geçirildi. Örnek geçirildikten sonra kartuş, 2 mL% 0,1'lik formik asit ve 2 mL fosfat tamponu ile yıkanılarak istenemeyen bileşenler uzaklaştırıldı. En son olarak 3 mL Asetonitril (ACN) ile elue edilerek antibiyotik çözeltileri temizlenerek alındı. Elde edilen çözelti, rotary yardımıyla sıvı kısmı uçurulur ve kalan kalıntı 2,5 mL metanol ile çözülür. En son olarak, süzöntü 0,45-µm PTFE filtreden geçirildikten sonra HPLC'ye verilir.

7.3.2 HPLC ile Pen G analizi

Hazırlanan örnek çözeltisinden 20 µL HPLC sistemine enjekte edildikten sonra, hareketli faz olarak seçilen KH₂PO₄ ve asetonitril çözeltileri ile yürütülmüştür.

Kromatografik Koşullar

Kolon sıcaklığı: 35 °C

Kolon akış hızı: 1mL/dk

Mobil faz: %50 KH₂PO₄ (A), %50 Asetonitril (B)

Dalga boyu aralığı: 220nm-400nm

Dedektör tipi: Photo diode array (PDA)

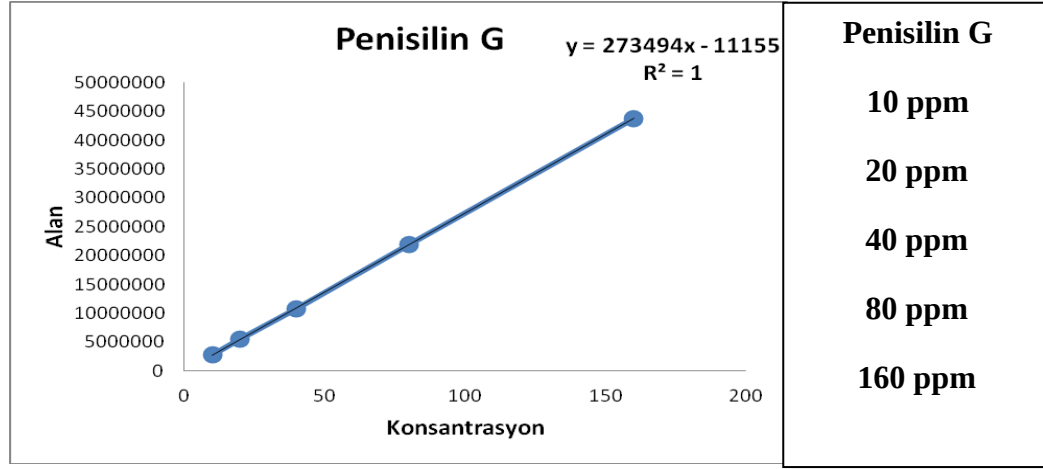
Analiz Süresi: 15dk

Alınan kromatogramlarda örneklerin geliş zamanları ve spektrumları incelenmiş, önemli piklerin 204 nm, 220 nm ve 230 nm dalga boylarında çıktığı gözlenmiştir. Değerlendirilen kromatogramlarda 351 nm'de alınan pikler seçilerek nicel analiz bu dalga boyunda alınan pikler ile yapılmıştır. Alıkonma zamanı Çizelge 7.3 'de görüldüğü gibi saptanmıştır.

Çizelge 7.3 : Penisilin G'nin alıkonma zamanı

ANTİBİYOTİK	ALIKONMA ZAMANI
Penisilin G	3 dakika 95 saniye

HPLC yöntemi ile tavuk örneklerinde penisilin G kalıntısının aranmasında standartların çeşitli derişimler de hazırlanarak kullanılmasıyla elde edilen kalibrasyon grafiğı şekil 7.3’ de verilmiştir.



Şekil 7.3 : Penisilin G’nin Kalibrasyon Grafiğı

7.4 Yöntem Parametreleri

7.4.1 Tayin limiti (LOD)

Tayin limiti; örnekte ölçülebilen (sinyal olarak okunabilen) fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük miktarı ifade etmektedir (Akdağ, 2003; 2006). Sinyal/gürültü (S/N) oranının 3 katı alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 7.4’de görölmektedir.

7.4.2 Ölçüm limiti (LOQ)

Ölçüm limiti, analitin kabul edilebilir düzeyde doğru ve kesin olarak metot koşullarında belirlenebildiğı en düşük seviyedir (Tiryaki ve Aysal, 2003). Ölçüm limiti, kör örnek okumalarının sinyal/gürültü (S/N) oranının 10 katı alınarak hesaplanır. Sonuçlar çizelge 7.4’de görölmektedir.

Çizelge 7.4 : Antibiyotiklerin LOD ve LOQ değerleri

Antibiyotik	LOD	LOQ
Tetrasiklin	1,55	5,20
Oksitetrasiklin	1,32	4,39
Penisilin G	1,07	3,60

7.4.3 Geri kazanım oranı

Geliştirilen yöntemlerle 9 tavuk örneği çalışılmış ve antibiyotik rastlanan ve rastlanmayan örnekler tespit edilmiştir (Çizelge 7.5). Çizelgede görüldüğü gibi 9 örnekten 7'sinde antibiyotik kalıntısına rastlandı. Antibiyotik kalıntısı rastlanmayan C markalı tavuk örneğine 20, 40, 80 ppm antibiyotik standartlarından eklendi. Antibiyotik eklenen tavuk örneklerinin geliştirilen yöntemlerin her kademesi uygulanarak (örnek hazırlama ve kromatografik koşullarda) analizleri yapıldı. Bulunan değerlerden hesaplanan geri kazanım yüzdeleri Çizelge 7.6'da verilmiştir.

Çizelge 7.5: HPLC Yöntemiyle Tavuklarda Bulunan Antibiyotikler

Firma Adı	Oksitetrasiklin	Tetrasiklin	Penisilin G
A	+	+	+
B	+	+	-
C	-	-	-
D	+	-	-
E	-	+	+
F	+	+	+
G	-	-	+
H	-	-	-
I	+	-	-

Çizelge 7.6: Örnek C'ye ait pen G, oksitetrasiklin ve tetrasiklinin geri kazanım oranları

Eklenen (ppm)	Penisilin G		Oksitetrasiklin		Tetrasiklin	
	Bulunan	% R	Bulunan	% R	Bulunan	% R
20	19,43	97,15	19,83	99,17	19,78	98,90
40	38,53	96,32	39,12	97,82	39,10	97,76
80	77,26	96,57	79,2	99,00	76,74	95,92

Çizelge 7.6'da belirtildiği üzere antibiyotik kalıntısı rastlanmayan C markalı tavuk örneğine istenilen miktarlarda ayrı ayrı antibiyotik standartlarından eklenip, gerekli prosedürler uygulanarak geri kazanım oranları elde edilmiştir. Geri kazanım oranlarının bulunmasıyla elde edilen antibiyotik standart miktarları, yöntemin doğruluğunu da kanıtlamış olmaktadır.

8 . SONUÇLAR VE YORUMLAR

Tavuk yetiştiriciliğinde, hasta tavukları tedavi etmek, gelişimlerini hızlandırmak ve bunun gibi sebeplerden dolayı tavuklara antibiyotik verilmektedir. Verilen antibiyotik miktarının arttırılması, insan sağlığını olumsuz açıdan etkilediği için büyük önem teşkil etmektedir. Bu nedenle ilk olarak yapılan çalışmada, tavuk etinde antibiyotik kalıntılarını araştırmak amacıyla, tavuk sektöründe en çok kullanılan antibiyotik çeşitleri belirlendi. Belirlenen antibiyotik çeşitlerinin tavuklarda hangi durumlarda kullanıldığı, etkileşimlerinin ne olduğu, fazla kullanıldığında nasıl bir sorun teşkil edebileceği araştırıldı. Daha sonra belirlenen antibiyotiklerin kalıntı tayininde çalışmadan önceki araştırmalarda hangi yöntemlerin izlenildiği ve nasıl bir sonuca vardıkları belirlendi.

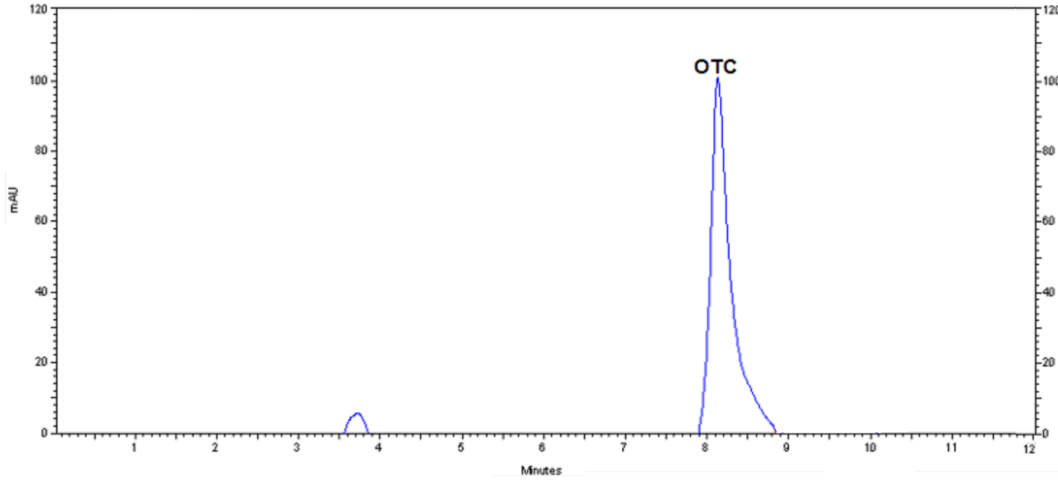
Antibiyotik kalıntılarının analizlerinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez, ince tabaka kromatografisi en sık kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemlerin başında HPLC gelmektedir. HPLC'nin tercih edilmesinin başlıca nedeni, eser miktardaki maddelerin hızlı ve doğru olarak analizlenmesidir.

Yapılan deneyler sonucu tetrasiklin ve penisilin G antibiyotiklerinin analizinde farklı yöntemlerin uygulanması gerekliliği tespit edildi. Yapılan araştırmalarda, tetrasiklinin karışık yapısından dolayı penisilin grubunun pik vermesini zorlaştırdığı görüldü.

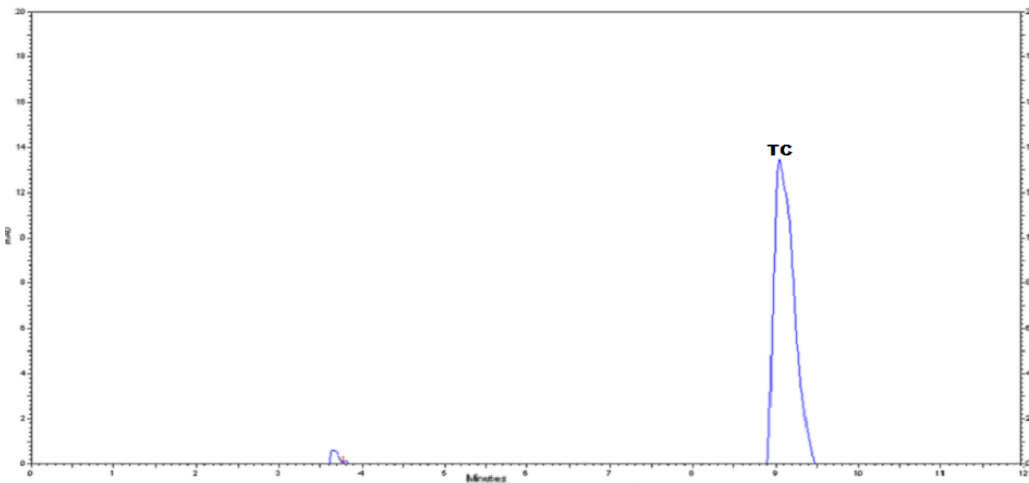
Yöntem geliştirilmesinde öncelikle mobil fazın tür ve bileşimi değiştirilerek çeşitli denemeler yapıldı. İlk olarak tetrasiklin için asetonitril ve metanolle izokratik bir yöntem belirlendi, fakat tetrasiklinin alıkonma sürelerindeki belirsizlik ve pik şekillerinin simetrik olmamasından dolayı (kuyruklu) bu metodun kullanılamayacağı sonucuna varıldı. Tetrasiklinlerin metal iyonlarıyla şelat oluşturarak kuyruklu piklere neden olduğu literatürde de bahsedilmektedir. Bu çalışmalarda tetrasiklinlerin şelat oluşumunu engellemek üzere fosforik veya okzalik asit kullanıldığı görüldü. Bu

nedenle üçüncü mobil faz olarak okzalik asit seçildi ve gradient program uygulandı. TC ve OTC antibiyotikleri için belirlenen yöntemde kullanılması gereken mobil fazların metanol, asetonitril ve okzalik asit olmasına karar verilmesinden sonra 10, 20, 40, 80, 160 ppm standart çözeltileri ile kromatogramlar elde edildi. Tetrasiklin ve oksitetrasiklinin kalibrasyon grafikleri derişimleri bilinen antibiyotik standartlarına karşı pik alanları ölçülerek çizildi. Elde edilen çalışma doğruları 10-160 ppm aralığında lineer olup, denklemleri sırası ile $y=146134x+713850$ ($R^2=0,9954$) ve $y=127178x+1 \times 10^6$ ($R^2=0,9839$) olarak belirlendi.

Şekil 8.1 ve şekil 8.2’de örnek kromatogram olarak oksitetrasiklin ve tetrasiklinin 80 ppm’lik standart çözelti ile alınan kromatogramları görölmektedir. Şekil 8.1’de oksitetrasiklinin alıkonma süresi 8,3 dakika iken Şekil 8.2’de tetrasikline ait alıkonma süresi 9,2 dakika olarak tespit edildi.



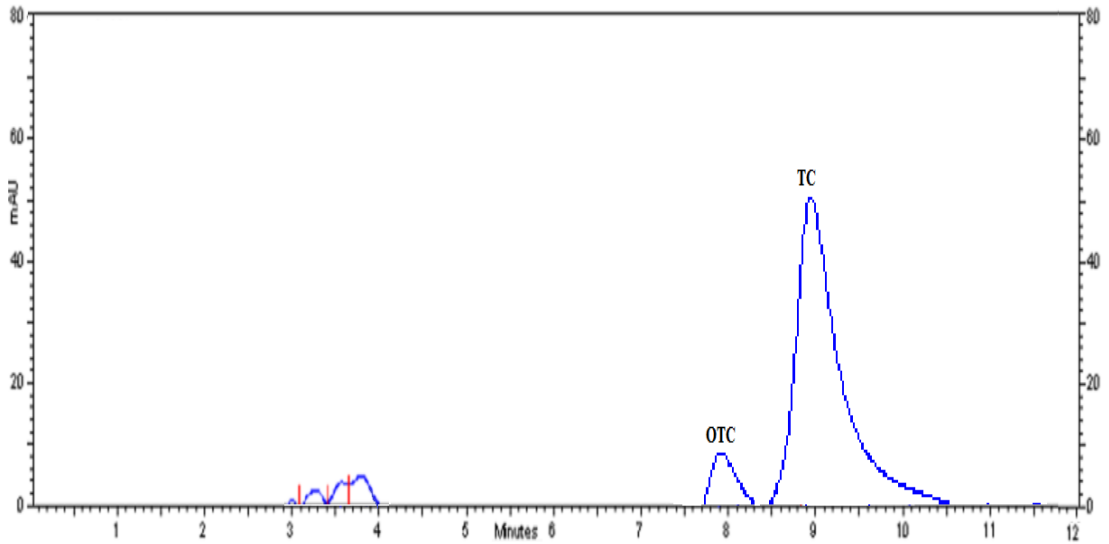
Şekil 8.1: 80 ppm oksitetrasiklin standart çözeltisine ait kromatogram



Şekil 8.2: 80 ppm tetrasiklin standart çözeltisine ait kromatogram

Tavuk örneklerindeki TC ve OTC antibiyotik kalıntılarını saptamak için iki ekstraksiyon prosedürü denendi. Birinci prosedürde tampon olarak sitrat tamponu, ikinci yöntemde ise mcllvaine tamponu kullanıldı. Yapılan deneylerde pH'sı 4 olan mcllvaine tamponunun daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlendi. Tampon çözeltisiyle alınan örnekler santrifüjlendikten sonra katı faz ekstraksiyonu ile zenginleştirildi. Katı faz ekstraksiyonu yönteminde kullanılacak çözücülere karar verildi.

Katı faz ekstraksiyonunu tercih etmemizin nedeni, literatürlerde belirtildiği üzere klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine göre 2/3 daha hızlı sonuç vermesi ve örnek hazırlama sürecinin oldukça kısalmasını sağlaması, geri kazanım (recovery) oranının yüksek olmasıdır. Katı faz ekstraksiyonu ile istenilen yoğunlukta örnekler elde edilebilmektedir. Düşük miktarda örnek işlendiğinden sıvı-sıvı ekstraksiyondaki gibi emülsiyon oluşma problemi yoktur. Tetrasiklin grubu antibiyotikler, amfoterik ilaçlar olduğu için biyolojik matrislerden uzaklaştırmak zor olmaktadır. Bunun üstesinden gelebilmek için metanolik okzalik asit kullanıldı. Ekstraksiyon bitiminde elde ettiğimiz çözeltiden çözücüü uzaklaştırıp, katı madde metanolle çözülerek HPLC ile analiz edildi. Kalibrasyon grafikleri kullanılarak tavuklarda bulunan kalıntı miktarları hesaplandı. Şekil 8.3'de F örneğine ait kromatogram görülmektedir.



Şekil 8.3 : Tavuk örneğine ait kromatogram

Şeki 8.3'de görüldüğü üzere F örneğinde OTC ve TC antibiyotik kalıntılarına rastlanıldı. Diğer pikler ise mobil fazdan gelen ve aranılan antibiyotik kalıntısıyla ilgili olmayan piklerdir.

İstanbul'dan çeşitli marketlerden alınan 8 farklı marka ve 1 köy tavuğu (Ormanlı köyü/Çatalca) analizlendi ve 4 tavuk örneğinde tetrasiklin kalıntısına, 3 tavuk örneğinde de oksitetrasiklin kalıntısına rastlanılmadı. C markalı örnekde ve köy tavuğunda kalıntıya rastlanılmadı. 9 farklı marka tavuğun örnek analizleri, 3 kere tekrarlanıp her bir antibiyotik için standart sapma hesaplandı. Tavuk örneklerinde tayin edilen tetrasiklin ve oksitetrasiklin miktarları şöyledir;

A örneğinde; $116,4 \pm 0,4$ µg OTC, $56,6 \pm 0,3$ µg TC

B örneğinde; $19,5 \pm 0,5$ µg OTC, $10,6 \pm 0,4$ µg TC

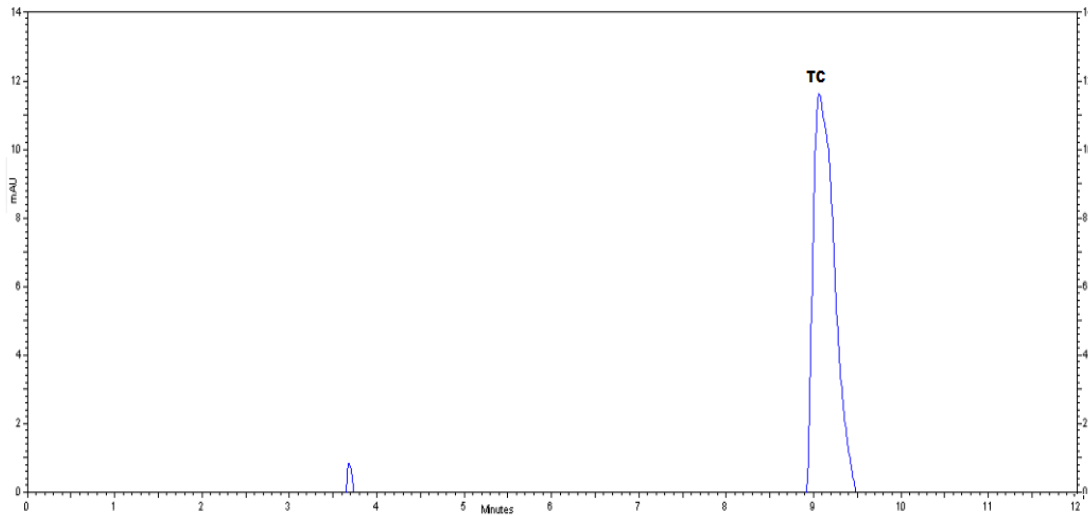
D örneğinde; $6,2 \pm 0,2$ µg OTC

E örneğinde; $4,1 \pm 0,1$ µg TC

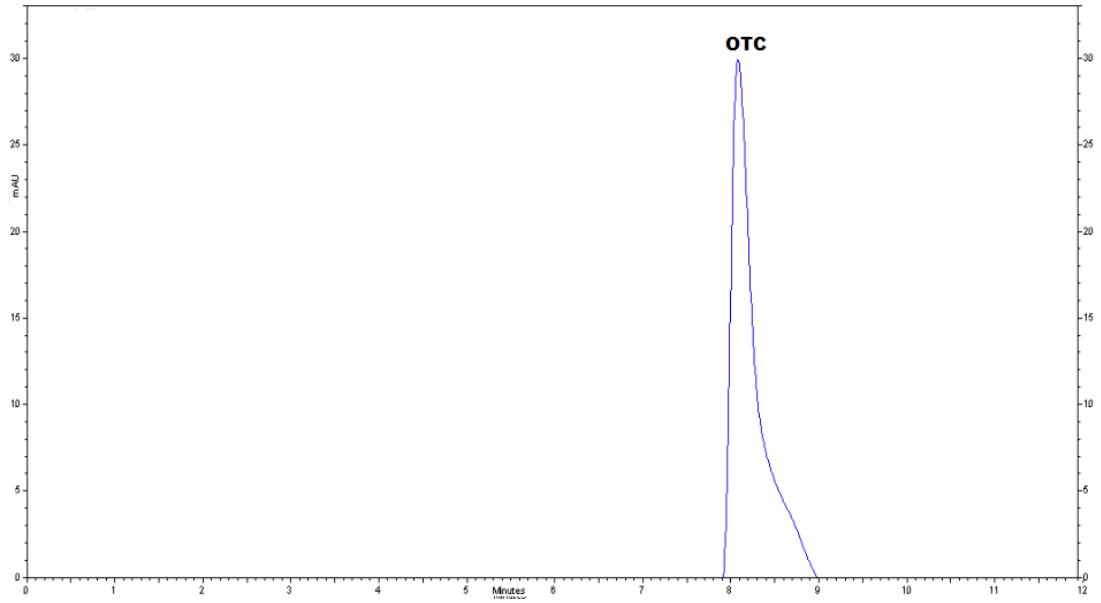
F örneğinde; $0,8 \pm 0,2$ µg OTC, $14,8 \pm 0,6$ µg TC

I örneğinde; $8,7 \pm 0,6$ µg OTC

A örneğinde bulunan oksitetrasiklin miktarının maksimum kalıntı miktarının (MRL) üzerinde olduğu, tetrasiklin miktarının ise MRL'ne yakın olduğu tespit edildi. Diğer örneklerde bulunan miktarın ise MRL'nin altında olduğu bulunmuştur. Metodun doğruluğundan emin olabilmek için; tavuk örneklerine 20, 40, 80 ppm tetrasiklin grubu antibiyotik standartlarından eklenip geri kazanım oranları elde edildi. Şekil 8.4'de 20 ppm tetrasiklin standartı eklenen tavuk örneğine ait kromatogram, şekil 8.5'de oksitetrasiklin eklenen tavuk örneğine ait kromatogram görülmektedir.



Şekil 8.4 : 20 ppm TC katkılı tavuk örneğine ait kromatogram

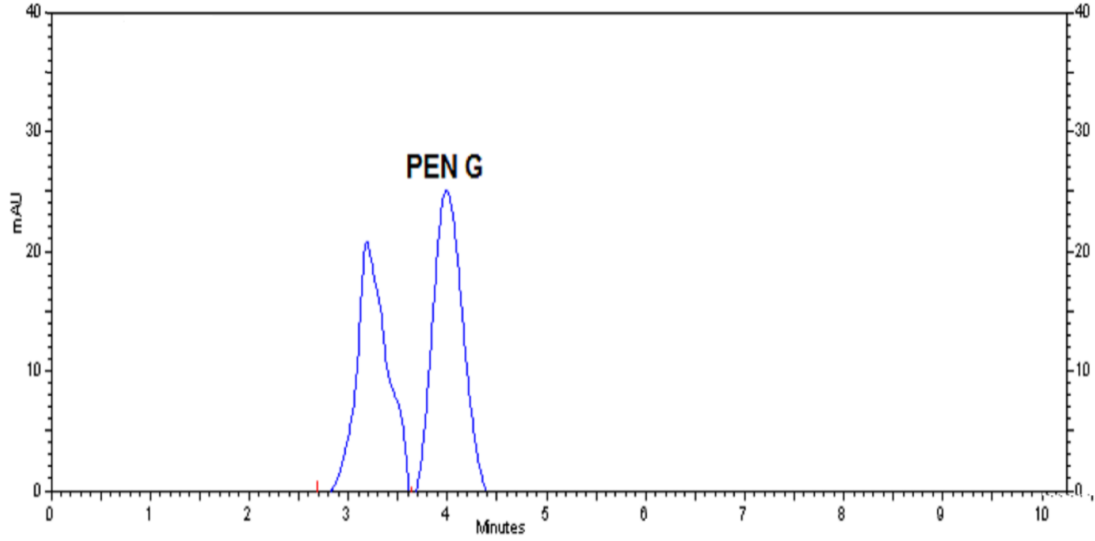


Şekil 8.5: 20 ppm OTC katkılı tavuk örneğine ait kromatogram

Tavuklarda en sık rastlanan diğer bir antibiyotik olan penisilin G analizlerinde tetrasiklin grubu antibiyotikler için geliştirilen yöntem uyguladığında kromatogramda hiç bir pik gözlemlenmedi. Bu nedenle Penisilin G analizi için farklı yöntemler denendi. İlk olarak 0,01 M amonyum asetat ve asetonitril çözeltileri kullanıldı. Pikler yarıklı geldi ve artan derişime rağmen istenilen pik alanları elde edilemedi. Daha sonra su ile hazırlanan % 0,1'lik formik asit ve asetonitril ile hazırlanan % 0,1'lik formik asit çözeltileri denendi ve hiçbir pik elde edilemedi. Aynı tetrasiklin gibi penisiline de isokratik program uygulandığında piklerin yarıklı çıkması ve alıkonma sürelerinde belirsizlik nedeniyle gradient program uygulandı. Çeşitli çözücü karışımları ile farklı pH değerlerinde birçok mobil faz değiştirilerek kullanıldı. Yapılan deneyler sonucu penisilin G için farklı bir yöntem geliştirildi. Son olarak % 50 KH₂PO₄ ve % 50 ACN çözeltileri mobil faz olarak denendi ve beklenen piklerin düzgünlüğü ve alıkonma zamanlarındaki tutarlılığından dolayı bu mobil fazların kullanımına karar verildi.

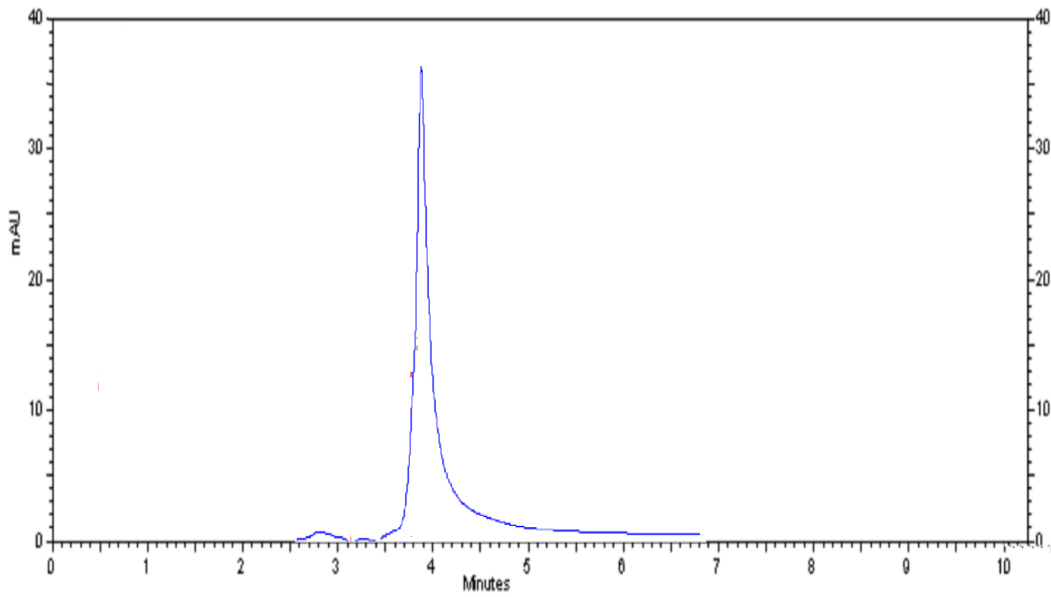
Pen G antibiyotiği için belirlenen yöntemde kullanılması gereken mobil faza karar verilmesinden sonra 10, 20, 40, 80, 160 ppm standart çözeltileri ile kromatogramlar alındı. Penisilin G kalibrasyon grafiği tetrasiklin grubunda olduğu gibi pik alanına karşı antibiyotik miktarları alınarak çizildi. Elde edilen çalışma doğruları 10-160 ppm aralığında lineer olup, denklemi $y=273494x-11155$ ($R^2=1$) olarak bulundu

Şekil 8.6’da 80 ppm penisilin G standart çözeltisine ait kromatogram elde edildi. Alıkonma zamanı 3,9 olan pik penisilin G antibiyotiğine aittir. Diğer pik ise mobil fazdan kaynaklan önemsiz bir pik olarak belirlendi.



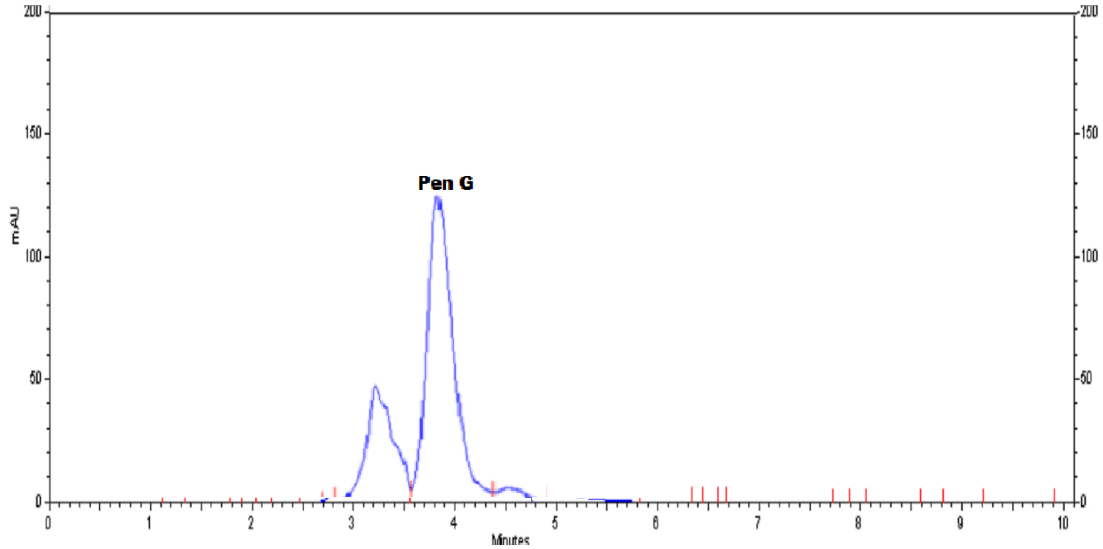
Şekil 8.6: 80 ppm Penisilin G standart çözeltisine ait kromatogram

Penisilin G kalıntılarının ekstraksiyonu için çeşitli çözücüler denendi. Yapılan analizler sonucunda fosfat tamponu kullanılarak elde edilen kromatogramlardaki piklerin düzgünlüğünden dolayı bu tamponun kullanımına karar verildi. Tavuk örnekleri, katı faz ile zenginleştirildikten sonra HPLC ile analiz edildi. Şekil 8.7’de F örneğine ait Pen G kalıntısı görülmektedir.



Şekil 8.7: Penisilin G kalıntısı saptanan tavuk örneğine ait kromatogram.

Penisin G antibiyotiği için geri kazanım oranı, tavuk örneklerine 20, 40, 80 ppm pen g standartı eklenerek hesaplandı. Şekil 8.8’de 20 ppm Penisilin G eklenen tavuk örneğine ait kromatogram elde edildi.



Şekil 8.8 : 20 ppm Pen G katkılı tavuk örneğine ait kromatogram

Tavuk örneklerinde belirlenen penisilin antibiyotik miktarları ve standart sapması;

A örneğinde; $2,34 \pm 0,2$ μg Pen G

E örneğinde; $1,74 \pm 0,1$ μg Pen G

F örneğinde; $38,0 \pm 0,5$ μg Pen G

G örneğinde; $28,4 \pm 0,4$ μg Pen G

Yapılan deneyler sonucunda, F örneği maksimum kalıntı limitine yakın bulundu. 9 tavuk örneğinden bir tanesi olan köy tavuğunda, analiz sonucunda hiçbir antibiyotik kalıntısına rastlanılmadı.

Bu sonuçtan yola çıkarak köy tavuklarının bir kısmında da olsa büyütme faktörü olarak antibiyotik kullanılmadığını söylemek doğru olarak kabul edilebilir. Tavukların normal sürede gelişim gösterdikten sonra kesim işlemine geçildiğini söyleyebiliriz. Diğer yandan köy tavuğu ve marketlerden aldığımız tavuklar ile analiz yapıldığında tavuk dokularındaki renk farklılığı da bunun bir göstergesidir. Tavuk örneklerinde yaptığımız çalışmada aslında yediğimiz hayvansal gıdaların ne kadar tehlikeye yol açacağı bulunan kalıntı değerleriyle ispatlandı.

Bu yaptığımız çalışmayla birlikte, seçtiğimiz ve incelediğimiz antibiyotik gruplarının analizleri sonucunda, tavuk örneklerinde bulunan kalıntı miktarlarıyla maksimum kalıntı seviyeleri arasında karşılaştırma yapıldı. Bazı antibiyotikler, MRL değerlerinin üstünde çıkarken, bazıları bu değere yakın bazıları ise bu değerin aşağısında sonuç verdi.

Bu çalışmada gösteriyor ki hayvansal gıda üreticilerinin bazıları sadece tedavi amacıyla bu ilaçları hayvanlara vermemektedir. Bu ihmalkâr davranış yüzünden tavukların dokularında biriken antibiyotik kalıntıları, bu gıdaları tüketen canlılara geçmektedir ve hayatlarını tehdit etmektedir.

Aslında ülkemizde tavuklarda tedavi amaçlı antibiyotik kullanılması sorun olarak görülmemektedir ama bu miktarın belirlenen düzeyden fazla verilmesi ve verildikten sonra kesim süresine uyulmadan kesilmesi önemli bir sorundur. Burda ki ana sorun tavuk gibi kümes hayvanlarının antibiyotiği aldıktan sonra vücudundan atılmasını beklemeden kesilmesidir. Çünkü üreticilerin asıl düşündüğü tedavi amaçlı olmadan, antibiyotiği fazla vererek tavuklarda aşırı ve sağlıksız bir şekilde kas oluşturmaktır. Böylece bu hayvanlar olduklarından daha iri gösterilerek tüketicilere sunulmaktadır. Normal olarak bir kümes hayvanına antibiyotik verildiği zaman en az 10 gün beklenmelidir. Çünkü bu canlıların verilen antibiyotikleri daha sindirip dışarı atmadan kesmektedirler.

Sonuç olarak, bu çalışmada tavuk etinde HPLC yöntemiyle tetrasiklin, oksitetrasiklin ve pen G antibiyotik kalıntı miktarlarının belirlenmesi için hızlı ve kolay bir yöntem geliştirildi. Dolayısıyla, uzun vadede tavuk etlerinde kalıntı miktarlarının güvenilir ve hızlı bir yöntem kullanarak belirlenmesi ile üreticilerin ve tüketicilerin gıdalar hakkında daha bilinçli hale getirilmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Akalın HE.** (1994).Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal ilaçlar
- Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O,Yaylı G.** (2004) KLİMİK Derg; 17(1): 47-9.
- Akkan Hasan Altan, Mehmet Karaca** (2003).Veteriner İç Hastalıklarında Antibiyotiklerin Kullanımı, YYÜ Vet Fak Derg. , 14 (2):72-77
- Akkan, A.Gökhan.** (1997). İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Simpozyumu, İstanbul, s. 53-62
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR.** (1999). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. Livestock Product. Sci. , 59, 183-198.
- Başoğlu, A.** (2000). Veteriner İç Hastalıklarında Genel Tedavi. Selçuk Üniv. Basımevi, Konya. 109-160.
- Baydan E, Filazi A, Kum C, Sekkin S.** (2000). Etlik piliçlerde pişirme ve dondurma işlemlerinin ilaç kalıntıları üzerine etkileri: Enrofloksasin üzerine pişirme ve farklı sürelerde soğukta depolamanın etkisi. Türk Vet. Hek.Derg. , 71, 19-22.
- Botsoglou N.A. , Fletouris D.J.** (2001). Drug Residues in Foods, Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Marcel Dekker, New York
- Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F.** (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. Clinic. Microbiol. Rev., 16, 175 -188.
- Casewell M, Friis C, Marco E, Mc Mullin P, Phillips I** (2003): The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. J. Antimicrob. Chemother., 52, 159-161.
- Chen-Hao Zhai and Yun Zou.**(2008). Determination of tetracyclines in chicken by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. Agilent technologies october food safety John Wiley and Sons.
- Davies JE** (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. Ciba Found. Symp. 207: 15-35
- De Ruyck H, De Ridder H, Vanrenterghem R, Vanwambeke F.** (1999). Validation of HPLC method of analysis of tetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to a feeding trial. Food Addit. Contam.16, 47-56.
- Demir Can** (2010). Veteriner gıda hijyenistleri derneği başkanı, hayvansal gıdalardaki antibiyotik ve hormon kalıntılarının insan sağlığı üzerine olası etkileri ve yasal düzenlemeler.

- Dökmeci, İ. , Akçasu, A., Banoğlu, N., Berkarda, Ş., ve ark. (1992).** Farmakoloji. İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar., Nobel Tıp Kitabevleri.. s.705-785.
- Ergün, A., YALÇIN, S. ve SAÇAK, P., (2000).** Broyler Rasyonlarında Probiyotik Ve Zinc Bacitracin Kullanımı, Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 47,271 - 280.
- F. Cetinkayaa, A. Yibara, G.E. Soyutemiz, B. Okutan, A. Ozcan and M.Y. Karaca (2012).** Determination of tetracycline residues in chicken meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Additives and Contaminants: Part B Vol. 5, No. 1, March 2012, 45–49
- Farahmand Salehzadeh, Aref Salehzadeh, Nordehr Rokni, Rahim Madani, Faniba Golchinefar. (2006).** Enrofloxacin residues in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. Pakistan Journal of Nutrition 6(4):409-413
- Fischer, L.J. ; Thulin, A.J.; Zabik, M.E.; Booren, A.M.; Poppenga, R.H.; Chapman, K.J. (Sep 1992).** Sulfamethazine and its metabolites in pork: Effects of cooking and gastrointestinal absorption of residues. Journal of agricultural and food chemistry 40(9).
- Gustafson RH, Bowen RE (1997):** Antibiotic use in animal agriculture. J. Appl. Microbiol. , **83**, 531-541.
- Güley, Z., Akbulut, N.(2000).** Antimikrobiyal Maddeler ve Süt Teknolojisindeki önemi. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebligler Kitabı.254-265
- Hasan Altan AKKAN, Mehmet KARACA YYÜ Vet Fak Derg 2003, 14 (2):72-77**
- İnal, T. (1992).** Besin Hijyeni, Hayvansal Gıdaların Sağlık Kontrolü, Final Ofset A.S. 1-30.
- Ji Young Song, Soo Jung Hu, Hyunjin Joo, Joung Boon Hwang, Mi Ok Kim, Shin Jung Kang, Dae Hyun Cho.(2011).** Determination of penicillins residues in livestock and marine products by LC/MS/MS World academy of science, Engineering and tecnology,81,809-811
- Kaya, S.,Ünsal, A. (2000):** Besinlerdeki ilaç kalıntıları ve denetimi. sf713-730 Veteriner uygulamalı farmakoloji Cilt 2. Baskı 2. Ed. Kaya, S., Pirinçci, Bilgili, A. Medisan yayınevi.Ankara.
- Kayaalp S.O.(1998).** Tıbbi Farmakoloji, 1.cilt, Hacettepe Taş Yayınları, Ankara,8.Basım, 248-254
- Kılıç, E., Köseoğlu, F. (1997).** Enstrümental Analiz İlkeleri, Birinci Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Kılınç M.Emrah.(2010).** Kromatografik sistemlerde elektrokimyasal uygulamalar, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
- Klein NC, Cunha BA. (1995).**Tetracyclines, Med Clin North Am; 79(4):789-801
- Korolkovas A. , Joseph H. Burckhalter. (1976).** Essentials of medicinal chemistry, John Wiley & Sons

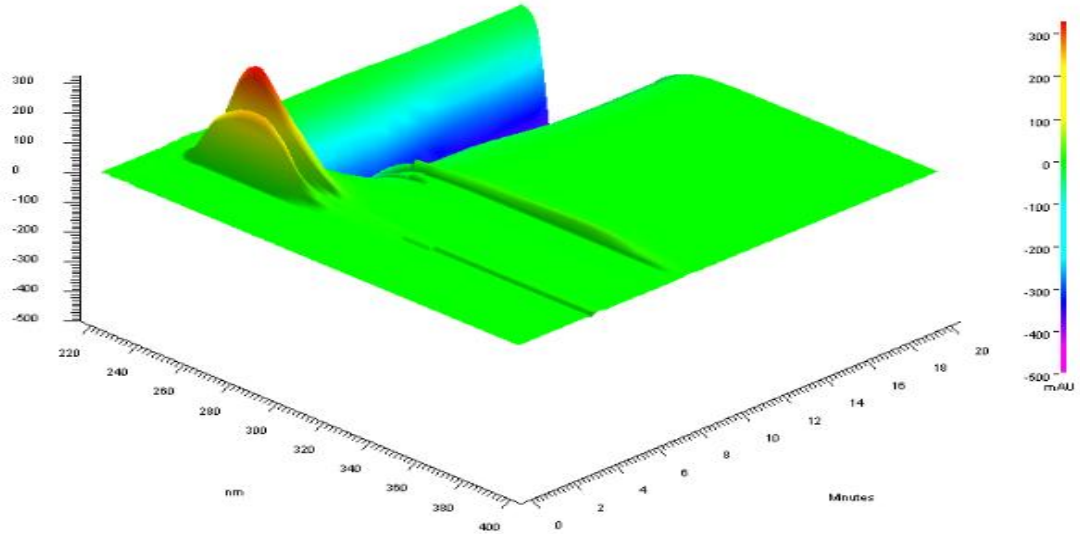
- Lou W, Ang CY. (2000).** Determination of amoxicillin residues in animal tissues by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC. Int.*, 83, 20-25.
- Macherey-Nagel (2004).** Sample Preparation, Solid Phase Extraction. In: Macherey-Nagel Catalogue: 184-241
- Mayra-Makinen, A.(1995).** Technological, significance of residues for the dairy in; Residues of antimicrobial drugs and other inhibitor in milk published by yhe I.D.F. ;137-138 Belgium
- Meyer, V.R., (1988).** Practical high performance liquid chromatography (V. Cottrell,
- Meyers B, Salvatore M (2005) :** Tetracyclines and chloramphenicol, “Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6.Basım, s.357-66, Churchill Livingstone, New York
- Mitchel, J., Gr_Ff_Ts, M.w., Mceven, S., McNab, W. B., Yee,, A:J. (1988).** Antimicrobial drug residues in milk and meat; causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance, *J Food Protect*, 61(6): 742-756
- Muriuki F. K. , W. O. Ogara, F. M. Njeruh and E. S. Mitema (2001):** Tetracycline residue levels in cattle meat from Nairobi salughter house in Kenya, *J. Vet. Sci.* (2001),G2(2), 97–101
- Myaing TT, Saleha AA. (2006).** Screening for antibiotic residues in chicken meat using four plate test. <http://www.myanmar.gov.mm/AgJurnal/ProcLF01-7.pdf>, 03.05.2013.
- Naoto Furusawa (2000).** Hplc determination of sulfadımethoxine and its hydroxy metabolites following spe of edible chicken tissues *J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL. ,* 23(9), 1413–1422
- O’Brien TF (1997).** The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin. Infect.Dis.*24(Suppl.1):S2
- Oral Öncül (2002).** Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi; s. 23-38
- Quinten Toma J. (2010).** Chromotography: Types, Techniques and Methods
- Öbekçi J. (2002).**Tavuk eti ve karaciğerlerinde tetrasiklin grubu antibiyotiklerin HPLC ile saptanması. Uzmanlık Tezi. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı.
- Önal, A.,Aydın, N., Ayaz Y., _Scan, D., Savaş, N.,(1993):** Süt ve etlerde bulunan Bazı antibiyotiklerin çeşitli yöntemlerle saptanması. *Etlik Vet Mikrobiyol Enst Derg* 7:34-51
- Özer, E. , Horoz, H. (1992).** Sütte antibiyotik Kalıntıları ve bunların Teshis metotları *Gıda dergisi* 17(3): 203-206
- Perdue BE, Standiford HC (1999) :** Tetracyclines, “Yu VL, Merigan TC, Barriere SL (eds): Antimicrobial Therapy and Vaccines” s.981, Williams and Wilkins, Baltimore
- Rolinson, G.N.(1986) :** β- lactam antibiotics, *J.Antimic, Chemother*, 17: 5.
- Rose MD, Bygrave J, Sharman M. (1999).** Effect of cooking on veterinary drug residues in food. Part 9. Nitroimidazoles. *Analyst.*,124, 289-294.

- Schnappinger D, Hillen W (1996).** Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms, Arch Microbiol; 165(6):359-69.
- Seymour R.A, Heasman P.A (1995).** Tetracyclines in the management of periodontal diseases. Journal of clinical periodontology, syf.22-35
- Shalini Joshi. (2002).**HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 28 (2002) 795–809
- Skoog D.,Holler,F:J.,Neiman,T.A.** Enstrümantal Analiz İlkeleri (5.Basım).S.739-741.Bilim Yayıncılık.
- Soussy CJ (1998).** Susceptibility testing of quinolones and links between in vitro and vivo resistance. Working paper 2.
- Şanlı, Y., Kaya, S. (1994).** Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağıtım Seçenekleri. Medisan Yayınevi, Ankara, 571-650.
- Şanlı, Y., Sarıgöl, C. (1981).** Hayvansal hesinlerdeki çeşitli artık maddelerin insan sağlığına etkileri. EU. Yet. Fak. Derg., 6(1.2): 85-101.
- Şener, S. (1990):** Veteriner Klinik Farmakoloji ve Formüller. Pethask Veteriner Hekimliği Yayınları. S. 83-91.
- Tuncer, H.İ.(2007).** Karma Yemlerde Kullanımı Yasaklanan Hormon, Antibiyotik Antikoksidial ve İlaçlar. Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg., 47(1):29-37.
- Ungemach FR (2000).** Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU-countries and interpretation. Acta Vet Scand, 93:89-98
- Ünal, P. (1992).** Tavuk eti ve karaciğerlerinde eritromisin kalıntılarının aranması,(Yüksek Lisans Tezi),. Adres: <http://www.belgeler.com/>
- Vaden, S.L. & Riviere, J.E. (2001).** Penicillins and related beta-lactam antibiotics. In Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Ed. Adams, H.R., pp. 818–827. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Van Egmond HJ, Nouws JFM, Schilt R, Van Lankveld-Driessen WDM, Streutjens-Van Neer EPM (2000).** Stability of antibiotics in meat during a simulated high temperature destruction process. http://www.euroresidue.nl/ER_IV/Contributions_A-H/Egmond_van_430-437.pdf, 02.09.2013.
- Ya-Min Kao, Mei-Hua Chang, Chieu-Chen Cheng and Shin-Shou Chou. (2001).**Multiresidue Determination of Veterinary Drugs in Chicken and Swine Muscles by High Performance Liquid ChromatographyJournal of Food and Drug Analysis, Vol. 9, No. 2, Pages 84-95
- Yang Z, Jin S, Liu W, Wang G (2003).** Determination of sulfamethazine and sulfamethoxazole in muscle of chicken by High performance liquid chromatography. Wei Sheng Yan Jiu. 32, 625-627.
- Zief M. (2005).** Solid Phase Extraction for Sample Preparation. Phillipsburg: JT Baker.

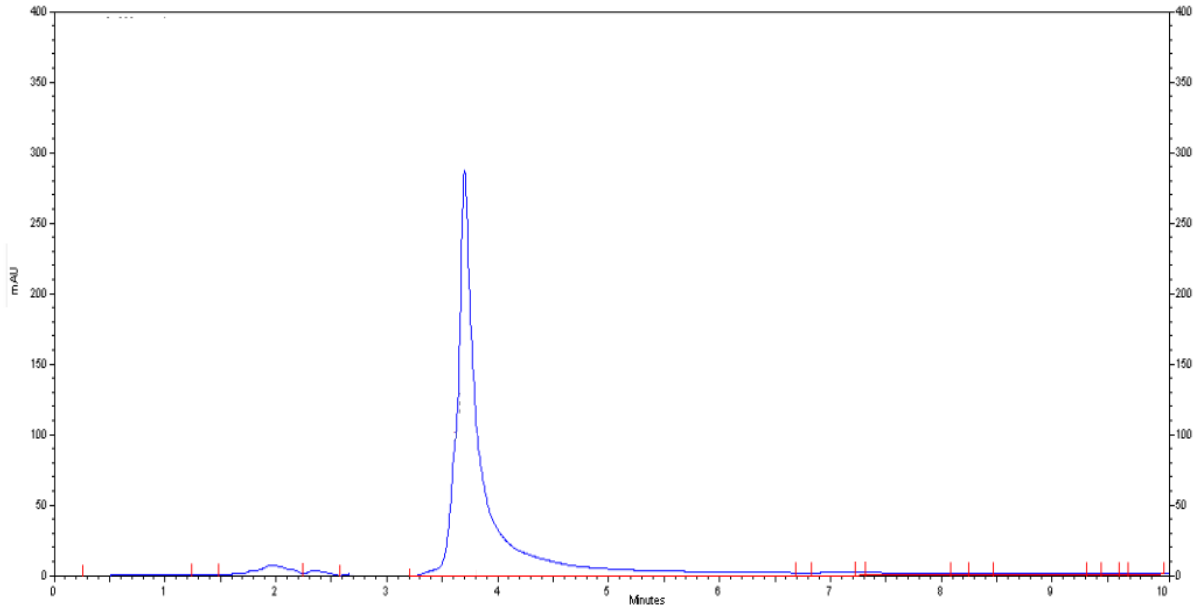
Url-1 < <http://www.provet.com.tr> com>, alındığı tarih: 08.05.2013

EKLER

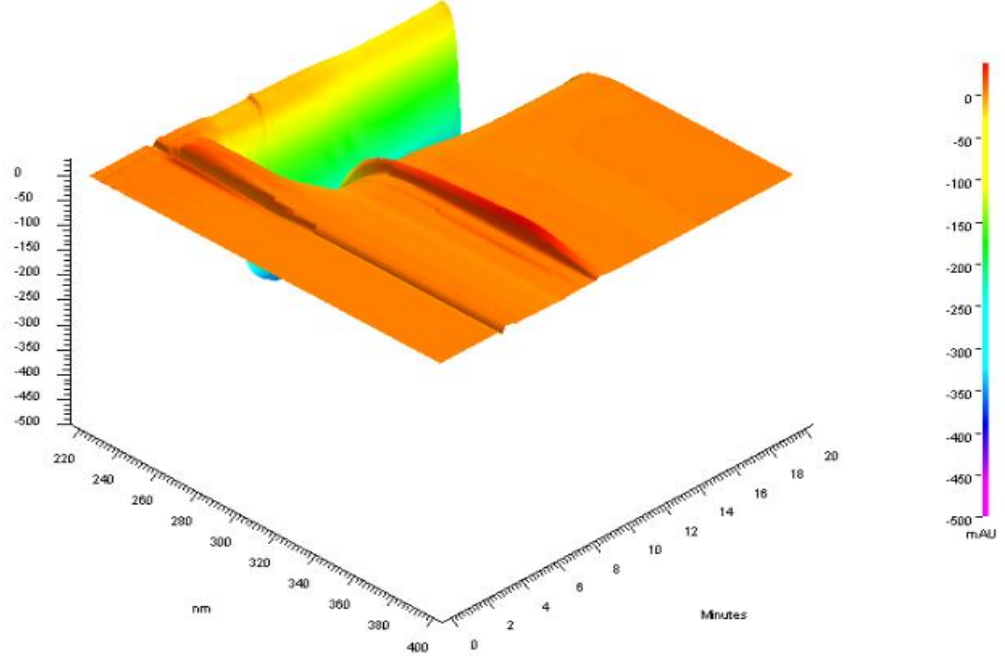
EK A: Spektrumlar ve kromatogramlar



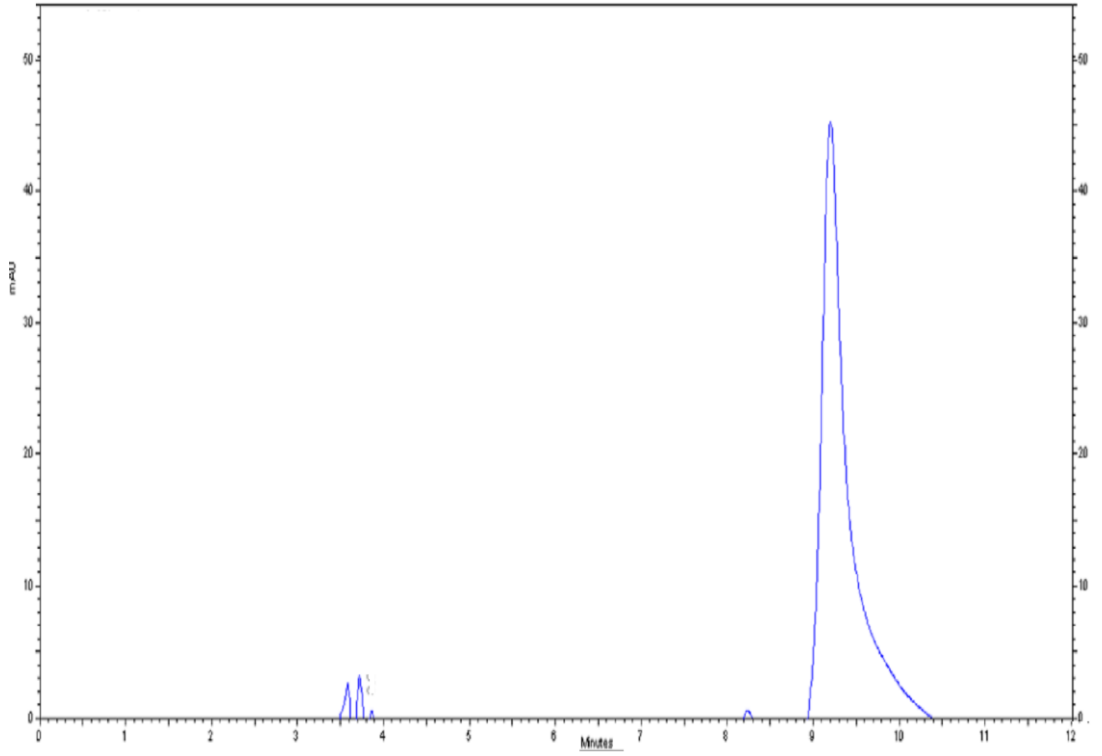
Şekil A.1: Ekler bölümünde D örneğine ait kalıntı spektrumu



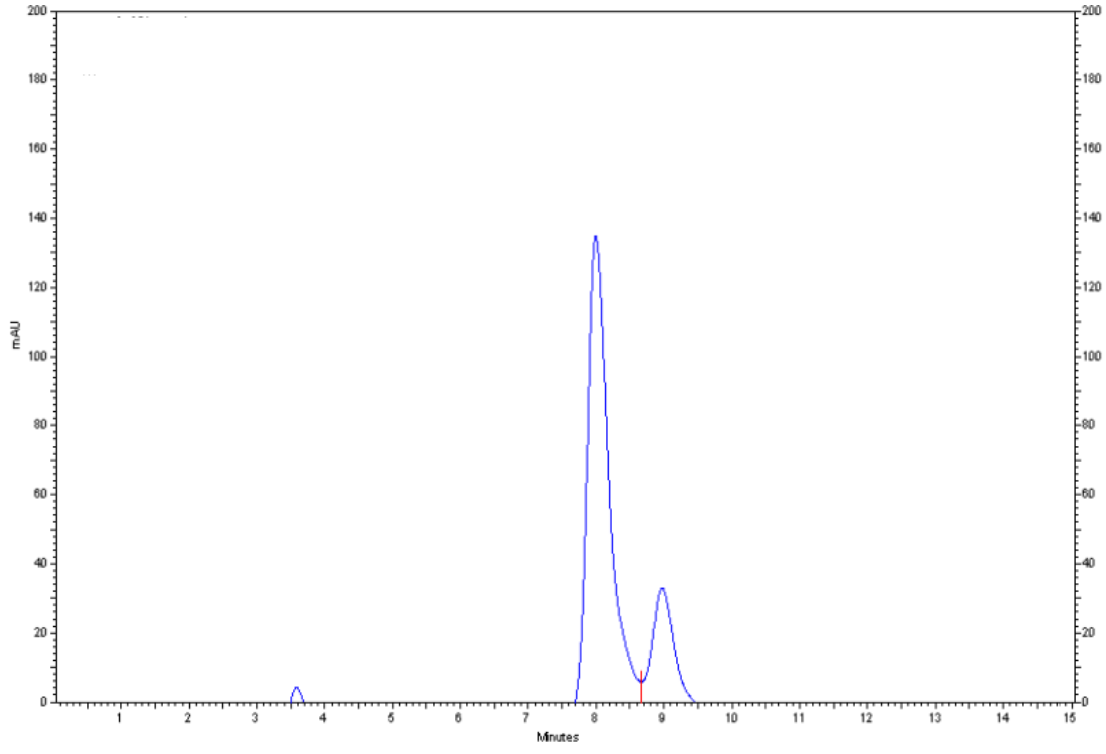
Şekil A.2: Ekler bölümünde G örneğine ait kromatogram



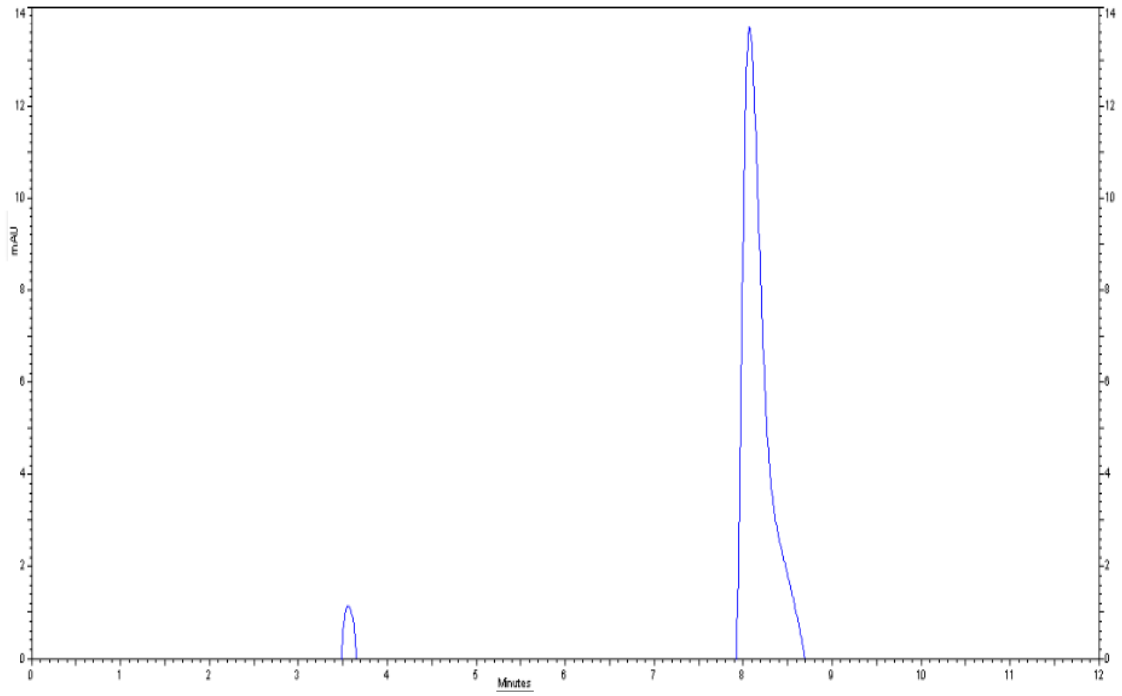
Şekil A.3: Ekler bölümünde E örneğine ait kalıntı spektrumu



Şekil A.4: Ekler bölümünde B örneğine ait kromatogram



Şekil A.5: Ekler bölümünde A örneğine ait kromatogram



Şekil A.6: Ekler bölümünde I örneğine ait kromatogram

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Tuğba Yıldız

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul / 21.12.1986

Adres: Çekmeköy / İstanbul

E-posta: yildiztugba@itu.edu.tr

Lisans: Kocaeli Üniversitesi/ Kimya Bölümü

TEZDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR

‘Determination of Tetracycline and β -lactam Residues in Chicken Meat By Hplc Method’ başlıklı tez konusu IUPAC 2013 - 44th World Chemistry Congress / 2013’ de poster sunumu için kabul almıştır.

‘Determination of Tetracycline Residues in Chicken Meat By Hplc Method’ başlıklı konu ile Barselona’da yapılan ICCE / 2013 kongresinde poster sunumu için kabul almıştır.