

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**İSTANBULDA TÜKETİME SUNULAN KANATLI DOKU VE
ÜRÜNLERİNDE İYONOFOR GRUBU ANTİKOKSİDİYAL
İLAÇLARDAN MONENSİN VE NARASİN KALINTILARININ
ARAŞTIRILMASI VE FARKLI ISI İŞLEMLERİNİN KALINTI
DÜZEYİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

HASAN HÜSEYİN ÜNAL

DANIŞMAN
PROF.DR. OYA KELEŞ

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

01 / 07 / 2008

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Farmakoloji ve Toksikoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Farmakoloji ve Toksikoloji AbD.
Tez Sahibi : H.Hüseyin ÜNAL
Tez Başlığı : İstanbulda tüketime sunulan kanatlı doku ve ürünlerinde İyonofor grubu antikoksidial ilaçlardan Monensin ve Narasin kalıntılarının araştırılması ve farklı ısı işlemlerinin kalıntı düzeyine etkisinin incelenmesi
Sınav Yeri : İ.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AbD
Sınav Tarihi : 30 / 06 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1.Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER KELEŞ (Danışman)

2.Prof. Dr. Ahmet MENGİ

3.Prof. Dr. Süleyman ŞENER

4.Prof.Dr. Z.Gülden OMURTAG

5.Doç.Dr. Murat YILDIRIM

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Naşan Hüseyin ÜNAL

İTHAF

Beni yetiştiren ve her türlü imkânlarını eğitim çalışmalarımnda sunan Annem Kadriye Unal ve Babam Mehmet ÜNAL'a, Eşim Emine, Kızım K.Ece, Oğlum Mehmet ve Oğlum M.Yusuf'a ve tüm ÜNAL ailesi mensuplarına ve manevi desteklerini esirgemeyen Büyüklerime ithaf ediyorum.

Hasan Hüseyin ÜNAL

TEŞEKKÜR

Farmakoloji - Toksikoloji A.B.Dalı Başk. ve tez danışmanım, hocam Sayın Prof.Dr. Oya KELEŞ'e desteği, ilgileri ve yardımlarından dolayı Anabilim Dalındaki hocalarım başta Prof.Dr. Süleyman ŞENER,e tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü İdarecilerine, Farmakoloji-Toksikoloji Bölümü mesai arkadaşlarıma, doktora çalışmalarında eşzamanlı mesai harcadığımız meslektaşım Namık BİLİCİ'YE, Tarpak Belediye Bşk. Hüseyin ÖTEYAKA'ya, bize imkân sağlayan CP Yem Fabrikası, Gurtav Tavukçuluk, Has Tavukçuluk, Körfez Yem Fabrikası yetkililerine, Teknik destek veren ZİVAK Ltd. Şti.,yetkililerine, bilimsel ve teknik desteklerini gördüğüm firma temsilcileri ve meslektaşlarıma, yıllarca bilimsel çalışmalarında gösterdiği anlayışı için Eşim Emine ve Çocuklarım K.Ece, Mehmet ve M.Yusuf'a teşekkürlerimi arz ederim.

Hasan Hüseyin ÜNAL

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1238

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İyonoforlar	3
2.1.1 Tanım	3
2.1.2. Kimyasal yapı	4
2.1.3. Etki şekli ve sınıfı	5
2.1.4. Karboksilik asit iyonoforların fonksiyonları:	6
2.1.5. İyonofor Antikoksidiyallerin Toksikolojik Özellikleri:	8
2.1.7. İyonofor Grubu Antikoksidiyal ajanların analiz yöntemleri	11
2.1.8. İyonofor grubu antikoksidiyallerin kalıntıları üzerine çalışmalar	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Amaç	24
3.2. Uygulama Alanı	24
3.3. Test Yöntemi.	24
3.4. Test metodunun gereçleri ve ekstraksiyonu	25
3.5. Uygulama esasları	31

3.5.1. Metot performans kontrolü ve doğrulama (konfirmasyon) çalışmaları:	31
3.5.2. İstanbul da piyasaya sunulmuş olan tavuk eti ve yumurtalarda monensin ve narasin kalıntılarının araştırılması	32
3.5.3. Yedirme deneme çalışmalarında (in vivo) broiler tavuklardan alınan doku örneklerinde kalıntı düzeylerinin tayini	33
3.5.4. Yemleme sonrası broilerlerin Kesim Programı	34
3.5.5.Monensin ilaveli, yemle beslenen tavuklar için(M Gr.)Analiz Planı	36
3.5.6. Narasin ilaveli, yemle beslenen tavuklar için(N Gr.)Analiz Planı.	37
3.5.7.Kesim İşlemleri.	37
3.5.8. Normal (işlem görmemiş çiğ) dokularda analiz için yapılan hazırlık:	38
3.5.9. Isı faktörlerinin kalıntı düzeyine etkisinin analizi için yapılan çalışmalar.	39
3.5.10. Verilerin Analizi	40
4. BULGULAR.	41
4.1. Metot konfirmasyon çalışmaları, Tarama ve doğrulama analizlerinde kullanılan metotların performans çalışmaları, spike dokularda kalıntı düzeyinin ölçülmesi.	41
4.1.1. LC-MSMS sisteminde Tarama Analizleri (Screening Test).	42
4.1.2. LC-MSMS Sisteminde Doğrulama Analizleri (Confirmation Test).	46
4.2. Piyasa araştırması için toplanan tavuk eti ve yumurta numunelerinin monensin ve narasin kalıntıları yönünden analitik sonuçları.	55
4.3. İyonofor antikoksidiyal ilaç ilaveli yemlerin yedirme denemesi çalışmalarında broiler tavuklardan alınan doku örneklerinde kalıntı düzeylerinin tayini (in vivo çalışmalar)	58
4.4. Isı faktörlerinin etkilerinin araştırılması	64
4.4.1. Monensin grubu sonuçları..	64
4.4.2. Narasin grubu sonuçları	68
4.4.3. Monensin ve Narasin kayıplarının karşılaştırılması.	73
4.4.4. İn vivo çalışmada ısı faktörlerinin etkilerinin araştırılması .	74
4.4.5. Pisirme yöntemlerine göre ısı faktörleri etkilerinin değerlendirilmesi	77
4.5. Genel değerlendirme :	80

5. TARTIŞMA	82
KAYNAKLAR	97
HAM VERİLER	76
FORMLAR ...	104
ETİK KURUL KARARI ..	105
PATENT HAKKI İZNİ	108
TELİF HAKKI İZNİ	109
ÖZGEÇMİŞ....	110

TABLÖLAR LİSTESİ

- Tablo 1: Monensinin kimyasal yapı ve özellikleri
- Tablo2: Narasinin kimyasal yapı ve özellikleri
- Tablo 3: Referans Standart - Monensin - Na, analiz sertifikası,
- Tablo 4: Referans Standart – Narasin, analiz sertifikası,
- Tablo 5: Monensin ve narasinin tarama testlerinde MS 1 kütle ve MSMS iyon değerleri
- Tablo 6: Monensin ve narasin için tarama testi parametreleri
- Tablo 7 : Monensin ve narasin için LC-MS tarama test metot performans değerleri:
- Tablo 8: LC-MSMS sisteminin özellikleri
- Tablo 9: LC-MSMS sistemi mobil faz gradient akış programı
- Tablo10: Monensin ve Narasin için doğrulama testlerinde LC-MSMS analitik parametreleri
- Tablo11: Doğrulama testlerinde Monensin ve Narasin için LC-MS kütle spektrumu ve MSMS iyon değerleri
- Tablo11: Piyasadan toplanan yumurta numuneleri kayıt formu
- Tablo12: Piyasadan toplanan tavuk eti numuneleri kayıt formu
- Tablo13: Piyasadan toplanan yumurta numuneleri kayıt
- Tablo 14: Piyasadan toplanan tavuk eti numuneleri kayıt
- Tablo:15. Spike çalışmalarında kızartma testinde monensin kalıntılarının kayıp oranı
- Tablo:16. Spike çalışmalarında haşlama testinde monensin kalıntılarının kayıp oranı
- Tablo:17. Spike çalışmalarında – 20 °C de dondurma testinde monensin kalıntılarının kayıp oranı
- Tablo: 18. Pişirme usullerine göre ısı faktörünün monensin düzeyinde kayıp oranları
- Tablo 19. Tavuk eti için pişirme usullerine göre monensin düzeyinde kayıp oranları
- Tablo:20. Spike çalışmalarında – 20 °C de dondurma testinde narasin kalıntılarının kayıp oranı
- Tablo:21 Spike çalışmalarında haşlama testinde narasin kalıntılarının kayıp oranı
- Tablo:22. Spike çalışmalarında – 20 °C de dondurma testinde narasin kalıntılarının kayıp oranı
- Tablo:23 Narasinin pişirme usullerine göre kayıpları
- Tablo:24 Tavuk etini pişirme usullerine göre ısı faktörünün etkisiyle monensin ve narasin düzeyi oranlarının karşılaştırılması
- Tablo:25 Monensin için in vivo çalışma da kızartma test sonuçları
- Tablo 26. Monensin - in vivo çalışma da haşlama testinde kayıp
- Tablo:27 Narasin için in vivo çalışma da kızartma test sonuçları
- Tablo:28 Narasin için in vivo çalışma da kızartma test sonuçları

Tablo:29 Tavuk eti için pişirme usullerine göre monensin düzeyinde kayıp oranları

Tablo:30 Tavuk eti için pişirme usullerine göre narasin düzeyinde kayıp oranları

Tablo 31: Monensin ve narasin için spike ve yedirme testlerinde alınan ortalama kayıp oranları

Tablo 32: EFSA'nın tebliği: Monensin ve Narasin için MRL değerleri(2007)

Tablo 33: AB (EMEA/CVMP) nin son monensin için yayınladığı 16 Mayıs 2007 tarihli 192126 sayılı kararları

Tablo 34: Monteban 100 ile beslenen kanatlıların dokularında narasin konsantrasyonu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Analiz öncesi numune hazırlama işlemleri

Şekil 2: Ekstraksiyon basamakları

Şekil 3: Monensin ve narasin standart maddelerinin LC MS kromatogramları.

Şekil 4: Hesaplanabilir limit (quantitation) düzeyinde spiked doku kromatogramı

Şekil 5: Spike denemelerinde kontrol grubu (blank) doku kromatogramı:

Şekil 6: Monensin-SIM spektrumu

Şekil 7: Monensin-MS spektrumu

Şekil 8: Narasin-SIM spektrumu

Şekil 9: Narasin-MS spektrumu

Şekil 10: 1 ppb düzeyinde monensin ve narasin standart çözeltilerin enjeksiyonu neticesinde alınan kromatogramlar.

Şekil 11: Monensin std. çözeltileri ile lineerite çalışması

Şekil 12: Monensin std. spike doku lineerite çalışması

Şekil 13: Narasin std. çözeltileri ile lineerite çalışması.

Şekil 14: Narasin spike-doku lineerite çalışması

Şekil 15: Monensin-Na. LC-MS kütle spektrumu ve MSMS iyon değerleri

Şekil 16: Narasinin LC-MS kütle spektrumu ve MSMS iyon değerleri

Şekil 17: İyonofor koksidiyallerden monensin ve narasine ait sim modunda bir tarama (screening chromatogram) spektrumu

Şekil 18: Negatif sonuçların alındığı tavuk kaslarına ait chromatogramlar:

Şekil 19: Negatif sonuçların alındığı yumurta dokusuna ait kromatogramlar:

Şekil 20: 1. gün kesimlerinde kas dokuda monensin kalıntılarının tespit edildiği kromatogram.

Şekil 21: 1. gün kesimlerinde karaciğer dokuda monensin kalıntılarının tespit edildiği kromatogramı.

Şekil 22: 1. gün kesimlerinde kas dokusunda narasin kalıntılarının tespit edildiği kromatogram

Şekil 23: 1. gün kesimlerinde karaciğer dokusunda tespit edilen narasin kalıntılarının kromatogram

GRAFİKLER:

Grafik 1: Monensin lineerite grafiği

Grafik 2: Narasin lineerite grafiği

Grafik 3: Monensinin confirmation test lineeritesi

Grafik 4: Narasinin confirmation test lineeritesi

Grafik 5: Monensinle beslenen tavukların 1,3,5 ve 7. günlerde kas ve karaciğerde dokusunda

monensin düzeyinin değişimi

Grafik 6: Kesim öncesi bekleme süresini temsilen 1,3,5 ve 7.günlerde kesimi yapılan tavukların karaciğer dokularında ortalama monensin düzeyleri.

Grafik 7: Kesim öncesi bekleme süresini temsilen 1,3,5 ve 7.günlerde kesimi yapılan tavukların kas dokularında monensin düzeyleri.

Grafik 8: Narasinle beslenen tavukların 1,3,5 ve 7. günlerde kas ve karaciğerde dokusunda narasin düzeyinin değişimi.

Grafik 9: Kesim öncesi bekleme süresini temsilen 1,3,5 ve 7.günlerde kesimi yapılan tavukların karaciger dokularında narasin düzeyleri.

Grafik 10: Kesim öncesi bekleme süresini temsilen 1,3,5 ve 7.günlerde kesimi yapılan tavukların kas dokularında narasin düzeyleri.

Grafik 11: Isı faktörlerinin etkisiyle pişirme usullerine göre kızartma et, haşlama et, haşlama et ve suyu ve dondurulmuş et örneklerindeki monensin kayıplarının kıyaslanması.

Grafik 12: Isı faktörlerinin etkisinin kıyaslanması, pişirme usullerine göre kızartma et, haşlama et, ve dondurulmuş et örneklerindeki monensin kayıpları.

Grafik 13: Isı faktörlerinin etkisiyle pişirme usullerine göre kızartma et, haşlama et, haşlama et ve suyu ve dondurulmuş et örneklerindeki monensin kayıplarının kıyaslanması.

Grafik 14: Isı faktörlerinin etkisinin kıyaslanması, pişirme usullerine göre kızartma et, haşlama et, ve dondurulmuş et örneklerindeki narasin kayıpları.

Grafik 15: Tavuk etini pişirme işleminde ısı faktörünün etkisiyle monensin ve narasin düzeylerindeki kayıp oranlarının karşılaştırılması.

Grafik 16. Tavuk eti için pişirme usullerine göre monensin düzeyinde kayıp oranları

Grafik 17: Tavuk eti için pişirme usullerine göre narasin düzeyinde kayıp oranları

Grafik 18: Tavuk etinde ısı faktörlerinin etkileri spike ve yedirme testlerinde alınan kayıp oranlarının kıyaslanması.

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AB:	Avrupa Birliği
ADI:	Acceptable Daily Intake
AFSSA:	Agency Français de Securite Sanitaire des Aliments
ALARA:	As Low As Reasonably Achivable
ANADA:	Abbreviated New Drug Application
AST:	Aspartat amino transferaz
ATP:	Adenozin trifosfat
AFSSA:	Agency Français de Securite Sanitaire des Aliments
BVL:	Berlin Veterinary Laboratory
C.A. :	Canlı Ağırlık
CC α :	Decision limit
CC β :	Detection capability
CPK :	Kreatin fosfokinaz
DAL:	Differential Action Limit
EC:	European Community
EFSA:	European Food Safety Authority
EMA:	European Medicines Agency
FAO:	Food And Drug Administration
Hb:	Hemoglobin
HFG:	Halofuginon
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA:	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LC-MS:	Liquid Chromatography- Mass Spectrometry
LC-MSMS:	Liquid Chromatography- Mass Spectrometry-Mass Spectrometry
LDH:	Laktat dehidrojenaz
LOD :	Definitions of limit of detection
LOQ :	Limit of quantification
MRL:	Maximum Residue Limit
OIE:	Office Internationale des Epizooties
PEC:	Predicted Environmental Concentration
PNEC:	Predicted No Effect Concentration
ppm:	mg/kg Parts per <u>million</u> ('ppm'). 1 miligram / kilogram. (1 x 10 ⁶).
ppb:	ug/kg Parts per <u>billion</u> ('ppb'). 1 miligram / ton. (1 x10 ⁹)

ppt: ng/kg Parts per trillion ('ppt'). 1 miligram / kilotone. (1×10^{-12})

PVKAE: Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼

TKB: Tarım ve K¼y¼řleri Bakanlığı

VMD: Veterinary Medicines Directorate (Veteriner Sağlık Ür¼nleri İdaresi)

VPC: Veterinary Product Committe (Veteriner Ür¼nleri Komitesi)

ÖZET

Ünal, H.H., (2008). İstanbulda tüketime sunulan kanatlı doku ve ürünlerinde iyonofor grubu antikoksidial ilaçlardan Monensin ve Narasin kalıntılarının araştırılması ve farklı ısı işlemlerinin kalıntı düzeyine etkisinin incelenmesi.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi. İstanbul.

İyonofor grubu antikoksidial ilaçlar kanatlı yetiştiricilik sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer yandan yasak olmasına rağmen yumurta tavuğu yetiştiricilerince de illegal veya kural dışı olarak kullanılabilir.

Bu proje çalışmasında, insan tüketimine sunulduğu son nokta olan marketlerden alınan tavuk eti ve yumurtasında monensin ve narasin kalıntılarını ve ısı faktörlerinin kalıntı seviyesi üzerine etkisi araştırıldı. Piyasa araştırması sonucunda tavuk eti ve yumurta örneklerinin hiç birinde monensin ve narasin kalıntılarına rastlanılmadı.

Broiler tavuk yemlerine monensin ve narasin ilave edilerek 10 gün süreyle beslendi ve sonrasında 1,3,5 ve 7. sonrasında kesime sevk edilerek önce dokulardaki kalıntı düzeyi ölçüldü. Dokulardaki kalıntı seviyesinde oluşabilecek değişimleri incelendi. Kesim sırasına göre zamana bağlı olarak ilk gün hızlı bir azalma gözlemlendi.

Isı faktörleri ve pişirme usullerinin etkisi konusunda in vivo ve spike uygulamalarda monensin ve narasin kalıntılarında azalma tespit edildi ve ısı faktörlerinin kalıntı düzeyinin azalmasında pozitif etkisi görüldü.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1238

Anahtar Kelimeler: monensin, narasin, kalıntı düzeyi, kanatlı eti ve yumurta, ısı faktörü

ABSTRACT

Unal, H.H., (2008), Research of monensin and narasin residues which are member of ionophore group anticoccidial drugs and effects of different heat factor on the residue levels in poultry tissues and products for human consumption in Istanbul.

Istanbul University, Institute of Health Science, Pharmacology & Toxicology Department, Doctorate thesis. Istanbul.

Ionophore group coccidiostats have been using widely by poultry breeder sectors. Although banned to use from eggs-poultry breeding farm can be used illegal and except of rural.

In this study, monensin and narasin residues were researched on the last marketing points for human consumption and efficient of heat factor on the residue levels factor on the poultry meat. No found positive result for monensin and narasin residue on the meat and eggs in the marketing controlled.

On the other hand, broiler type poultry groups are feeded during 10 days with monensin and narasin containing feeding. After 10 days, two groups send to slaughter respectively as definite time that 1,3,5 and 7. days and analysed to residue levels on the poultry tissues. Depend on slaughter sequence during first day, monensin and narasin residue levels were fall down rapidly poultry tissue.

Also in vivo and spike application studies identified that the residue level decreased depend on heat factors efficient and cooking transactions, so heat factor were effected to residue level decline as positive

In this study was supported by the Scientific Research Projects Department of Istanbul University.
Project no: 1238

KEY WORDS: monensin, narasin, residue level, poultry meat and eggs, heat factor

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanatlı yetiştiriciliğinde koksidiyoz hastalığının tedavisinde ve profilaksisinde İyonofor grubu antikoksidiyal ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda azot retensiyonuna sebep olarak gelişmeyi hızlandırıcı ve verim arttırıcı etkisi nedeniyle de kanatlı ve ruminantlarda tüm dünyada yaygın olarak uygulanmaktadır (1,2,4,28,32,). Yumurta tavukçuluğunda ise kalıntı sorunu nedeniyle kullanımı yasak olmasına karşın yumurtlama öncesi dönemde koksidiyoza karşı bağışıklığı sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (4,7,8,9,32,34).

Koruyucu amaçla ilaç kullanımı veya yasal olmayan usul ve koşullarda kanatlı sektöründe kullanılması ihtimali nedeniyle insanların tüketimine sunulan kanatlı doku ve ürünlerinde polieter iyonofor grubundan monensin ve narasin kalıntılarının izlenmesi, kanatlılarda yasal arınma süreleri, doku ve ürünlerde kalıntı düzeyleri ile bu kalıntının sofraya taşınması durumunda günlük alınabilecek en yüksek kalıntı limitleri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde önemle üzerinde durulan konulardan biri haline gelmiştir. (2,4,32,33,48)

Ülkemizde de veteriner ilaç kalıntılarının izlenmesi amacıyla ulusal kalıntı izleme planı doğrultusunda, gıda üretimi yapılan işletmelerden ilk çıkış noktasında rutin denetim kontrol çalışmaları devam etmektedir (3,4). Ancak bu kalıntıları etkileyen parametreler üzerinde pek fazla çalışmaya rastlanılmamaktadır. Numunelerin alınması usul ve kaideleri, numunelerin analiz öncesi uygun şartlarda muhafazası, zamana bağlı olarak etkileşimlerin izlenebilmesi kalıntı analizlerini etkileyen önemli parametrelerdir. Gelişen teknolojik imkanlar hayvansal gıdalardaki çok düşük düzeylerde ilaç kalıntılarını dahi tespit edebilir duruma getirmiştir. Bir kısım ilaç kalıntılarının kabul edilebilir günlük alım (tolerans) limitlerinin düşük olması, kullanımının yasak olması veya müsaade edilmiş olmakla beraber maksimum rezidü limit (MRL) verilmiş olması gıda güvenliğinde izlenebilirlik için önemli kriterlerdir. Tüketim öncesi saklama koşullarına uyulması, tüketim alışkanlıklarına göre pişirme usullerine göre hayvansal gıdalardaki olası kalıntıların nasıl etkilendiği gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.

Kanatlı eti tüketiminin yoğun olduğu ülkemizde antikoksidiyal ilaçlardan karboksilik iyonofor grubu bileşikler, yemlere katılarak kanatlıların beslenmesinde

kullanılmaktadır. İyonofor grubu bileşiklerin kullanım şekli, dozu ve kesim öncesi bekleme süresine uyulması, kanatlı doku ve ürünlerdeki kalıntı miktarı ile doğrudan ilişkili olmakta ve bu da halk sağlığı açısından son derece önemlidir (5,6,7,8,31,33,34).

İyonofor antikoksidiyal ilaç kalıntılarının izlenmesi Ülkemiz referans laboratuvarlarınca yapılmaya çalışılmaktadır. Ülke genelinde Bakanlık taşra teşkilatında görevli elemanlarca alınan numuneler referans laboratuvarlara gönderilmektedir. Ancak bu çalışmalarda büyük işletmelerin

kesimhanelerinden belirli bir ürün miktarını temsilen örnekleme usulüyle numuneler incelenmektedir(4,10,13,14). Bu numunelerin gerçekten insanların tüketimi amacıyla piyasaya sunulan ürünleri temsil edip etmediği, en son satış noktalarından alınacak numunelerin kontrolüyle ve bu numunelerin saklama ve analiz şartlarının irdelenmesiyle ortaya konabilir(11,12, 15).

Hayvansal gıdalarda veteriner ilaç kalıntıları üzerine ısı faktörlerinin etkilerini inceleyen çok sayıda araştırma yapılmış olmakla birlikte iyonofor grubu antikoksidiyaller hakkında bilimsel yayına rastlanılmamıştır (17,18,24,49,50,51,57).

İyonofor grubu antikoksidiyal ilaçlardan monensin ve narasin kalıntılarının, dokulardaki düzeyleri üzerine ısı faktörünün etkisini belirlenmesi çalışmamızda, özellikle farklı pişirme teknik ve usullerine sahip geleneksel mutfak kültürümüz açısından ele alınmaktadır. Tüketime sunulan gıdalardaki olası kalıntıların etkilenip etkilenmediği hususunda önemli bilimsel verilere ulaşılması beklenmektedir.

Bu çalışmamızda yukarıda belirtilen temel hususların rehberliğinde, önce İstanbul'da tüketimine sunulan kanatlı dokularında ve yumurtasında iyonofor antikoksidiyal ilaç kalıntılarının araştırılması, sonra broylerler klasik beslenme programına uygun olarak, monensin ve narasin ilaveli yemlerle beslenmesi ve son olarak da besi sonrası dokulardaki kalıntı düzeyinin ölçümü ve ısı işlemlerinin etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. İyonoforlar

2.1.1.Tanım:

İyonofor grubu antikoksidial ajanlar, streptomyces türü mikroorganizmalardan elde edilirler. Monensin bu grubun ilk üyelerinden olup, *Strep. cinnamomensis* kültürlerinden elde edilmiştir. Biyolojik membranlarda iyonlara karşı permeabiliteyi değiştirebilen ve stratejik dağılımlı oksijen atomları içeren organik moleküllerden oluşur (tablo1). Monensin sodyum halinde yem katkı maddesi olarak koksidiyoza karşı koruyucu amaçla kullanılmaktadır. Narasin ise *Strep. aureofaciens* kültürlerinden elde edilmiştir (tablo 2), koksidiyoza karşı yem katkı maddesi olarak koruyucu amaçla kullanılmaktadır. Aynı zamanda iyonoforların gelişmeyi hızlandırıcı ve canlı ağırlık kazancını artırıcı etkileri de kullanım alanı içerisinde yer almaktadır (16,19,20,21,26,28,48).

Polyether iyonofor grubu, karboksilik asit yapısında olup ilk kez 1967 yılında sentezlenmiş ve ionophore olarak ifade edilmiştir. İlk olarak 1968 yılında monensin bulunmuş ve bu gruba ait bileşikler sentezlenme yılına göre, monensin, narasin, lasalocid, salinomycin, maduramicin ve semduramicin şeklinde sıralanmaktadır (28).

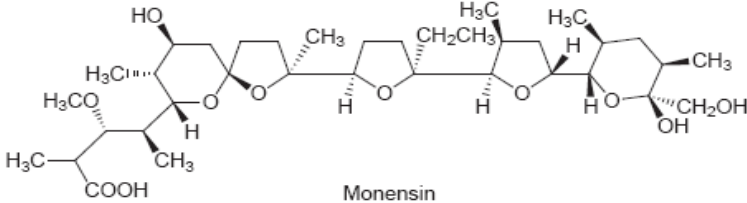
Monensin ve narasin iyonofor grubu antikoksidiallerin ilk üyeleri olup bu bileşiklerle ilgili araştırmalar devam etmekte ve kanatlı yetiştiriciliği başta olmak üzere pek çok yetiştiricilik alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Araştırma konumuz olması nedeniyle bu bölümde daha çok iyonoforlardan monensin ve narasin'in farmakolojik ve toksikolojik önemi ele alınmaktadır.

2.1.2.Kimyasal yapı:

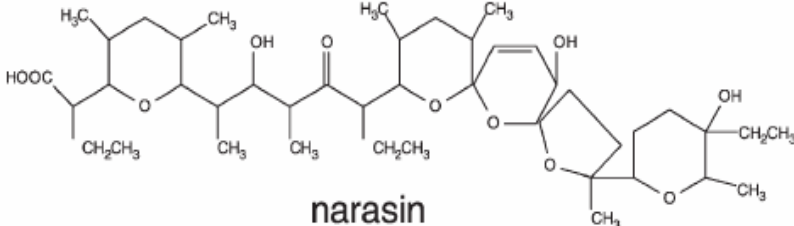
Poliether iyonofor grubu koksidiyostatlar iyon taşıma özelliklerine göre nötr iyonoforlar, kanal (por) oluşturan iyonoforlar ve karboksilik iyonoforlar olarak üç sınıfta incelenirler.

1. Nötr iyonoforlar; elektrogenik ya da elektroforetik taşıyıcılar olarak adlandırılır ve iyonize olabilir fonksiyonel gruplardan yoksundurlar.
2. Kanal (por) oluşturan iyonoforlar; biyolojik membranlarda iyonik boyutlarda stasyonere kanallar oluştururlar. Bu kanalların iyonlara karşı seçicilik özelliği yoktur.
3. Karboksilik iyonoforlar; oksijenli bir heterosiklik halkayla karboksil gibi açık zincirleri içerirler. Koksidiyozise karşı kullanılan bu bileşikler iyonlara karşı seçicidir. Monensin, narasin ve salinomisin Na^+ ve K^+ gibi monovalan; lasalosit ve maduramisine ise Ca^{++} ve Mg^{++} gibi divalan

iyonlarla kombine olurlar (28,31,48,53).

İsim	Monensin sodium salt hydrate
Açık Formül	 Monensin
Kapalı Formül	$C_{36}H_{61}NaO_{11} \cdot xH_2O$
Molekül Ağırlığı	710,88
Erime Noktası	267-269°C
Saklama Koşulları	4°C
Stabilite	Stok standartlar -20 °C de saklanmalıdır. Hazırlanan çalışma çözeltileri 4 °C de metanolde hazırlanır ve 5 gün süreyle stabil kalır.
Çözünürlük	Metanolde 50 mg/ml çözünebilir. Suda çözünmez, organik çözücülerde çözünür.

Tablo 1: Monensinin kimyasal yapı ve özellikleri

İsim	Narasin
Açık Formül	 narasin
Kapalı Formül	$C_{43}H_{72}O_{11}$
Molekül Ağırlığı	765.03 g/mol
Erime Noktası	98-100 °C
Saklama Koşulları	Sıkıca kapatılmış cam şişede dondurucu sıcaklığında (-10,-25°C 'de) saklanmalıdır. Stok çözeltiler – 20 °C de saklanmalıdır.
Stabilite	Çalışma Standard solusyonlar buzdolabı şartlarında 4 °C de 5 gün süreyle stabildir.
Çözünürlük	Metanol

Tablo2: Narasinin kimyasal yapı ve özellikleri**2.1.3.Etki şekli :**

İonophore - ion bearer - , iyon taşıyıcı, nakledici, sözel taşıyıcı, hamil anlamındadır.

Normal hücrelerde, intrasellüler Na^+ konsantrasyonu düşük K^+ konsantrasyonu ise yüksek olup hücre dışında bu oranlar tersinedir. Ca^{++} konsantrasyonu ise membranın iki yüzünde de denge halindedir.

İyonoforlara maruz kalan hücrede bu denge çok kısa bir sürede alt üst olur. İntrasellüler Na konsantrasyonu artarken K^+ konsantrasyonu düşer ki burada değişim $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ konsantrasyonu dengesinin bozularak Ca^{++} 'unda intrasellüler ortamda serbest konsantrasyonda dramatik bir hızda artışı intrasellüler faaliyet dizgesini bozar (28). Bu iyon transport mekanizması koksidia etkenlerinin kendilerine karşı bir direnç oluşturmalarını önlerler ki, bu bile tek başına karboksilik iyonoforların gelecekte de kullanım alanı olarak alternatifsiz kullanılabilirliğinin göstergesi olabilir (28).

İyonofor antikoksidiyaller membran yüzeylerinden sodyum ve potasyum iyonlarının geçişini engileyerek etkili olurlar. Bu tarz etki parazitin hem seksüel hemde aseksüel gelişim safhalarında gözlenir. Monensin Na^+ iyonlarına hücre membranından daha fazla tercih ederek pseudosiklik kompleks oluşturular. Koksidiya etkenlerinde birinci nesil şizontların gelişimini önleyerek parazitin yaşamsal faaliyetlerini ilk evrede bağırsak düzeyinde baskılar. Etkisi kısaca parazitin hücre içi taşınmasını bozmasıyla ilgilidir (48,53,54). Şizontlarda Na^+ ve K^+ ile bileşikler oluşturur. Böylece hücre zarı Na^+ ve K^+ iyonlarına daha geçirgen hale gelir ve sonuç itibariyle ATP'nin hidrolizi başta olmak üzere pek çok mitokondriyal faaliyetler engellenir (31, 48, 54).

İyonofor antikoksidiyaller *Eimeria* sporozoidleri üzerine yüksek derecede koksidiyosit etkileri vardır. Şizontlar üzerine ise daha çok koksidiyostatik etkileri söz konusudur (25,32,48,54).

Nötr iyonoforlar; elektrojenik ya da elektroforetik taşıyıcılar olarak da bilinen bu grup bileşikler (valinomisin, naktinler, siklik esterler) iyonize olabilir fonksiyonel gruplardan yoksundur. Kanal (por) oluşturan iyonoforlar; biyolojik membranlarda iyonik boyutlarda stasyonier kanallar oluştururlar (gramisidinler, alamektin, nistatin, amfoterisin B). Bu kanallar iyonlara karşı seçici değildir (54,55).

Karboksilik iyonoforlar; oksijenli bir heterosiklik halkayla karboksil gibi açık zincirleri içerirler. Koksidiyozise karşı kullanılan bu bileşikler iyonlara karşı seçicidir. Monensin, narasin ve salinomisin Na^+ ve K^+ gibi monovalan; lasalosit ve maduramisin ise Ca^{++} ve Mg^{++} gibi divalan iyonlarla kombine olurlar. Özellikle Na^+ ile biyolojik membranları geçme özelliği kazanırlar (55).

2.1.4.Metabolizma:

İyonofor antikoksidiyallerden monensin ve narasin oral yola yeme katılarak broylerlere verildiğinde karaciğerde metabolize olurlar. Karaciğer mikrozomal enzimlerince oksidatif metabolizasyona uğrayan monensin, bir koksidiyostat ve bir büyütme faktörü, olarak sığır, domuz,

broiler tavukları ve farelerde Veteriner pratikte kullanılmaktadır (15,18,19). İn vivo çalışmalar, radioaktif işaretli monensinin, farelerde 6 fecal metabolitinın tespit edildiği bildirilmektedir. Sığır ve tavuklarda olduğu gibi diğer tűrlerde de da benzer fecal metabolitlerin bulunduğu bilinmektedir. Kűçük

molekűllű çok sayıda metabolit ise decarboxilasyonla ve methoxyl grupları oluřumuyla bir keton halkasının yerini almaktadır. Biyotransformasyon sonrası bu metabolitlerin iyonoforik etkisi bulunmamaktadır ve bűyűk bir kısmı dıřkı ile atılırlar (42).

Narasin metabolizması ise, oral yolla kullanımı sonrasında iyi emilir ve bűyűk oranda safrayla atılır. 6 bűyűk metaboliti oluřur. Dihydroxy ve trihydroxynarasin yapısında birleřirler ve bu metabolitlerin iyonoforik koksidiyostat etkileri zayıftır.

Metabolik faaliyetlerin başında ana bileşiğin O-demethylation ve/veya the hydroxylation basamakları önemlidir. Mekanizması çok kesin olmamakla birlikte, farklı tűrlerde monensinin metabolizmasında haemoproteinlere bağlı olarak, sitokrom P-450 isoenzimlerinin oluşumunu ve fonksiyonlarını artırıcı veya baskılayıcı etkileri bilinmektedir. Monensinin toksik etkisinin gelişiminin nedenlerinden biridir (20,21).

2.1.5. Veteriner Hekimlikte Kullanımı:

Eti yenilebilir evcil hayvanlarda koksidia etkenlerinin neden olduğu hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi ile yemden yararlanmanın arttırılması veya gelişmenin hızlandırılması için antibiyotik kullanımı geçmişte olduğu gibi gűnűműzde de vazgeçilemez bir uygulama olarak devam etmektedir. Son yıllarda giderek daha fazla önem kazanan prevantif amaçla ilaç kullanımı bir antibiyotiğin belli sűrelerle verilen terapötik veya subterapötik dozlarının bir çok hastalık etkenine karşı koruma sağladığı bilinmekte buna bağlı yemden yararlanma ve besi performansı űzerine de direkt etkili olmaktadır (22,30,32,33,52,55).

 yonoforlar yemden yararlanmanın ve kapasitesinin arttırılması bařta olmak űzere yem verimliliđinin sađlanması, gűnlűk ađırlık kazancı artıřı, rumende propiyonik asit artıřına paralel asetik asit oluřumunun azaltılması, dűřűk proteinli rasyonlarda protein tutumluluđu, metan gazı oluřumunun azaltılması, ruminal iřlemler arası geçiřin hızlandırılması, ruminal protein degradasyonunun bir  l de önlenmesi ile daha da önemlisi 30 g./ ton oranında yeme katılarak koksidiyozisin kontrolű veya etki dűzeyinin azaltılması amacıyla kullanılır (10,15,18).

 yonoforların gram pozitif bakterilere etkinliği, *Streptococcus bovis*'in azalması ile laktat űreticisi mikroorganizmaların azaltılmış olmaları ve ruminal metan gazının yanı sıra oluşan H⁺ miktarının da azaltılması asidoz için önem taşır (18,22).

ABD’de yaz otlak ve meralarından maksimum yararlanmak ve 150 gün kalıcılığını sağlamak amacıyla kontrollü salınımlı kapsülleri üzerinde de çalışılan salinomisin ve monensin süt sığırları ketozisinde de kullanılmıştır (18).

Ruminal sıvıdaki propiyonik asit miktarının arttırılması, asetik ve bütirik asitlerin oluşumunun azaltılmasının yanı sıra selüloz katabolizmasının azalması ve mikrobiyel proteinlerin sindirim verimliliğinin arttırılması anlamı taşır. Bu durum, besi danalarında bu %11 besiye alınan koçlarda %12-13'lere varan bir verim sağladığı bildirilmektedir (18,21).

Monensin, etlik piliçlerde koksidia etkenlerinden *Eimeria necatrix*, *E.tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E.brunetti*, *E.mivati* duyarlıdır. Aynı zamanda *Camphylobacter* spp ve *Toxoplasmaya* da etkilidirler. Monensin sodyum tuzu formunda yeme karıştırılarak 99–121 ppm dozunda verilebilir. Hindilere ise 16.haftaya kadar 100 ppm dozda yeme katılarak verilir (19,32,34,46,48).

Narasin etki şekline göre monensine benzemektedir. *Eimeria necatrix*, *E.tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E.brunetti* duyarlıdır. *Eimeria* türlerine 60-80 ppm oranında yeme katılarak verilebilir (19,32,34,46,48).

Keleş ve arakadaşları 1995 yılında İstanbul Üniversitesinde yaptıkları bir araştırmada Salinomisinin sekal koksidiyozu aflatoksin B1’varlığına rağmen önemli ölçüde azalttığı da belirtilmektedir. (35).

Yetiştiricilikte kanatlı koksidiyozunun tedavisi ve profilaksisinde iyonofor grubu antikoksidiyal ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, azot retensiyonuna sebep olarak gelişmeyi hızlandırıcı ve verim arttırıcı etkisi nedeniyle de, kanatlı ve ruminantlarda yaygın olarak uygulanmaktadır (21). Yumurta tavukçuluğunda ise, kalıntı sorunu nedeniyle kullanımı yasak olmasına karşın yumurtlama öncesi dönemde koksidiyoza karşı bağışıklığı sağlamak amacıyla kullanılabilir (19, 27, 36, 46, 47, 48, 54).

2.1.6.İyonofor Antikoksidiyallerin Toksikolojik Özellikleri:

Monensin ve narasin diğer iyonoforlar gibi hedef hayvan gruplarında doğru şekilde kullanılmaları halinde güvenli bileşikler olarak adlandırılırlar. Normal dozlarda güvenli bileşikler olmasına rağmen (at ve ötücü kuşlar gibi) bazı türler için aşırı duyarlılık sözkonusudur (31).

İyonoforlarla zehirlenme olağan şartlarda mümkün olmayıp deneysel çalışmalarda anoreksi, ataksi, diare, depresyon, hafif solunum güçlüğü ve paralizle karakterize bir tablo gösterir. Myoglobinüri ile postmortem kardiak ve iskelet kaslarında nekroz ve peteşiler dikkati çeker (20,31,39,45,53).

İyonoforlara ilişkin hücre içi iyon geçişinin bozulması Na^+ , K^+ iyon dengesini bozar ancak bu dengenin esas merkezi Ca^{++} ve ATP durumunun bozulması ve mitokondrinin işleyemez hale gelmesidir. Fizyolojik olarak iskelet kaslarının yıkımlanmasından dolayı kreatin fosfokinaz (CPK)

ve aspartat amino transferaz (AST) değerleri değişir ve buna bağlı olarak yüksek dozlarda kalp kas dokusunda vakoulizasyonu meydana gelebilir (5,17,20). Kreatin fosfokinaz sitozolik bir enzim olup tüm zehirlenmelerde enzimatik bozulmaların ilk göstergesi niteliğindedir. Daha ileri durumlarda Laktat dehidrojenaz (LDH), hemosiderin artışı ve bağlı olarak serum K^+ , Na^+ , Ca^{++} , hemotokrit ve Hb miktarında azalma dolayısıyla bunlara bağlı olarak diare ve enterit görülür ve bu alt ıslatma olarak da belirtilmiştir (5,17,34,49,52,56).

Monensin sodyuma ilgi gösterir ve hücrelerde Ca^{++} ve Na^+ birikmesine neden olur. Narasin ise K^+ ve Na^+ a ilgi duyar ve bu katyonların hücre içine tasınmasına neden olur. Hücre içinde Ca ve Na iyonlarının birikmesiyle gelişen olaylar noradrenalin gibi maddelerin salıverilmesine ve yükseltgenme olaylarının artışına ve böylece etkin oksijen gruplarının açığa çıkmasında neden olur. Bu olaylarda kalp ve iskelet kasları başta olmak üzere, doku ve organlarda dejenerasyon ve nekroza neden olmaktadır (31).

Endojen kateşolamin liberasyonuna ilişkin iyonoforların intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonunu ve koroner debiyi arttırmaları, kalpteki kan basıncında da artışı neden olur ki bu myokard kontraktilesini değiştirir. Bu etki sonrası selektif koroner vazodilatatör etkiye neden olurlar ki, bu sadece iyon konsatrasyonu değişimiyle değil endojen kateşolamin serbestlemesiyle de ilgilidir (35).

Monensine duyarlılık incelendiğinde, LD₅₀ değerleri atlarda 2-3 mg/kg, sığır 26, koyun 10-12 mg/kg., keçi 22-30 mg/kg., kanatlı 200 mg/kg., köpek 10-20 mg/kg. olarak bildirilmiştir (31).

Monensinle zehirlenme belirtileri başlıca iştahsızlık, sürgün, hareketlerde yavaşlama, broilerlerde yerde göğüs üzerinde yatma, solunum güçlüğü, ataksia, gelişme hızında azalma, yem tüketiminde yavaşlama ve yumurta veriminde azalma belirtileri görülebilir (31).

Kalsiyum kanal blokerleri (verapamil, diltiazem, lidokain) kalmadulin antagonistleri (klorpromazin) adrenerjik reseptör blokerleri (yohimbin, tolazolin, propanolol) kalp glikozitleri (digoksin) farelerde iyonofor zehirlenmelerinde (monensin, salinomisin) toksisiteyi önemli ölçüde ($P<0,05$) azaltırlar (20,21,31). şu an kadar ulaşılabilen veriler monensin toksisitesinin kalp üzerine, salinomisin toksisitesinin de daha ziyade fare ve ratta nörotoksositeye at, domuz ve boğalarda ise karaciğer ve miyokarda ilişkin olduğu yönündedir (9,11,32).

Lipit membranlarda iyon transportunu değiştirdiği, hücresel kateşolamin salınımına nder olduğu, farmakodinamik olarak henüz bir çalışma yapılmamış olmakla beraber in vivo hücre kültüründe serotoninini libere ettikleri bilinen bir gerçektir (9,50).

Se ve E vitamini'nin iyonoforların toksisitesini azaltıcı ve engelleyici etkileri vardır. Bunu yanında tiamulin ve triaestil oleandomisin ile monensin arasında tehlikeli ilaç etkileşimleri söz konusudur (31).

İyonoforlar genel olarak bazı antibiyotiklerin; oleandomisin, sulfakinoksalin, sulfamezatin, sulfadimetoksin, kloramfenikol ile aynı sağaltım krnde kullanılmalarının etkileşime neden olduğu

bildirilmiş ancak salinomisin (60 ppm) ve lasalositin (75 ppm) danofloksasin (37,5 mg/L) ve norfloksasin (175 mg/L) ile aynı sağaltım küründe güvenle verilebileceği aralarında geçimsizlik olmadığı kanıtlanmıştır (34). Kloramfenikol lasalosit metabolizmasını azaltması ve bunun da P-450'nin inhibisyonundan dolayı broylerlerde nörotoksositeye neden olduğu söylenmiştir. Tek kullanım 10-25 mg/kg. dozda klinik belirti olarak sığırlarda üç güne kadar anoreksi, depresyon ve ishale 50 mg/kg.'da ise ilave olarak ilk 6-9 saat müsküler tremor, giderek periyodu kısalan respirasyona ve 125 mg/kg. dozda ise ölümün 10 gün içinde şekillendiği görülmüştür (11,23,48,50).

İyonofor antikoksidiyallerin parazitlerin invazyon safhasını etkilemeleri ile parazitlerin çok az bir kısmı olsun gelişimlerini tamamlayabildiği, bu durumun koksidiyoza karşı gelişen immunitenin uyarılması şeklinde açıklandığı bildirilmiştir (35,36).

İyonoforlardan monensin, salinomisin, lasalosit, narasin ve laidlomisin propionatın atlar için son derece toksik olduğu letal dozda kalp aritmisi evcil kedilerde miyelin dejenerasyonuna sebep olduğu halde sığırlarda akciğer amfizemi ve laktik asidoz ile ketozisin oluşmaması için kullanılabildiği belirtilmektedir (20,50). İyonoforların absorpsiyonları gastrointestinal yollarda hızla emildiği, karaciğerde P-450 tarafından hızla metabolize edildiği ilk geçiş etkisiyle hızla safra yoluyla bağırsaklara aktarıldığı, P-450'nin örneğin makrolidlerce inhibe edilmesi durumunda hepatik detoksifikasyonun azaldığı ve zehirlenme belirtilerinin şiddetlendiği bu durumda bile kalp ve iskelet kaslarında birikme yapmadığı bildirilmiştir (11,21,42,50,54).

AB ülkelerinde koksidiostatların kullanımı iyonoforlar da dahil olmak üzere 1831/2003/EC/no'lu ve 22 September 2003 tarihli düzenlemeye göre yapılmaktadır (5,10).

İyonoforların molekül ağırlığı geniş bir aralığa (613–940) sahiptir ve içerdiği iki uçtan biri karboksilik asit diğer uçta ise hidroksil grubu bulundurur. Katyonlarla siklik kompleks yaparlar. Özellikle Na⁺ ile biyolojik membranları geçme özelliği kazanırlar (5,6,9).

AB komisyonu Veteriner ilaçlarının tanımında fizyolojik bir fonksiyon değişimi veya patolojik bir durumun önüne geçilmesi şeklinde (2001/82/EC) tanımlarken, European Medicines Agency (EMA) biyolojik maddeler, gelişim düzenleyiciler ile yeni ürünleri ayrı, diğer veteriner ilaçlarını ayrı değerlendirmektedir. Buna ilişkin Veterinary Medicines Directorate (VMD) ve Veterinary Product Committee (VPC) diye iki komiteye ayırmakta ve lisanslandırma işlemini tamamen VMD üzerinden yürütmektedirler. MRL'ler ise merkezi olarak EMA'nın Compendium Veterinary Medicines Products (CVMP) tarafından 2377/90/EEC'ye göre çalışan 96/23/EC'ye göre yapılmaktadır. Burada hormonal ve beta agonistler ile büyüme stimulanları yasaklanmıştır. Dolayısıyla kalıntı düzeyinden (MRL'den) bahsedilmeyen çevresel kontaminantlar, (ağır metaller, pestisitler, mikotoksinler de dahil olmak üzere) bu sınıftandır (12,13,29).

Polyether ionophore antikoksidiyal ilaçlar hedef hayvan türlerinde özellikle kanatlılarda coccidiostats ajan olarak kullanılmasında güven indeksi oldukça iyidir. Ancak, hedef türlerin dışında at ve ötücü kuşlarda toksisitesi nedeniyle kontrendikedir (20,31,53).

İyonoforlar güvenlik alanı içinde kullanıldıklarında son derece etkin maddeler olup rezidü için sığırlarda bekletme süresine ihtiyaç olmadığı belirtilmekle beraber az da olsa bazı zehirlenme olayları rapor edilmiştir. Bunlar monensin ile ilgili 6 ve salinomisin ile ilgili ise 2 zehirlenme olayı ile karşılaştığı, bunların dışında herhangi bir toksisite olayına rastlanmadığı belirtilmektedir (23, 40,44).

2.1.7. İyonofor Grubu Antikoksidial ajanların analiz yöntemleri:

Kanatlı sektöründe koruyucu amaçla ilaç kullanımının yanısıra yasal olmayan usul ve koşullarda kullanılması olasılığına bağlı olarak tüketime sunulan kanatlı ürünlerinde polietar iyonofor grubundan monensin ve narasin kalıntılarının izlenmesi, kanatlılarda yasal arınma sürelerine göre kalıntı düzeyindeki değişimler ile bu kalıntının sofraya taşınması durumunda günlük alınabilecek en yüksek limitleri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde önemle üzerinde durulan konulardan biri haline gelmiştir (1,2,10,13,14,15). Gıda güvenliğinin tesis edilmesi amacıyla da gerek ulusal kalıntı izleme programları ve gerekse AB mevzuatlarının öngördüğü prensipler doğrultusunda tüketici sağlığını öncelikli kılan denetim yöntemleri uygulamaktadırlar (1,3,7,12). Her geçen gün yeni analitik yöntemler geliştirerek daha hassas testler ve buna uygun analitik sistemler kullanıma sunulmaktadır (23,42,44,60). Buna paralel olarak, ortaya büyük bir araştırma potansiyeli, analitik sistemlerin ve malzemelerin ticari pazarda rekabeti ve de uluslararası büyük bir mücadele gözlenmektedir.

C. Elliott ve ark.'nın yayınladığı derlemde (28), zaman içerisinde analitik gelişmelere yer verilmektedir. Sözkonusu analitik çalışmaların in vitro çalışmalar olarak düzenlendiği ve farklı tarama testlerin karşılaştırıldığı belirtilmektedir. Bunlardan ELISA yöntemi, böbrek hücre kültüründe üretilen *E.tenella* antijenlerinin tespiti esasına dayanmaktadır ve tespit edilebilir limit (LOD): 0.5µg/L seviyesine inildiği rapor edilmektedir. Ancak bu yöntemde gerek inkübasyon süresinin uzunluğu, gerekse kısmi olarak etkilemesi söz konusu olan farklı büyütme faktörlerinin etkileri rutin testlerde sorun olabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle araştırma amaçlı çalışmalar için dikkate alınabilecek bir yöntem olarak düşünülebilir. Rutin testler için immün respons oluşması sırasında diğer büyütme faktörlerinin etkileri yanılığa neden olabilir (28,29).

Diğer bir tarama yöntemi ise TLC-Biyootografik analiz metodu ile hayvansal dokulardan iyonofor grubu antikoksidiallerden monensin, salinomisin ve lasalosit kalıntılarının büyük bir kısmını tespit edebildiği belirtilmektedir. Ancak bu yöntemde de analiz süresinin uzunluğu, yavaş seyretmesi, aynı zamanda solvent bazlı ekstraksiyon hacimlerinin oldukça fazla olması dezavantajları olarak değerlendirilmektedir (28).

İmmüno assay screening test yöntemiyle yapılan analitik denemeler antikör üretim tekniğine dayanmaktadır. Bağışıklık kazanan hayvanlardan elde edilen antikörler iyonofor koksidiyostatlarla

bir taşıyıcı protein vasıtasıyla kompleks oluşturması ile sağlanmaktadır. Antikorlar (poliklonal ve monoklonal) iyonoforların çoğuna bağlanmaktadır. Ancak az sayıda da olsa, salinomisin ve narasin hariç iyonofor metabolitlerine karşı çapraz reaktivite geliştiğini göstermiştir (28).

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (YBSK-HPLC) tekniği ile analitik çalışmalar, lasalosit fluoresans kromatografik karakter göstermekte, diğer iyonofor kalıntıları ise derivatizasyon tekniği ile dokulardan ayrıştırılabilmektedir. HPLC yönteminde tüm karboksilik iyonoforlar için multiresidue çalışması mümkün olmamaktadır. Monensin, narasin ve salinomisin bir yöntemle kombine edilebilirken lasalocid tek başına ayrı bir ekstarksiyon tekniği ile ayrıştırılabilmektedir. UV/VIS dedektör kullanılarak hassas değerlere inilebilmektedir. Ancak Lasalosit bu dedektörle analiz edilememekte, ayrıca fluoresans dedektörle analiz edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (28).

Kütle Spectrometrik (MS) metot ile karboksilik iyonofor kalıntılarının doğrulama testlerinde en hasas ve düşük limitlere kadar analiz imkanı sunmaktadır.

Electrospray LC-MS sistemi, kolay ve hızlı bir ekstraksiyon yöntemiyle temizleme aşamaları gerektirir. Günümüzde de yayınlanmış metotlara göre kütle spektrometrik ve buna bağlı Tandem MS (Triple quadrapol) dedection sistemleriyle 0,5 ppb düzeylerinde hesaplama limitine inilebilmektedir (28).

AB nin referans laboratuvarlarından Berlin Veterinary Laboratory (BVL) tarama testleri için aranan kriterlerden biri olan genel tarama yani SIM modunda carboxilic ionophore molekülü veya benzeri tüm olasılıkları tarama yapar. Pek çok şüpheli veri içerisinden aranan molekülün kütle değerleri sınırlarına uygun olanları kromatografik olarak pozitif veya pozitif şüpheli olarak değerlendirir. Rutin veya araştırma amaçlı binlerce numune için uzun sürebilecek ve çok hassas analitik şartlar oluşturmak yerine kolay ve hızlı bir tarama testi ile bir yaklaşım sağlamak daha kullanışlıdır. AB' nin metot validasyonu kriterlerine göre tarama testleriyle elde edilen pozitif veya şüpheli numuneler miktar tayini ve hassasiyet testleri için MSMS tekniği ile doğrulanırken, negatif sonuçlardan da belirli bir sayıda örnekleme yaparak doğrulama gerekliliğini belirtmektedir (9,10,13, 28).

E.Cheneau ve arkadaşlarının araştırmasında, LC-MSMS ile kantitatif bir analiz metodu geliştirmişlerdir. EC direktifleri (EC/524/70) rehberliğinde hazırlanan metot geliştirme çalışmalarında, kanatlıların tüketilebilir doku ve organlarında ve plasmada monensin kalıntılarını LC MSMS, ESI sistemiyle, oldukça hassas ölçümlere ulaştıkları ve 0.5 ppb gibi oldukça düşük seviyelerde miktar tayini yapılabilen bir metodu valide ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmalarında Limit of Quantitation (LOQ) düzeyini ise 2.5 ppb olarak bildirilmektedir, yani stabil olarak miktar tayini için hesaplanabilir güvenilir seviye olarak bu düzeyi deklare etmektedirler (23).

Çok hassas limitlere inilebilen ve doğrulama çalışmalarında kullanılabilecek bir metot olarak düzenlemişlerdir. AB'nin Community References Laboratory (CRL) sorumluluğunda olduklarından bu metodu daha sonra AB'ne üye ve aday ülkelere de tavsiye etmişlerdir (23). Mobil fazda amonyum acetat ilave edilmesi iyonoforları ESI, pozitif iyonizasyon ve seçici reaksiyon monitoring modu (SRM) için son derece önemli olduğu belirtilmektedir. Bu özellik nedeniyle mobil faza amonyum tampon çözelti

kullanımına gereksinim duyulmadığı belirtilmektedir. Mobil fazda organik çözücü olarak asetonitril ve su oranını (50 / 50) bire bir kullandığında analiz süresi biraz daha uzun sürmektedir. Mobil fazı formik asit ile asitlendirdiklerini, ancak en düşük tespit seviyesinde geri alım kazancı (recovery) % 58,7' ye düştüğü, diğer konsantrasyonlarda %88 - %102,2 olarak belirlendiği görülmektedir. Ayrıca analiz süresi 16 dakika sürerken, monensin ve narasinin geliş zamanları 11. ve 12. dakikaları bulmaktadır (23).

Ekstraksiyon basamakları hemen tüm metodlarda birbirine benzemekle beraber küçük değişik uygulamalarla hassasiyet dereceleri değişmektedir. Dokulardan iyonoforların ayrıştırılması ve purifiye edilmesi amaçlandığından, katı faz ekstraksiyonu (solid phase extraction - SPE) filtreleri değişik marka ve modellerle kullanıma sunulmaktadır. Bu da belirli bir ekonomik değer oluşturmaktadır. Bir kısım araştırmacı ise filtrasyon yerine likit likit ekstraksiyon yöntemiyle biraz daha fazla çözücü ve santrifuj işlemleri uygulayarak, temizleme ve aranacak kalıntı miktarını en az kayıpla tespit edebilecek yöntemleri kullanmaktadırlar. Burada seçici olunacak nokta hem ekonomik, hem çevreci ve hemde halk sağlığı açısından istenilen performans değerlerine ulaşabilecek bir metod olmasıdır (23).

E.Cheneau'nun metodunda (23), elde edilen performans değerlerinde öncelikle stabil değerlere ulaşılmaya çalışıldığı, rutin testlerde kullanışlı olan verilere hedeflendiği, daha ileri çalışmalara gerek görülmediği belirtilmektedir. Mobil fazdaki organik çözücünün asetonitril olarak seçilmesinin kolonun şartlanması ve temizliğini sağlamakta faydalı olduğu, piklerin daha iyi görüntü vermesini sağladığı, mobil fazı isokratik akış programı şeklinde uygulandığı anlaşılmaktadır. Geri alım kazancı, tekrarlanabilirlik, doğruluk, kesinlik ve seçicilik gibi performans parametrelerinde stabil sonuçlar elde edilmesi için en uygun şartlarda analizlerin yapılması gerektiğine işaret etmektedirler.

Kullanılan analiz metodunun bir multirezidü analiz metodu olması nedeniyle genelde olduğu gibi az sayıda kimyasal çözelti kullanımı tercih edilmesi, ancak standart çözelti hazırlanması sırasında daha uzun süreli stabiliteyi sağlamak için en uygun çözünün tercih edilmesi gerektiği, bir çok analitik çalışmada vurgulanmaktadır (23,28,43,45,50,51). Cheneau ve Josen'nin metodlarında (23,51), stok çözeltiler metanol ile hazırlanırken, Elliott, Kennedy gibi araştırmacıların kullandığı bir kısmı analiz

metotlarında asetonitril kullanılmış veya stok çözelti metanol ile hazırlanırken çalışma çözeltileri asetonitril ile hazırlanmıştır. Yine bazı araştırmacıların denemelerinde metanolün hem stok çözelti, hem de çalışma çözeltilerinin hazırlanışında kullanılmasının stabil sonuçların alınmasını sağladığı ifade edilmektedir (28,37,50,51,60). Narasin standart çözeltilerinin stabilitesine dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Asetonitril ile hazırlanan standart çözeltiler yapısı gereği çok çabuk yıkımlanmakta, aynı gün içinde devam eden analiz sırasında performans değerleri % 50- % 70 arasında kayba uğradığı belirtilmektedir (23,26,37).

Veteriner ilaç kalıntılarının izlenmesi amacıyla rutin çalışmalar devam etmesine karşın, kalıntı düzeylerini etkileyen parametreler ile ilgili yeterli araştırmaya rastlanılmadı. Numunelerin alınışından itibaren saklama koşullarını da içeren bu süreçte, olası değişikliklerin irdelenmesi ile günümüzde çok düşük kalıntı limitlerinin bile analiz edilebildiği hayvansal gıdalardaki yasaklı maddelerin, kalıntı seviyesi tüketim öncesi şartlara göre nasıl değişime uğradığı büyük önem arz etmektedir (10,13).

Halk sağlığı açısından gıda güvenliği konusu, son yıllarda üzerinde ısrarla durulan ve AB direktiflerinde belirlenen kriterlere uygun olarak ulusal kalıntı izleme programlarıyla takip edilmektedir. Tarım ve Köyişleri Bakanlığınca monensin ve narasin ilaveli yem verilen broyler beslenmesinde, prospektüslerinde belirtilen yasal arınma sürelerine uyularak kesime sevk edilir.

Avrupa Birliği İlaç değerlendirme Ajansı (EMA) ve Türk Gıda Kodeksi (TGK) tarafından iyonofor antikoksidyal ilaç kalıntıları için (lasolasit hariç) resmi olarak MRL veya yasaklama kararı belirtilmemesine rağmen ulusal kalıntı izleme programına göre takibi gerekmektedir.

2006 yılında EFSA 167 no'lu bildirisinde (Adopted on 21 Nov.2006) daha önceleri MRL verilmemiş olan monensin için tavuk ve hindilerde kas, karaciğer ve böbrek dokuları için MRL: 0.008 mg/kg yani 8 ppb olarak bildirilmiştir. Buna bağlı olarak da yasal arınma süresi sıfır gün olarak bildirilmiştir. Benzer şekilde narasin için de yeni kararlar EFSA yayınlarıyla bildirilmektedir. 01.04 2006 tarihinde yayınlanan EC-2006/545 sayılı tebliğine göre kanatlı dokuları için MRL: 0.050 mg/kg. bir başka ifadeyle 50 ppb olarak yayınlanmıştır (12,13,14). Mayıs 2007 tarihinde yayınlanan Conceil Regulation (EEC)2377/90 kararına göre yem katkısı olarak kullanılan monensin için sığır dokularında MRL düzeylerini onaylayarak et ve süt için 2 ppb olarak bildirilmiştir (1,5,6). Monensin için ayrıca kesim öncesi 6 saat bekleme süresinin yeterli olduğu raporda yer almaktadır.

İstanbul gibi büyük nüfus yoğunluğuna sahip bir metropolde, tüketime sunulan hayvansal gıdalarda veteriner ilaç kalıntısı yönünden güvenilirlik veya koruyucu amaçla kullanımında yasal arınma sürelerine uyumun denetlenebilmesi vazgeçilmez standart tedbirler içinde yer almalıdır. Aynı zamanda ilgili AB ve Türk Gıda Kodeksi değerlerine uygun performansta izelenebilirliğin sağlanması gerekmektedir.

Yasal arınma süresi 7 güne kadar olan ilaçlı yem uygulamasına son verilerek kesim öncesi ilaçsız yemle beslenmesi gerekmektedir. İlaçtan arınma süresi de denen bu süreçte kurala

uyulmadan kesime sevk edilen broylerlerde, 16 haftalıktan büyük yumurtacı tavuklarda, 12 haftalıktan büyük hindi palazlarında kullanılması sonrası olası etlerin tüketilmesi durumunda olumsuz etkilerinin olabileceği ve bunun bir çok ciddi sağlık problemini de beraberinde getirebileceği bir gerçektir.

1831/2003/EC Direktiflerine göre yeme katılabilecek yüzde oranları belirlenmiştir. (22 September 2003/1831/2003 EC, Additives for Animal Nutrition). Yasal arınma sürelerine uyulmadan veya olası hatalı kullanım sonucu kalıntı ihtiva eden kanatlı eti veya yumurtası yemek kültürümüze bağlı olarak monensin ve narasin kalıntıları üzerine nasıl bir etki yapacağı bu etkilenmenin gerçekte halk sağlığı bakımından olumlu veya olumsuz yönde değişimleri son derece önemli olacağı belirtilmektedir.

Endüstriyel tip yetiştirmelerde antibiyotikler gelişme ve verim arttırıcı, kimi zaman da hastalıklara karşı koruyucu olarak çoğunlukla yeme karıştırılarak bazende içme suyu içinde kullanılır. Bu uygulama et üretimine yönelik işletmelerde aynı kesim ağırlığı için yemden %3–12 oranında tasarruf sağlanabilir (34,59). Bu; hayvanların gastro-intestinal sisteminin flora ve faunası üzerinde yapılan seçkin pozitif veya negatif etki ile yemden sağlanabilir protein, karbonhidrat ve minerallerin kullanılabilirliğinin düzeyini etkilemenin yanı sıra kayıpların azaltılması ve kayıpların dönüştürülebilirliği esasına dayanır. Bu; çift tırnaklılarda ön midede şekillenen fermentasyon gazlarının da üretiminin azaltılması, içeriklerinin dönüşümünün sağlanmasını içerir. Bu amaçla kullanılan iyonoforların rumende daha fazla propiyonik asit oluşturacak şekilde florayı etkileyerek daha fazla ATP hazırlanmasına sebep oldukları buna karşılık asetik asit, bütirik asit ve hidrojen şekillenmesinin azaldığı, bununla hidrojen ve karbondioksitin birleşerek metan oluşumunun önüne geçildiği ve belki çevre kirleticisi olarak serbest kalabilecek bir gazın üretim öncesi kendi yapı taşlarıyla enerji üretimine kanalize edilebileceği bilinmektedir. AB uzmanlar komitesi 1998 yılında avilamisin, flavomisin, lasalosit, monensin ve salinomisini yem katkısı olarak önerirken avoparsin, basitrasin, karbadoks, olakindoks, spiramisin, tilozin ve virjinamisini yasaklamıştır. İsveç 1986 yılında yem katkısı olarak antibiyotik kullanımını yasaklamış bunu 1998’de Danimarka takip etmiştir ancak izleyen yıllarda tüketim/canlı ağırlık kazancı parametrelerinde pay/payda oranı büyüdüğü için küçük dozlarda kullanım tekrar serbest hale getirilerek organik ürünlere yönelim salık verilmiştir (51,59).

Kesim öncesi bekletmeye ilişkin olarak eski literatürlerin çoğunda 5 gün kesim öncesi bekletme zorunluluğu mevcut iken (4,11,34,58), monensin için bekletme gereği olmadığını yazanlar da bulunmaktadır (49). Ülkemizde AB’ nin direktifleri ve regülasyon yayınlarına göre hareket edilmekte olup, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafında tebliğler halinde ilan edilmektedir.

Bunun yanı sıra insan gıdası ve özellikle protein kaynağı olarak kullanılacak hayvanlarda ilaçtan arınma süreleri, bıraktıkları kalıntı miktarları ile bu rezidünün besin zincirine girmesi durumunda periyodik günlük alınabilecek en yüksek limitleri tüm dünyada ve ülkemizde önemle

üzerinde durulan başlıca konulardan biri halini almıştır. Subterapötik dozlarda belli sürelerle yemlere katılarak kanatlılara yedirilmek suretiyle koksidia etkenlerinin vereceği zarardan onları koruyarak ekonomik kayıpların azalmasına, yemden yararlanmanın artmasına ve besi performansına olan pozitif etkileriyle iyonoforlar, kalıntı yönünden son derece önemli hale gelmişlerdir. Gerçekte hayvansal yemlerin sağlığa zararlı yapıları barındırmalarının gıdaya yansıma şekilleriyle ilgili fazla literatür olmadığını yem katkılarıyla çeşitleri literatüre kıyaslandığında oldukça azdır (36,37,40).

Lynas ve ark.'nın 1998 yılında yaptıkları bir araştırmada, satışı yapılan 161 adet yem numunesinden herhangi bir katkı maddesi içermediği beyan edilen 71 adedinden (%44.1) 42 adedinin (%26.1) değişik seviyelerde katkı içerdiğini saptamıştır (42).

Yine bir başka araştırmada, 247 adet koruyucu katılmış yem numunesinden 87 adedi (%35.2) beyan edilmemiş antibakteriyel ajanlarla, bunların da 59 adedi (%23.9)'u kabul edilebilir düzeylerin üzerinde bulunmuştur. Bunların en çok tespit edilenler klortetrasiklin (CTC, %15.2) sulfonamidler (%6.9) penisilin grubu (%3.4) ve iyonofor grubu (%3.4) oranında bulunmuştur (42). Yem katkıları içinde CTC, İrlanda'da en çok kullanılan antibakteriyel olup Nisan 1985'ten Mart 1998'e kadar incelenen 424 adet 147'si sığır 277'si domuz olmak üzere böbrek örneklerinden 69 (%16.23) adedi rezidülü bulunmuştur (40).

İyonoforlar için Avrupa Birliği Resmi Otoritesi 75-125mg/kg olarak broyler ve hindilerde kullanımını ve kesime beş gün kala ilaçlı yemin kesilmesini öngörmektedir. Yumurta tavuklarında da 16 haftaya kadar kullanılabileceğini bundan fazlasının mümkün olmadığını bildirmelerine rağmen Kuzey İrlanda'da 161 yumurta örneğinde yapılan bir çalışmada % 66 oranında 0.3 µg/kg. düzeyinde lasalosite rastlanmıştır. Kaya ve ark. eserlerinde yumurtacı tavuklarda kullanımının gerekli olmadığını, Şener ve Kaya'da yumurtacı tavuklarda ilk 16 haftalığa kadar kullanılabileceğini belirtmektedirler (34,58). 1995'te yapılan bir çalışmada lasalosit içeren yemin granuler formunun toz formundan daha az kalıntı bıraktığı ve daha az etkin olduğu ayrıca pellet formun toz formundan dört kat daha az bulaştığı tespit edilmiştir (42,43,44,45).

Yapılan bu çalışmada, elde edilen veriler ışığında, toplumsal tüketim alışkanlıklarımızla aynı koşullarda yapılan pişirme işlemleri ve saklama tekniklerine göre ısı faktörlerinin etkileri araştırılmak üzere planlandı. Isı işlemlerinin kalıntı düzeyine etkisinin ne olacağı ve kalıntı düzeyini nasıl etkileyeceğinin araştırılması önemli bir bilimsel veri oluşturacağı düşünülmektedir. Kanatlı yetiştiriciliğinde kullanımı sınırlandırılmayacak monensin ve narasinin kullanım sonrası eğer kalıntı söz konusu ise ürünün toplumsal yemek kültürü bağli olarak değişim meydana gelip gelmeyeceği ve olası etkilenmede gerçekte hangi madde ve metabolitleri üzerinde etkili olacağı hususunu bu çalışmayla ortaya konulması öncelikli hedeflerdendir.

2.1.8. İyonofor grubu antikoksidiyallerin kalıntıları üzerine çalışmalar:

İyonofor koksidiyostat ajanlarlar ilgili kanatlı doku ve ürünlerinde kalıntı tarama ve farklı parametrelerin denendiği analitik çalışmalar gün geçtikçe çok hassas düzeylerde ölçülebilir metotların bulunmasına yol açmaktadır. Bu alanda güvenilir metotlar geliştirildikçe gerek EFSA ve gerekse EMEA son zamanlarda sık sık tebliğler yayınlamaya başlamıştır. Gıda güvenliği konusunda yeni veriler sunulmaya, MRL ve bekleme süreleriyle ilgili yeni gelişmeleri regülasyonlarla duyurmaktadırlar. Aynı konuda art arda yeni değerler verilmektedir (1,2,3,4,5, 6,7,8,9,10,11).

Rosen, 2001 yılında İsveç'te yumurtalar üzerinde yapılan bir kalıntı izleme çalışmasında, analize alınan yumurtaların % 50'sinde narasin tespit edildiğini, kalıntı oranlarının ise 0.2–11 µg/kg arasında olduğunu tespit etmiştir (51). Başka bir araştırmada ise monensin, lasalosit ve salinomisin, yumurtada akümüle olduğu belirlenmiştir. 520 farklı kümeste yapılan araştırmada, monensin, salinomisin ve lasalositin kullanım oranının yüksek olduğu ve monensinin 1.1–12.9mg/kg, salinomisinin 0.9-13.9mg/kg ve lasalositin 0.1-5mg/kg oranlarında yemlere katıldığı, bunların yumurtadaki birikimlerinin ise 0.12 µg/kg monensin, 3.3 µg/kg salinomisin ve 6.3 µg/kg lasalosit olduğu tesbit edilmiştir (49,50). Broilerlerde kullanım için lisanslandırılmış iyonoforların rezidüel olarak karaciğerde değişen oranlarda tespit edilebildiği, monensin, salinomisin ve narasinin tavuk etlerinde bulunmadığı iddia edilmiştir (40,41,44).

Bir diğer narasin rezidue tarama çalışmasında ise, 100 adet broiler karaciğerinin analiz edildiğini bunlardan 11 adet örnekte narasinin rezidüel olarak 0.04–0.67 µg/kg arasında değiştiğini tespit etmişlerdir (40,44).

Kuzey İrlanda'da yapılan bir başka çalışmada 40 adet yem rasyonunun %22.5'inde monensinin koruyucu dozun çok üstünde (5 mg/kg) bulunduğu, en yüksek bulunan düzeyin ise 44 mg/kg olduğu bildirilmiş; sebepleri araştırıldığında ise yem fabrikalarındaki gerek normal gerekse pellet yapımı esnasında makine ve ekipmanların bulaşıklığı, personelin dikkatsizliğinin ana nedenler olduğu anlaşılmıştır (37,44).

Koksidiyozis protozoonlardan özellikle *eimerialar* tarafından meydana getirilen intestinal harabiyet ve emilim problemleri ile direkt negatif ekonomik etkinliklerinden dolayı maddi olarak son derece önemlidirler. Önlemek amacıyla birçok ilaç kullanılmakta iken halen de bu alanda arayışlar sürmektedir. Günümüzde nikarbazin, halofuginon, robenidin, diklazuril, monensin, salinomisin, narasin, lasalosit, maduramisin kullanılmakta, farklı kombinasyon ve dozajlamalarla arayışlar halen devam etmektedir.

Karboksilik iyonoforlar kanatlılarda öncelikli olmak üzere koksidiyoz etkenlerine, gram(+) bakterilere karşı koruyucu amaçla su ve daha ziyade yemlerine katılarak kullanılmaları; lasalosit 75-125mg/kg., salinomisin 50-70mg/kg. dozla yasal olarak sınırlandırılmıştır. EMEA(70/520/EEC) tarafından da aynı dozla

sınırlandırılan lasalosit için MRL kas, deri, yağ, karaciğer ve böbrekte sırasıyla 20, 100, 100, 100, ve 50 µg/kg. olup, yumurtada ise tolerans limitinin dahi kabul edilemeyeceği açıklanmıştır. AB'nin bu standartı ülkemizde lasalosit için hindi, sülün, keklik ve bıldırcında aynı olmak kaydıyla 90-120mg/kg olarak kabul edilmiş olup bunlar için de yumurta limiti kabul edilemez denilmiştir. Aynı amaçla tavşan yetiştiriciliğinde de koksidiyoz etkenlerine karşı koruyucu olarak kullanılmaktadır (55).

Monensinin yemle 20mg/kg dozda granüle edilerek tavşanlara yapılan yedirme denemelerinde hem virjinamisinle beraber hem de yalnız başına canlı ağırlık artışında istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olduğu paralelinde mortalitede azalmayla beraber kan Mg^{++} yoğunluğunda artış dışında biyokimyasal parametrelerde önemli bir değişime sebep olmadığı bildirilmiştir (4,5,10,11).

Ülkemizde

kullanımına ilişkin veri olmamakla beraber dünyanın değişik ülkelerinde ruminantlarda kullanımı sözkonusudur. Bilimsel araştırmalarda rumen florası üzerine metanojenik ve sakkarolitik bakteriler üzerine etkileri nedeniyle azot retensiyonuna neden olmalarından dolayı yemden yararlanmayı arttırıcı etkileri nedeniyle belirli süreler kullanıldıkları belirtilmektedir. Büyük ruminantlar ve domuzda gelişme arttırıcı amaçla da kullanılırlar; sindirim kanalında laktat üreten (özellikle *S. bovis*) bakterileri inhibe eder, laktatı propionata dönüştüren bakterileri etkilemezler. Domuzlarda *sarkosporidiyoz*a, ruminantlarda da yine *kriptosporidiyoz*ise karşı kullanımı bildirilmiştir. Lipid membranlarda iyon transportunu değiştirdiği, sellüler kateşolamin liberasyonuna önder olduğu farmakodinamik olarak henüz bir çalışma yapılmamış olmakla beraber in vivo hücre kültüründe serotonin libere ettikleri bilinen bir gerçektir (24,25,28).

M.Rokka ve ark.'ı yumurta numunelerinde uyguladıkları analiz metodunda narasin için LOD: 0.9 ppb, lasalosit için LOD: 2 ppb olarak elde etmişler. Yumurtacı tavukların yemlerine narasin ve lasalosit ilave edilmesinin, yemlerine iyonofor ilave edilmemiş kontrol grubuna göre yumurta veriminde herhangi bir azalma veya değişiklik gözlenmediğini bildirmişlerdir. 7 günlük geri çekilme periyodu sonunda narasin kalıntı düzeyi ölçülmüş ve 0.9-1.7 ppb oranında tespit edildiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada lasalositin yumurtaya geçişinin daha hızlı olduğu ve 3 gün içinde kalıntılarının tespit edilebildiği, salinomisinin ise 10 günlük süre içinde kalıntısına rastlanıldığı bildirilmektedir (49).

Gıda maddesi olarak yaygın şekilde tüketime sunulan ve diğerlerine göre ucuz hayvansal gıda olan, sürekli tüketimi söz konusu olan kanatlı eti, yetiştiricilik bakımından kısa süren bir beslenme periyodu sonunda kesime sevkedilmektedir.

Yaşam sikluslarında yapılan ıslah çalışmaları sonucu kısa sürede yetiştirilen tavukların beslenme süresince koruyucu amaçla yemlerine katılan kimyasallardan arınma süresi de hızlandırılarak birkaç gün, hatta saatlerle ifade edilen sürelerde vücuttan atılımı sağlanmıştır. Bu durumu göz önüne alan yetiştiricilerden bir kısmı yasal arınma süresini kendilerince bu süreyi göz

ardı edebilmektedirler. Pratik uygulamalarda kesim öncesi tavukları akşamdan aç bırakarak ertesi gün kesime sevk edilmesi ile yaklaşık 1 günlük bir süreci doğal olarak sağlamaktadır.

Koksidiyoz etkenlerine karşı yem içinde belli oranlarda kullanılan lasalosit ve salinomisin için ise mutlak surette beş gün beklenerek uzun süreli tüketimde dahi tüketici için risk taşımayacak bir seviyeye indirildikten sonra tüketime sunulması gerekmektedir. Uygulamada, yem değişikliğinin getireceği alimenter değişimin besideki performans ve olası diğer yem değişikliği sonuçlarından etkilenmemek için, bu değişim yerine aynı yemle beslenme daha yararlı görülmektedir. İşte tüketicinin bilmesinin mümkün olmadığı ancak sağlığı açısından son derece risk taşıyan tüketimin yoğun, fiyatın makul, besin değerinin yüksek oluşu nedeniyle “Veteriner Halk Sağlığı” açısından son derece önemli bir sorun olarak durmaktadır (10,13,37).

Kanatlı yetiştiriciliğinde kullanımı sınırlandırılmayacak monensin ve narasinin kullanım sonrası kalıntı problemi, varsa düzeyi, kalıntılı ürünün gerçekte toplumsal yemek kültürü şeklinde işlendiğinde kaybının olup olmadığı ve olası etkilenmede gerçekte hangi madde ve metabolitlerin etkin olacağı hususunu bu çalışmayla ortaya konulması amaçlanmaktadır. Beş gün olan yasal arınma süresine uyulmadan broylerlerde, 6 aylıktan fazla domuz yavrularında, 16 haftalıktan büyük yumurtacı tavuklarda, 12 haftalıktan büyük hindi palazlarında kullanılması sonrası olası etlerin tüketilmesi durumunda yaygın şekilde toksik etkileri olabileceği ve bunun bir çok ciddi sağlık problemlerine neden olabileceği, potansiyel bir toksikasyon olarak değerlendirilmektedir (4,10,33,28).

E.Baydan ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada, sülfadiazinin kanatlı dokularında kalıntı düzeylerinin ısı karşısındaki tepkisini belirlemeye çalışmışlardır. Yine aynı araştırmacılar tarafından 2002 yılında düzenlenen bir çalışmada, sulfonamid grubu ilaçların, (sülfadimetoksin, sülfakinoksalin ve sülfadoksin) kalıntıları üzerine farklı pişirme işlemlerinin etkileri araştırılmıştır. Isı etkilerinin sülfadimetoksin, sülfakinoksalin ve sülfadoksin kalıntıları üzerinde kaydedeğer bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Pişirme ve dondurma işlemlerine ilişkin ise çok az sayıda çalışma olduğu görülmüştür (16,17). Dehai ve ark. (1996) kanatlı dokularında ormetoprim ve sülfadimetoksin kalıntılarının çeşitli pişirme, -20C'de dondurma ve bekletme ile az da olsa azaldığını, ancak bunun istatistiki bir anlam ifade edebilecek kadar yeterli veri olmadığını belirlemişlerdir (24).

AB'nin direktifleri ve tüm gelişmiş ülkeler başta olmak üzere dünyada gıda güvenliğinin ön plana çıkması bu alanda araştırmaları teşvik edilebilir bir duruma getirmiştir. İlaç kalıntılarıyla ilgili araştırmalarda ön plana çıkan birçok araştırmacı daha hassas analiz yöntemleri geliştirmek için çalışmaktadırlar. Neredeyse aynı yıl içerisinde $\mu\text{g/kg}$ (ppb) seviyelerinden ng/kg (ppt) seviyelerine kadar inebilen düzeylerde metot geliştirmelerine rastlanmaktadır. Antikoksidiyal ilaç kalıntıları üzerine AB nin referans laboratuvarlarından biri olan AFSSA –Fougere ve Berlin BVL başta olmak üzere, İrlanda, Belçika, Finlandiya, İsveç gibi diğer AB ülkelerinde araştırmacılar iyonofor grubu

antikoksidial ilaçların kalıntıları üzerine pek çok birbirini izleyen metot çalışmaları yapmışlardır (23,29,38,51,60).

Kanatlı yetiştiriciliğinde vazgeçilmez beslenme unsurlarından olan antikoksidial ilaveli yemlerin kullanımı, uzun süren çalışmalar neticesinde gerek toksisite gerekse etkinlik ve kinetik çalışmalarıyla formülasyon düzeyinde değişimlerle

daha çabuk arınması sağlanmıştır. Bu nedenle kullanımı iyice yaygınlaşan iyonoforların kalıntı problemi, varsa kalıntı seviyesi, kalıntı içeren gıda maddesinin tüketime sunulurken kontrollerden kaçması, gerçekte toplumsal yemek kültürüne bağlı olarak farklı pişirme usullerine göre ısı işlemi uygulandığında kalıntı düzeyindeki kaybının olup olmadığı ve olası etkilenmede, gerçekte hangi madde ve metabolitler üzerinde etkili olacağı hususunu bu çalışmayla ortaya konulmasına çalışılacaktır.

Ülkemizin AB yolunda pek çok alanda işbirliği yapması doğrultusunda gıda güvenliği ve izlenebilirliği açısından da AB kriterlerine uyumu esas kılmaktadır. Bu amaçla Fransa'nın Agency Français de Securite Sanitaire des Aliments (AFSSA) Fougere ve Almanya'nın Berlin Veterinary Laboratory (BVL) ile Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (PVKAE) arasındaki diyaloglar neticesinde metot uyumu ve işbirliği sağlanmaktadır. Proje çalışmamızda özellikle tarama testlerimizde BVL (37) metotları kullanılmıştır. Berlin BGVV daha sonra 2002 yıllarında BVL ismini almış olup, başlangıçta D.G.Kennedy metotlarını referans olarak kullanmışlardır. Doğrulama testlerinde ise AFSSA (23) metotları rehber alınarak analizlerimiz yapılmıştır. Rosen ve ark.'nın (51) İsveç'te geliştirdikleri yöntemin performans değerleri ve analitik şartları da yeni çalışmamızda kıyaslanabilir değerler olarak dikkate alınmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbulda tüketime sunulan kanatlı doku ve ürünlerinde iyonofor grubu antikoksidial ilaçlardan monensin ve narasin kalıntılarının izlenmesi ve ısı faktörlerinin kalıntı düzeyine etkisinin incelenmesi.

Tarama testlerinde Ulusal Referans Laboratuvar olan PVKAE Kalıntı İzleme Laboratuvarının referans metotları kullanıldı. Bu yöntem aynı zamanda AB'nin referans laboratuvarı (Community Reference Laboratory -CRL) olan Berlin- BVL'in referans metotlarıdır (37).

Doğrulama testlerinde ise AB nin referans laboratuvarlarından olan AFSSA-Fransa'nın kullandığı Referans metod (23) ve yine AB tarafından onaylanmış olan Rosen (51)'nin metotları rehberliğinde çalışmalar yürütüldü.

3.1. Amaç:

Amacımız kanatlı dokularında iyonofor grubu antikoksidial (Monensin, Narasin) ilaç kalıntılarının LC-MS-MS Sistemi ile tarama ve doğrulama analizlerinin yapılmasıdır.

3.2. Uygulama Alanı:

Kanatlı dokularında iyonofor grubu ilaç kalıntılarının analizi için standart madde çözeltilerinin hazırlanması, numunelerin hazırlanması, metot validasyonu, cihaz performans testlerinin yapılması, kısaca genel ekstraksiyon ve elde edilen eluatların analitik sistemlerde ölçümünü kapsayan bir çalışma alanıdır.

3.3. Test Yöntemi:

Koksidiyostat ilaç kalıntılarının analizlerinde numunenin organik yapısı ile kimyasal maddenin ayrıştırılması amacıyla uygun organik çözücülerle ekstraksiyon–purifikasyon işlemleri ve ardından analitik sistemler üzerinde ölçüm amacıyla kromatografik değerlendirme çalışmalarını içermektedir.

3.3.1. Ekstraksiyon ve Analiz

Numunenin Hazırlanması basamakları:

Ekstraksiyon - purifikasyon bölümü 3 aşamada gerçekleştirilir;

- 1- Antikoksidial ilaçların organik çözücü asetonitril ile kas dokusundan ayrıştırılması,
- 2- Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
- 3- Zymark sistemi ile örnek zenginleştirme işlemi yapılır.

3.3.2 Analitik değerlendirme:

Analitik sistemler üzerinde birbirini takip eden 2 çalışma yürütülür;

- 1- LC-MS-MS sistemi ile tarama,

2- LC-MS-MS doğrulama analizinin yapılması.

3.4. Test Metodunun Gereçleri ve Ekstraksiyonu

Kullanılan Ekipman

- 15 ml’lik deney tüpü, (Schott Duran)
- 75ml’lik şilifli kapaklı santrifüj tüpü, (Schott Duran)
- Balon Joje 50 (Inter-lab)
- Balon Joje (Schott Duran)
- Beher – glass (Inter -Lab)
- Vorteks karıştırıcı Heidolph)
- Soğutmalı santrifüj (Sigma)
- Lineer shaker çalkalayıcı (Heidolph)
- Azot evaporatörü (Zymark)
- Ultrasonik su banyosu (Heidolph)
- Thermo Finnigan TSQ LC-MS-MS sistem
- Gold Tandem MSMS sistem

Kimyasal Malzemeler

- Asetonitril, (Merck, HPLC grade)
- Metanol, (Merck, HPLC grade)
- NaOH (J.T.Baker)
- Amonyum acetat (J.T.Baker)
- n-Hekzan, (Reagent grade) Rhidel
- Toluen, (Merck, HPLC grade)
- Tetrahidrofuran (Riedel de Haen)
- Formik asit (Merck, Reagent Grade)

Referans standartlar: Monensin, Narasin, (Sigma) analiz sertifikası bilgileri aşağıda tablo 3 ve 4 de yer almaktadır.

Product name	Monensin sodium salt (% 90 - 95)
Product number	M 5273
Product brand	Sigma
Molecular Formula	$C_{36}H_{61}NaO_{11}$
Cas number	22373-78-0
Molecular weight	692-85
Storage temp.	2-8 °C

Tablo 3 : Referans Standart - Monensin – Na, analiz sertifikası,

Product name	Narasin from Strept.auriofaciens, (% 97)
Product number	N1271
Product brand	Sigma
Molecular Formula	$C_{43}H_{72}O_{11}$
Cas number	SS134-13-9
Molecular weight	765.03
Storage temp.	2-8 °C

Tablo 4: Referans Standart – Narasin, analiz sertifikası,

LC-MS ile Tarama Analizi:

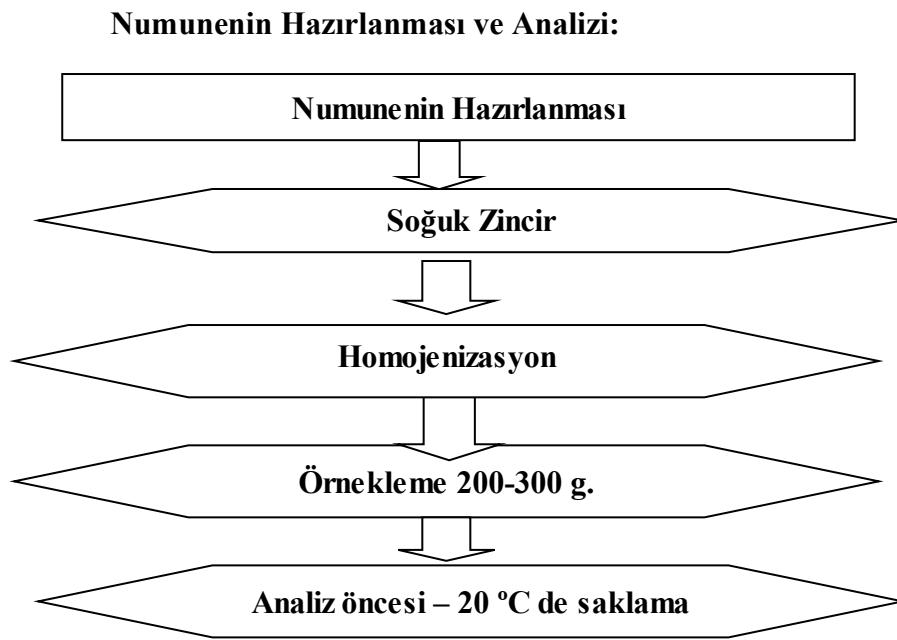
- Likit Kromatografi Şartları
- HPLC pompası: Thermo Finnigan Surveyor LC Pump
- Otomatik enjektör: Thermo Finnigan Surveyor Autosampler
- LC Kolon: C-18, Phenomenex Synergy Max RP 2.1x150mm 5u
- Kolon fırın sıcaklığı:40°C
- Enjeksiyon hacmi: 25µl
- Akış hızı: 0.3ml/dk
- Mobil faz : %60 Asetonitril + %25 0.1M Amonyum asetat + %10 Metanol + %5 Tetrahidrofuran + %0.2 Formik asit
- Akış Programı: 0-25dk. İzokratik

MS Şartları:

- MS dedektör: Thermo Finnigan TSQ LC-MS-MS
- Bilgi işlem: Xcalibur 1.4 Software - DELL
- İyonizasyon metodu: ESI
- İyon dedeksiyon modu: SRM
- Taranacak İyon Değerleri

İsim	Kütle (MS1)	Ürün İyonlar (MSMS)
Monensin	693.7	675.4 - 461.3
Narasin	787.8	431.3 - 531.4

Tablo 5: Monensin ve narasinin tarama testlerinde MS1 kütle ve MSMS iyon değerleri



Şekil 1: Analiz öncesi numune hazırlama işlemleri:

Numune hazırlanırken dikkat edilmesi gereken önemli adımlar vardır, numune alımından analiz öncesi süreçte soğuk şartların buzdolabında 2–8 °C sağlanması, doku numunesinin bir blender kullanılarak homojen hale getirilmesi, buradan örnekleme yapılarak 200–300 g kadar numune alınması ve analiz edilene kadar -20 °C’de muhafaza edilmesi temel prensiplerdir.

Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Stok Standart Çözeltilerin Hazırlanması:

Stok standartlar 10 mg tartılarak 10 ml’lik balon jode metanol ile çözülerek ayrı ayrı hazırlanır (1000 µg/ml).

Çalışma Standart Çözeltilerin Hazırlanması:

Çalışma standartları asetonitrile: su (3:1) ile seyreltilerek hazırlanır.

Analiz metodunda tavsiye edilen veya standart maddenin en iyi, en stabil çözündüğü çözücüye göre uygun solvent kullanılarak çalışma çözeltileri hazırlanır. Monensin ve narasin için, tespit limiti ve hesaplanabilir limitler baz alınarak çalışma standart çözeltileri bu seviyelere göre hazırlandı. Monensin çalışma çözeltileri MRL 8 ppb olması nedeniyle, sırasıyla 20,10, 8,7,6,5,4,3,2,0 ppb konsantrasyonda çalışma çözeltileri hazırlandı.

Narasin çalışma çözeltileri ise MRL 50 µg/kg. (ppb) olması nedeniyle 100,50,20,10,5,1,0 ppb düzeylerinde hazırlandı.

Çalışma sırasında bu konsantrasyonlar gerektiği zaman değişik oranlarda çoğaltılabilmektedir.

Numunenin Analize Hazırlanması (Ekstraksiyon)

75ml'lik santrifüj tüpüne 10.0g doku tartılır,	
Üzerine 15ml asetonitril ve 2ml saf su eklenerek 30 sn vorteks ile homojen hale getirilir	
10 dk ultrasonik banyoda bekletilerek karışım ve homojenizasyon tamamlanır.	
4°C, 3000rpm'de 10dk santrifüj edilir,	
Üst fazın 2,5ml'si 25ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır ve buna 4ml 0,5M NaOH çözeltisi ile 10ml Hekzan + Toluen (1:1) çözeltisi eklenir,	
30 sn vorteks karıştırıcı ile karıştırılır	
4°C , 3000 rpm'de 10dk. santrifüj edilir	
Üst faz ayrılarak 15ml'lik deney tüpüne aktarılır,	
Alt faza 5ml Hekzan + Toluen (1:1) çözeltisi eklenir,	
30 sn vorteks karıştırıcı ile karıştırılır	
4°C , 3000 rpm'de 10dk santrifüj edilir	
Üst faz ayrılarak birinci üst faz ile birleştirilir	
Toplanan eluatlar (1.ve 2. üst fazlar) N ₂ altında 60 °C'de uçurulur,	
Tüpteki kalıntı 300 µl metanol + su (75:25) çözeltisi ile 30 sn. Vorteksenerek çözdürülür ve insert vial e aktarılır	

Sekil 2: Ekstraksiyon basamakları

3.4.7. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması:

Sonuçlar, pozitif ya da negatif olarak değerlendirilir. Pozitif olarak alınan değerler için performans testlerindeki parametreler kullanılarak gerialım kazancı ve standart sapmaların varlığında hesaplama yapılır. Elde edilen kromatografik şekillerde alan hesabı üzerinden hareket edilir. Standart çözelti ile numune çözeltilerinin kıyaslaması esasına dayanan ve dilusyon faktörlerinin ve klasik olarak belirsizlik hesaplarının da katılımıyla ölçüm yapılır. Herhangi bir analiz sonucunun değerlendirilebilmesi için elde edilen kromatogramların alan değerlerinin karşılığı

tespit limiti (LOD) düzeyinde olması, miktar tayini için hesaplanabilir limit (LOQ) düzeyinde olması gerekir. Buna göre numunelerin değerlendirilmesinde kalıntı değerleri bulunmuş ise pozitif, bulunamamış ise negatif olarak değerlendirilir.

Negatif sonuçlar “Tespit edilebilir düzeyde bulunmamıştır” şeklinde raporlanır. Pozitif sonuçlar için hesaplama kontrol numunelerinin analizi ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi ($y = ax \pm b$) kullanılarak hesaplanır. (y: Piklerin alanı, x:Konsantrasyon, a ve b: Doğrudan bulunan sabit sayılar).

3.5.8.LC-MSMS ile Doğrulama Analizleri

- Gold Tandem MSMS Analitik sistem özellikleri
- LC: Gold Liquid Chromatography
- LC-MSMS dedektor: GOLD LC-MSMS, ZIVAK Ltd. Şti.
- Dedektör: Gold Tandem MSMS Triple quadrapol,
- Bilgi işlem: Xcalibur
- LC- Kolon : C-18, Synergi max RP, 20 x 2.0 mm; 5µ
- Mobil Faz: Metanol + Am.asetate (0.1 M).
- Gradient Akış Programı : Çöz. A ve Çöz. B
- Analiz süresi: 6 dakika İyonizasyon metodu: ESI (+)
- İyon dedeksiyon modu : SRM
- Enj. Vol: 20 µl

Doğrulama Testlerinde Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplamanın Yapılması:

- Tarama testleriyle elde edilen sonuçlardan pozitif, negatif veya şüpheli olarak tespit edilen numuneler doğrulama amacıyla daha hassas olan analitik sistem ile teyid edilir.
- Negatif bulunan test sonuçlarından örnekleme yoluyla her 20 numuneden 1 adet alınarak yeniden LC-MSMS de kontrol edilir ve böylece hatalı bir negatif durum olasılığını azaltılmış olur.
- Pozitif veya şüpheli bulunan test örnekleri de LC-MSMS de doğrulanır ve cihazdan alınan sonuçlara göre hesaplamaları yapılarak raporlandırılır.
- Pozitif sonuçlar için hesaplama kontrol numunelerinin analizi ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi ($y = ax + b$) kullanılarak hesaplanır. (y: Piklerin alanı, x: Konsantrasyon, a ve b: Doğrudan bulunan sabit sayılar).
- Ayrıca LC-MS veya LC-MSMS gibi analitik sistemlerde elde edilen test sonuçlarının doğrulanması ve hesaplamalarda bir örnekliliğin sağlanması amacıyla geliştirilen hesaplama programları, Software yazılımları da kullanılabilir. AB tarafından da onaylanan bu yöntemler üye ülkelerin referans ve sorumlu laboratuvarlarına kayıt altında verilmektedir.

UYGULAMA ESASLARI:

Metot performans kontrolü ve doğrulama (konfirmasyon) çalışmaları:

Tarama testi metotları (37) ve doğrulama testlerinde kullanılan analiz metotlarının (23,51) performans çalışmaları, spike dokularda kalıntı düzeyinin ölçülmesi işlemleri yürütülür.

1. Bulgular bölümünde 4.1. de detaylarıyla anlatıldığı üzere analitik çalışmalara başlamadan önce laboratuvar imkanları doğrultusunda referans alınan metodların (23,37,51) rehberliğinde çalışmalar için ön hazırlıklar yapılır ve performans değerleri ölçülür. Metot performans çalışmalarında istenilen verimlilik sağlandıktan sonra adım adım hedeflenen çalışmalara geçilir.

2. Piyasa araştırması için toplanan tavuk eti ve yumurta örneklerinin analiz sonuçlarının irdelenmesi ve laboratuvar ortamında spike dokulardan geri alım kazancı, tekrarlanabilirlik, kesinlik ve doğrusalılık gibi temel performans değerlerinin test edilmesi çalışmaları yapılır.

3. Yedirme deneme çalışmalarında (in vivo) broylerlerden alınan doku örneklerinde kalıntı düzeylerinin tayini için belirlenen yöntemle göre işlemler yapılır.

4. Isı faktörlerinin etkilerinin araştırılması, in vitro ve in vivo şartlarda kalıntı üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla gerekli çalışmalar düzenlenir.

3.5.2. İstanbul'da piyasaya sunulmuş olan tavuk eti ve yumurtalarda monensin ve narasin kalıntılarının araştırılması:

Piyasa araştırması için İstanbul'un farklı semtlerinde market, bakkal gibi tüketimin son ayağı olan noktalarda reel denetim yapılması öncelikli, esastır. Bu nedenle öncelikle deneysel şartlarda laboratuvar ortamında (invitro) spike dokulardan, geri alım kazancı, tekrarlanabilirlik, kesinlik ve doğrusalılık gibi temel performans değerlerinin test edilmesi çalışmaları tamamlandı. Daha sonra piyasadan toplanan tavuk eti ve yumurta örneklerinin analiz yapılarak sonuçlarının irdelenmesi esasları uygulandı.

Yukarıda söz edilen prensipler doğrultusunda, İstanbul'un değişik semtlerinde büyük küçük market ve şarküteri reyonlarından alınan numuneler Pendik VKAE laboratuvarlarında yapılacak analiz için araştırma kayıt formuna kayıt edildi.

Tavuk dokularındaki (et ve yumurta) kalıntı analizi için referans yöntemlere göre ekstraksiyonlar yapılarak azot gazı altında kuruluğa kadar uçuruldu. Ağzı kapaklı tüplerle analiz sırası gelinceye kadar buzdolabı şartlarında muhafaza edildi. Numuneler cihaza verileceği zaman kayıt işlemlerinde verilen kodlama sistemiyle LC MS-MS sistemlerinde analiz edildi.

Değişik üretim kaynaklarından getirilerek İstanbul'daki market ve bakkallarda tüketime sunulan yumurta ve tavuk etlerinden örnekleme prensibiyle 150'şer adet numune alındı.

Analitik cihazların kalibrasyon ve performans testleri, ardından metot performans testleri yapıldı. Şartlar uygun hale geldiğinde önceden ekstrakte edilmiş ve azot gazı ile örnek zenginleştirmek üzere kurutulmuş numuneler Asetonitril / Su (75/25) ile çözülerek cihaza enjekte edildi.

3.5.3. Yedirme deneme çalışmalarında (in vivo) broylerlerden alınan doku örneklerinde kalıntı düzeylerinin tayini.

Antikoksidial ilaçlardan monensin ve narasinin broyler dokularında kalıntı düzeylerinin zamana bağlı değişimini incelemek amacıyla 21 günlük piliçlerden oluşan deney gruplarına bir yedirme programı uygulandı.

Genel olarak planlandığı üzere monensin ve narasin ilaveli yemle beslenen 50 + 50 toplam 100 adet ve kontrol grubu da 20 adet olmak üzere 120 adet broyler 7 gün içinde kesime sevk edildi. Tedbir olarak herhangi bir nedenle ölüm veya hastalık durumuna karşı başlangıçta tavuk sayısı 150 adet denemeye alındı. Ancak tavukların kesimleri önceden planlandığı üzere belirlenen sayılarda gerçekleştirildi.

Çalışma Düzeni içerisinde belirlenen programa göre, deneme gruplarının belirlenmesi, koksidiyostatların yeme ilave oranlarının belirlenmesi ve hazırlanması, kesim işlemleri için planlama ve kayıtlarının tutularak paketlenmesi işlemleri sırasıyla yürütüldü.

Monensin (M Gr.) ve Narasin (N Gr.) grubu olmak üzere kümeşte iki deneme bölümü ve bir de **Kontrol (K Gr.)** grubu olmak üzere üç ayrı çalışma alanı düzenlendi. 21 günlükten itibaren belirlenen 2 ayrı gruba sırasıyla monensin ve narasin ihtiva eden katkılı yemler verildi. Kontrol grubu ise antikoksidial içermeyen yemlerle beslenmeye devam edildi. Kesime başlanma saatinden itibaren katkılı yemler toplandı ve antikoksidial içermeyen normal yemle (kesim öncesi yemi) beslenmeye devam edildi.

Monensin Sodium (Elancoban G-100) ve Narasin (Monteban G-100) Türkiyede ruhsat sahibi olan Lily-Elanco Firmasından temin edildi. Yeme katılmak üzere hazırlanmış formda olan numunelerden Monensin-Na. Yeme 100-125 mg/kg (ppm) oranında, narasin ise 60 -70 mg/kg (ppm) düzeyinde katılması ve etiket bilgileri doğrultusunda uygulama yapılması önerilmektedir. Broylerlere uygulanacak antikoksidiallerden M grubu için monensinden 100 mg/kg-yem ve narasinden 60 mg/kg-yem düzeyinde olmak üzere ayarlanmış formulasyondan uygun oranlarda ilave edildi. Yeme katılmak üzere hazır halde olan monensin ve narasin önce hassas bir şekilde tartılarak homojen karışım sağlamak amacıyla 1 kg.'lık yeme karıştırıldı. Sonra 1 kg.lık karışım 10

kg.lık yeme karıştırılarak önceden ayrılmış olana gruplara yedirilmek üzere yemliklere aktarıldı.

Kontrol grubuna ise önceden hazırlanmış olan ve herhangi bir antikoksidial içermeyen broyler besi yeminden verilerek benzer şartlarda denemeye alındı. Gerek bu yemler ve gerekse bu yemle beslenen broyler dokuları test edilerek iyonofor içermediği teyid edildi. 10 gün süreyle antikoksidial ilaveli yemle beslenen kanatlı grupları M, N ve K grubu olacak şekilde ayrı bölmelerde uygun sıcaklık ve sağlıklı bir ortamda beslendi.

Broyler yemlerine ayrı gruplar için sırasıyla monensin ve narasin ilave edilerek ve kontrol grubu için de herhangi bir antikoksidial içermeyen yem ile 10 gün süreyle beslenmesi ve süre sonunda kesime sevk edildi. İn vivo olarak canlı organizma üzerinde monensin ve narasin kalıntılarının ölçülmesi çalışmaları yapıldı. Tavukların kas ve karaciğer dokularında kalıntı düzeyi, kesim öncesi bekleme süresi içerisinde 1,3,5 ve 7. günleri kapsayan süreçte dokulardan monensin ve narasin kalıntılarının zamana bağlı olarak azalımı izlendi.

3.5.4.Yemleme Sonrası Broylerlerin Kesim Programı:

3.5.4.1. 1.gün kesimleri:

Monensin grubu (M Grup) ve Narasin grubu (N Grup) olarak 2 ayrı bölümde çalışıldı.

1 gün kesimleri gün öğleden önce ve öğleden sonra olmak üzere iki grup kesim yapıldı.

Diğer günlerde 3, 5 ve 7. günlerde hep aynı zaman diliminde sabahdan kesim yapıldı.

3.5.4.2. Monensin grubu (M Grup) için;

1 gün: 20 ad. M grubu ve 4 adet kontrol grubu,

3.gün 10 ad, M grubu ve 2 adet kontrol grubu,

5.gün 10 ad, M grubu ve 2 adet kontrol grubu,

7 gün 10 ad. M grubu ve 2 adet kontrol grubu olmak üzere,

Toplam olarak 50 adet M grubundan kesim yapıldı. Her bir kesim gününe paralel olarak toplam 10 adet kontrol grubundan (K grup) kesim yapıldı.

3.5.4.3. Narasin grubu (N Grup) için;

3.5.4.2 de belirtilen Monensin grubu programı Narasin grubu için de uygulandı.

Toplamda 50 adet N grubundan kesim yapıldı. Her bir kesim gününe paralel olarak toplam 10 adet kontrol grubundan (K grup) kesim yapıldı.

Genel Toplam: 120 ad. Tavuk üzerinde çalışıldı.

İlk gün kesilen tavukların kas ve karaciğer dokularında kalıntı düzeyi ölçülmesi için öncelikle numune hazırlama ve ekstraksiyon işlemleri hızla tamamlandı ve cihaza verilmek üzere hazırlandı.

Kesim sonrası numunelerin laboratuara transfer edilmesi ve ekstraksiyon süresince 0 °C - 4

°C buzdolabı şartlarında 3–4 gün bekletildi.

Aynı zamanda her iki grubu temsilen 18'er adet ad. tavuk numunesi ortadan ikiye bölünerek yapılacak analitik gruplara pay edildi.

Monensin – M grubundan 1 gün 1.seri kesimden 1 adet tavuk parçalanarak 4 grup numune oluşturuldu. 1M–1 KAS–1, 1M–1 MIX–1 veya 1M -1 KC -1 şeklinde kodlanarak her biri ayrı ayrı analiz edilmek üzere paketlenildi.

3.5.5. Monensin ilaveli yemle beslenen tavuklar için (M Gr) analiz planı;

Isı faktörlerinin koksidiyostat ajanlar üzerine etkisini incelemek amacıyla; kızartma, haşlama ve dondurma işlemlerine tabii tutularak olası değişimlerin belirlenmesi esas alınmıştır.

Yenilebilir dokular kemik ve kıkırdak dokularından ayrılarak önceden hazırlanmış olan ağızları kapalı numune kaplarına yerleştirildi.

Hazırlanan bu numunelerin; Bir bölümü normal şartlarda analiz için, bir bölümü – 20 °C' de dondurma testi için, bir bölümü kızartma testi ve bir bölümü haşlama testi ile ısı faktörünün kalıntı üzerine etkisini incelemek için kullanıldı. Detayları 3.5.7 de verildiği üzere hazırlanan numuneler sırasıyla analize hazırlandı.

3.5.5.1. Numune grubu 1: 1. grup ilk analiz için laboratuarda ekstraksiyon amacıyla dokulardaki kalıntı seviyesinin tespiti için ayrıldı. Yaklaşık 250 g'lık bir kas doku homojenize edilerek içinden analiz metoduna göre paralel 2 şer numune oluşturuldu. Aynı zamanda 2 paralel de karaciğer dokusundan numune hazırlandı.

3.5.5.2. Numune grubu 2: Kesim sonrası yaklaşık 250 g'lık bir kısım dondurulmak üzere -20 °C de saklanması için derin dondurucuya yerleştirildi. Her bir numuneye kodlama yapılarak ve ayrı ayrı kilitli poşetlere koyarak önce 0-4 °C arasında 1 gün bekletildi sonra -20 °C' ye yerleştirildi. 10 gün sonunda analiz için 1 gün süreyle çözünmesi için buzdolabında 4 °C'de bekletilerek her bir numune 2'şer paralel çalışıldı.

3.5.5.3. Numune grubu 3: Kesim sonrası 250 g'lık bir doku parçası ısı faktörlerinin etkisinin araştırılması amacıyla yaklaşık 15 dakika süreyle haşlama işlemi uygulanmak üzere buzdolabı sıcaklığında 0-4 °C bekletildi. Analiz sırasında her bir numune 2'şer paralel çalışıldı.

3.5.5.4. Numune grubu 4: Kesim sonrası 250 g'lık bir doku parçasına kalıntılar üzerinde kızartmanın etkisini inceleme üzere sabit sıcaklıkta elektrikli mangalda yaklaşık 15 dakika kızartılması amacıyla buzdolabına yerleştirilerek bekletildi. Her bir numune 2'şer paralel çalışıldı.

3.5.5.5. Kontrol grubu: Kontrol grubundan her 4 grubu temsilen, aynı şartlarda analize alınması için numune ayrılmış ve uygun şartlarda saklanmıştır.

3.5.6. Narasin ilaveli yemle beslenen tavuklar için (N grubu) analiz planı:

Monensin grubunda olduğu gibi numuneler tasnif edilerek uygun şartlarda saklanmış ve analize alınmak üzere aynı işlemler tekrarlanmıştır.

3.5.7. Kesim İşlemleri:

Kesim işlemi kurallara uygun olarak hijyenik şartlara riayet edilerek yapıldı.

Tarpak Belediyesine ait kesim hane içinde temiz bir ortam ayarlandı. Grupları temsilen özel bölmelere ayrılmış olan tavuklar ayaklarına grup ve kesim serisini belirten numaralar etiketlendi. Kesim sırasında deftere kayıt yapılarak bir düzen içinde sırasıyla kesimler yapıldı.

Kesimhane içinde kurulmuş olan kesim düzeneğine göre kesilen tavuklar askı siteminde bir süre bekletilerek kanlarının iyice akması sağlandı. Her bir seri kesimi zamanlama olarak aynı zaman dilimi içinde kesildi ve kayıt edildi. Örneğin 1.gün kesimleri her bir grup için aynı sayıda ve sürede kesime alındı. Kesim işlemleri bir tavuk kesim hanesindeki şartlara uygun yapıldı.

Kesilen tavukların derileri yüzülerek temiz bir şekilde çıkarıldı. Masa üzerinde her bir tavuk için ayrı ayrı hazırlanmış olan ambalaj kağıtları kullanıldı. İşlem sonrası atıklar bu ambalaj kağıtlarıyla birlikte kaldırılarak temizlendi. Derisi yüzülen tavuklar diseksiyon tekniğine göre karından göğüs kısmına doğru açıldı, yanlara doğru kanat ve butlar ayrıldı ve iç organlar çıkarıldı. Karaciğer organı temiz bir küçük kilitli ambalaj poşete alındı, kursak, bağırsaklar ve ihtiyaç dışı organlar atık bölüme ayrıldı.

Analizde kullanılacak dokular but, göğüs ve karaciğer olarak numaralandırılmış ambalaj kutularına konularak soğuk şartlarda muhafaza edildi (buzdolabı, 4 °C) Analiz için Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne transfer edildi. Enstitüde araştırma yapılacak konulara göre her bir tavuk numunesi temsil ettiği gruba göre 4 parçaya ayrıldı.

Kemik ve kıkırdak dokularından ayrılarak yenilebilir dokular önceden hazırlanmış olan ağızları kapalı numune kaplarına yerleştirildi. Hazırlanan bu numunelerin;

- 1- Bir bölümü normal şartlarda analiz için,
- 2- Bir bölümü – 20 °C saklanarak dondurmanın kalıntı üzerine etkisini araştırmak için,
- 3- Bir bölümü mangalda kızartma tekniği ile pişirme işleminde ısı faktörünün kalıntı üzerine etkisini incelemek için,
- 4- Bir bölümü tencerede haşlama tekniği ile ısı faktörünün kalıntı üzerine etkisini incelemek için kullanıldı.

3.5.8. Normal (işlem görmemiş çiğ) dokularda analiz için yapılan hazırlık:

Denemeye alınan yani ilaçlı yem yedirilen tavukların kesimi sonrasında ilk analiz grubu normal olarak tüketime sunulan şartlarda analize alındı. Her bir grup için yaklaşık 200–250 g tavuk eti numunesinin yaklaşık bir çeyrek bölümü ($\frac{1}{4}$) ve karaciğer numunesi alındı Bu numuneler ekstraksiyon işlemi için kalıntı izleme laboratuvarı ekstraksiyon odasında ulusal referans yöntemine göre analiz edildi

3.5.9. Isı faktörlerinin kalıntı düzeyine etkisinin analizi için yapılan çalışmalar:

3.5.9.1. Dondurma işlemi: Bir tavuk numunesinin bir çeyrek bölümü ($\frac{1}{4}$) - 20 °C de muhafaza edilmek üzere numune saklama kaplarına konarak önce buzdolabında bekletildi ve 1 gün sonra – 20 °C derin donduruculara yerleştirildi. 10 gün sonunda dondurucudan alınan numuneler 1 gün süreyle çözünmesi için buzdolabı şartlarında bekletildi ve sonra ekstrakte edilerek yine azot altında uçuruldu ve tüplere alınarak analiz için kullanıldı.

3.5.9.2. Kızartma işlemi : Üçüncü çeyrek bölüm ise ($\frac{1}{4}$) Türk halkının tavuk pişirme usullerinden biri olan kızartma işlemine tabii tutulmak üzere elektrikli mangalda pişirmek üzere ayrılmış olan numune kaplarına alındı. Genel olarak but ve göğüs kısmı temsil eden numuneler alınmasına dikkat edildi. Kızartma işlemi yaklaşık 15 dakika sürdü.

3.5.9.3. Haşlama işlemi: Dördüncü çeyrek kısım ise ($\frac{1}{4}$) yine Türk halkının tavuk pişirme yöntemlerinden biri olan tencerede haşlama işlemine tabii tutulmak üzere ayrı bir numune hazırlama kabına konuldu. Her birinin üzeri işlem adı, sırası ve grup adı olmak üzere etiketlendi. Analiz yapılacağı zaman sabit sıcaklık ve basınç altında elektrikli düdüklü tencerede bir beher içinde ağızlarında alüminyum folyo kapalı olarak yerleştirildi. Bundaki amaç oluşacak su buharının beher içinde kalmasını sağlamaktır. Analiz sırasında numune içine 250 gram dokuya 50 ml. su ilave edildi. Pişirme süresi 25 dakika olarak belirlendi.

Laboratuara alınan tavuk numuneleri gruplarına ve analiz işlemi sırasına göre ayrıldıktan sonra buzdolabına yerleştirildi, - 20 °C ye konacak olanlar 24 saat sonra derin dondurucuya aktarıldı. Diğer gruplardan normal doku analizleri için öncelik verilerek ilk hafta analize başlandı. 1.ve 3. gün kesimleri bir grup olarak ilk hafta hazırlandı. 5 ve 7. gün kesimleri ise kesimi takip eden ilk hafta içerisinde toplam 14 gün içinde normal doku analizlerinin ekstraksiyonları da dahil olmak üzere tamamlandı. Derin dondurucuya konulan numuneler 10 gün sonrasında 1 hafta içinde analize alınarak ekstrakte edildi.

3.5.10. VERİLERİN ANALİZİ

Numunelerin hazırlanması blümü 3.4.3, standartların hazırlanması bölümü 3.4.4. ve ekstraksiyon basamakları bölümü 3.4.5’de detayları açıklandığı üzere numuneler hazırlanarak analiz için cihaza verilecek hale getirildi. Çalışma planına uygun olarak hazırlanan numuneler analitik cihazlara verilerek ölçümler yapıldı.

LC-MS ve LC-MSMS sistemlerinde numunelerin analizlerinin neticesinde alınan kromatografik değerlerin hesaplanması ve verilerin karşılaştırılması, bir gıda maddesinin güvenliğini doğrudan ilgilendirecek hassasiyette sonuçların rapor edilmesi aşamaları önemli bir adımdır.

Monensin ve narasin kalıntıları üzerine ısı faktörlerinin etkilerinin incelenmesi aşamalarında iyonofor antikoksidial kalıntısı içermediği bilinen tavuklardan alınan doku örnekleriyle laboratuvar ortamında spike çalışmaları yapıldı. Bu spike numunelerin kızartma, haşlama ve dondurma testleri sonrasında alınan sonuçları değerlendirildi ve ısı faktörlerinin etkilerinin kalıntı düzeyine etkisi incelendi. Grup içi ve gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Aynı şekilde broilerlere monensin ve narasin ilaveli yem yedirilerek kesim öncesi bekleme süresini temsilen, doku örneklerinde kalıntı düzeyleri ve bunlar üzerinde ısı faktörlerinin etkileri incelendi.

İstatistiksel verilerin değerlendirilmesinde, SPSS istatistik programı (SPSS 9.05 for Windows) ile ANOVA –One way Duncan hesaplama metodu kullanıldı.

4. BULGULAR

Yürütülen tez çalışmamızda elde edilen bulgular 5 bölümde değerlendirildi.

1. Metot doğrulama çalışmaları, tarama ve doğrulama analizlerinde kullanılan metotların performans çalışmaları, spike dokularda kalıntı düzeyinin ölçülmesi.
2. Piyasa araştırması için toplanan tavuk eti ve yumurta örneklerinin analiz sonuçlarının irdelenmesi.
3. Yedirme denemelerinde tavuklardan alınan doku örneklerinde kalıntı düzeylerinin tayini.
4. Isı faktörlerinin kalıntı düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması,
5. Genel değerlendirme

4.1. Metot doğrulama çalışmaları, tarama ve doğrulama analizlerinde kullanılan metotların performans çalışmaları, spike dokularda kalıntı düzeyinin ölçülmesi.

Tarama testlerinde Ulusal Kalıntı İzleme Programında dahilinde, TKB tarafından Ulusal Referans Laboratuvar olarak görevlendirilen Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (PVKAE) Kalıntı İzleme Laboratuvarının referans metotları kullanıldı. Bu yöntem AB'nin referans laboratuvarı (Community Reference Laboratory -CRL) olan Berlin-BVL'in referans metotlarıdır. EU-TAIEX eğitim organizasyonu çalışmaları içerisinde verilmiş ve ring testleriyle metot uygunluğu onaylanmıştır (37).

Doğrulama testlerinde ise AB'nin referans laboratuvarlarından olan AFSSA-Fransa'nın kullandığı Referans metot (23) ve yine AB tarafından onaylanmış olan Rosen (51) 'nin metotları rehberliğinde çalışmalar yürütüldü.

Bu metotların kullanımı ve performans değerleri tarama ve doğrulama olarak iki bölümde takdir edilmektedir.

4.1.1. LC-MSMS sisteminde Tarama Analizleri (Screening Test).

4.1.2. LC-MSMS Doğrulama Analizleri (Confirmation Test).

4.1.1. LC-MSMS sisteminde Tarama Analizleri (Screening Test).

LC-MSMS sisteminde test edilen iyonofor antikoksidial ilaçların aktif maddelerinin ana molekülünün tanımlanmasında ölçüm parametresi olan molekül değerlerinin (1.kütle) tespit edilmesi. Referans metotlarla paralel bulguların tutarlı olduğu gibi monensin için 693.6 narasin için 787.8 olarak tespit edildi ve ana molekül değerleri stabil olarak belirlendi. Bu değerlerin

ölçülmesindeki analitik parametreler aşağıda tablo 6’da verilmektedir. Buna göre tarama testlerinde alınan analitik kromatogramlar; kromatografik şekiller halinde verilmektedir (Şekil 3,4 ve 5).

Monensin ve narasin için sertifikalı std. lar kullanılmıştır. Her bir seri için 2 şer paralel çalışma yapılarak ve tekrarlanabilirlik ve gerilim kazancı için 6’ar deneme numune enjeksiyonu yapılarak elde edilen verilerin ortalama değerleri alınmıştır.

İyonofor	Kütle	Polarite	T (geliş süre aralığı)	V (uygulanan voltaj)
Monensin	693.6	+	9.3-10.11	110
Narasin	787.8	+	21.0-25.0	120

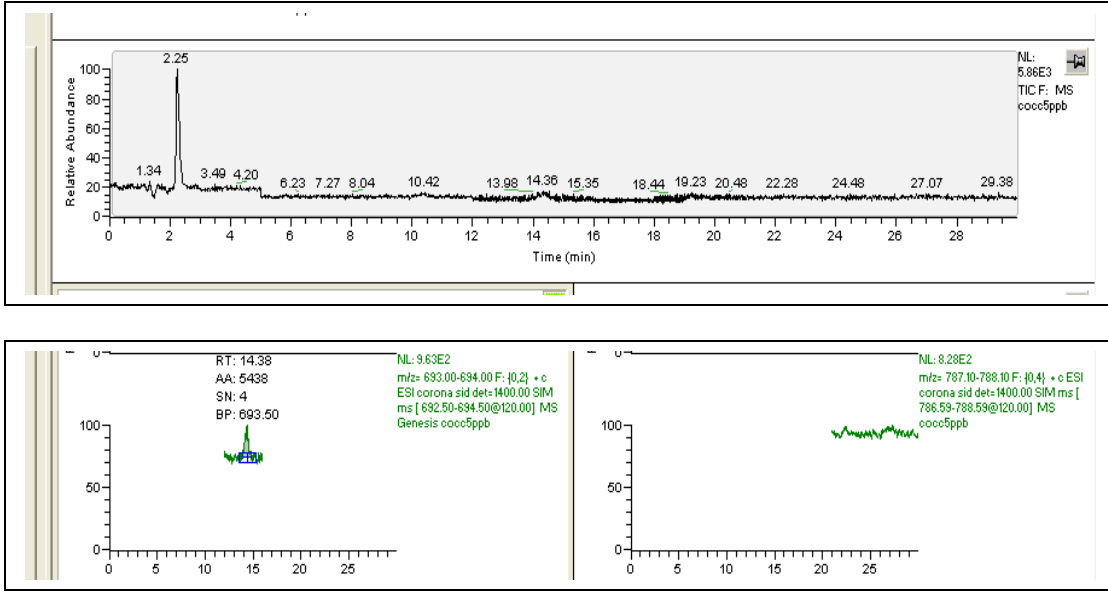
Tablo 6: Monensin ve narasin için tarama testi parametreleri

4.1.1.2.Antikoksidial İlaclar için LC-MS ile Tespit Limiti : LC-MS- sistemiyle yapılan tarama testlerinde monensin için tekrarlanabilir, lineer ve stabil sonuçlar veren 1 ppb düzeyi, geri alım kazançlarına göre hesaplandığında tespit limiti olarak belirlendi. Narasin için 2 ppb olarak belirlendi. Hesaplanabilir limit olarak monensin için 4 ppb, narasin için 5 ppb düzeyinde belirlendi. LC-MS sisteminde metot performans çalışmalarında elde edilen kromatografik bilgiler aşağıdaki şekillerde sunulmaktadır. Çalışma düzenine göre öncelikle iyonofor antikoksidial standart maddelerin miks çözeltileri cihaza enjekte edilerek performans değerleri ölçüldü. Bu amaçla, sırasıyla 1, 5, 10, 20, 50 ve 100 ppb’lik standart çözeltiler kullanıldı. LC-MS sisteminde tespit limiti olarak monensin ve narasin için sırasıyla 1 ppb ve 2 ppb; hesaplanabilir limit olarak ise 4 ppb ve 5 ppb olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik ve geliş zamanı belirlendikten sonra, tavuk eti ve yumurta dokularına önceden hazırlanmış olan standart mix çözeltilerden sırasıyla 1, 5, 10, 20, 50 ve 100 ppb’lik standart yüklemeleri yapılarak ve geri alım kazançları da belirlendi. Doku yüklemesi çalışmalarında geri alım kazançları sırasıyla monensin ve narasin için %80 ve %85 olarak belirlendi.

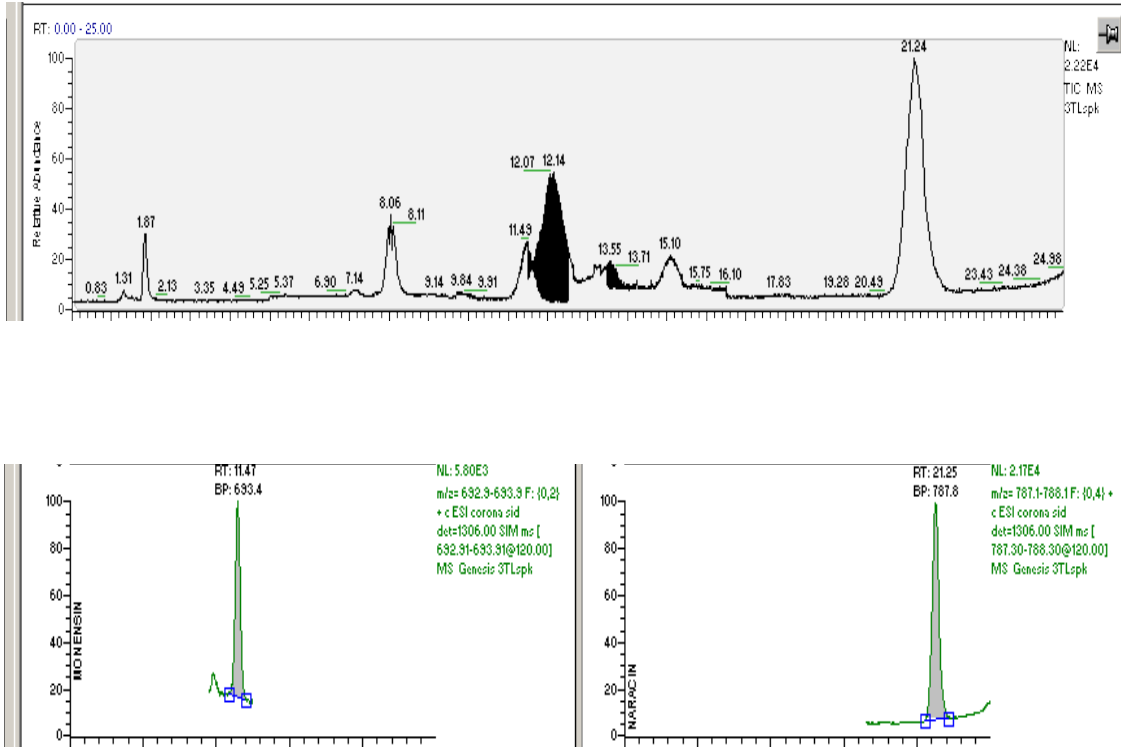
Antikoksidial madde	Tespit limiti (Limit Detection)	Hesaplanabilir limit (Limit Quantitation)	Dedektör	Geri alım kazancı (Recovery)
Monensin	1 ppb	4 ppb	ESI (+)	% 80
Narasin	2 ppb	5 ppb	ESI (+)	% 85

Tablo 7 : LC-MS tarama testleri metot performans değerleri:

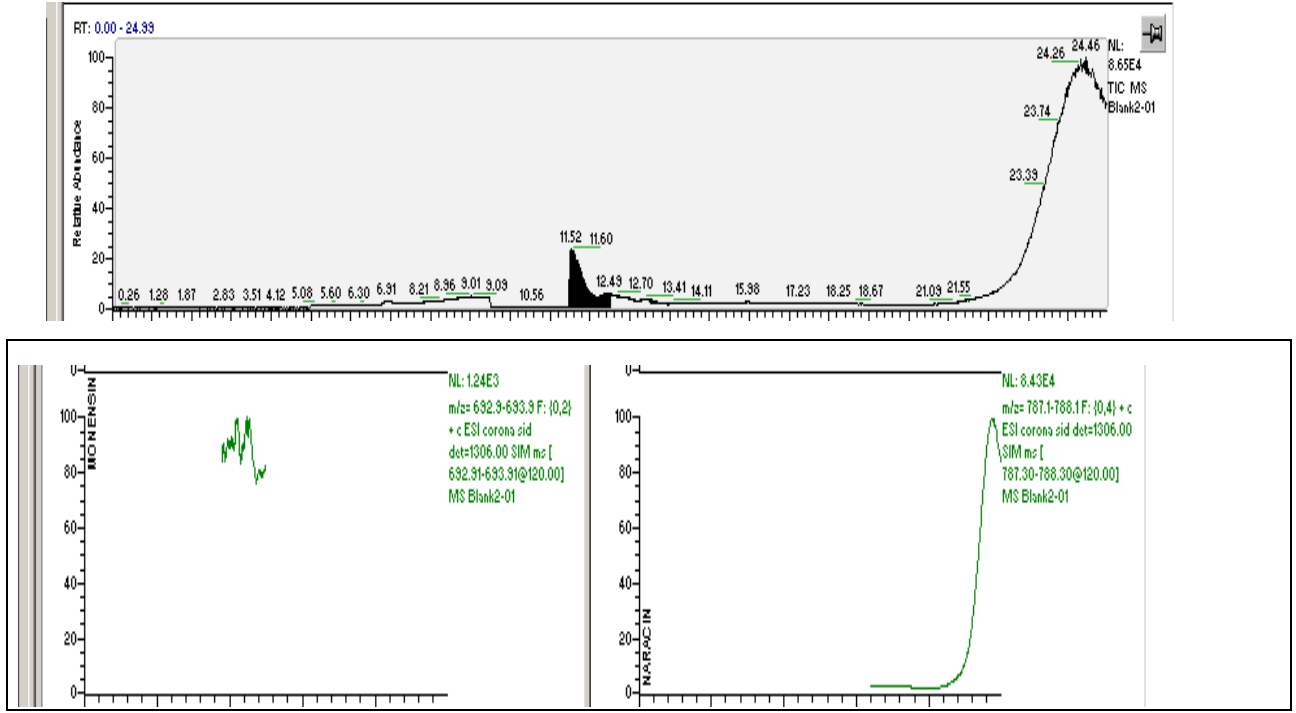
Standart mix enjeksiyonu ve dokuya belirli konsantrasyonlarda standart çözelti katımlarından elde edilen eluatlar LC-MS sistemine verilmesiyle alınan kromatogramlardan birer adet aşağıdaki şekillerde sunulmaktadır.



Şekil 3: Monensin ve narasin standart maddelerinin LC-MS kromatogramları (5 ng/ml Std.mix)

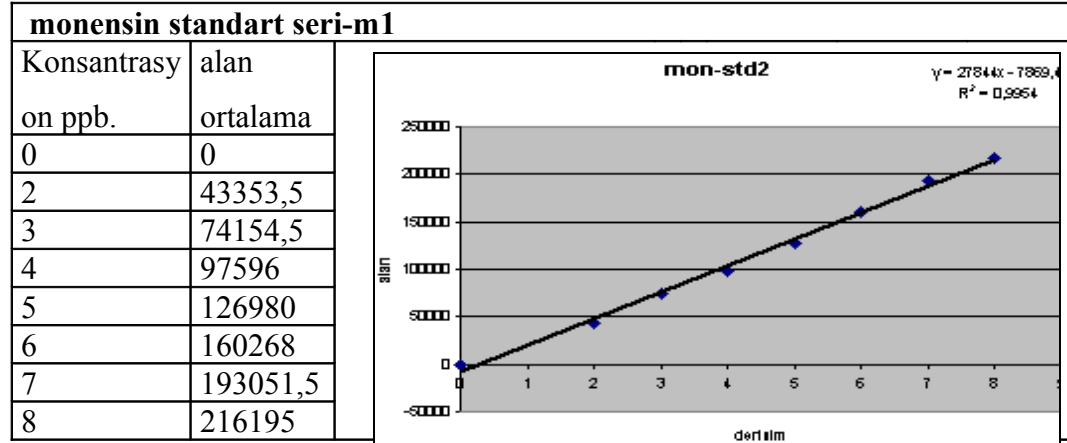


Şekil 4: Hesaplanabilir limit (quantitation) düzeyinde spiked doku kromatogramı



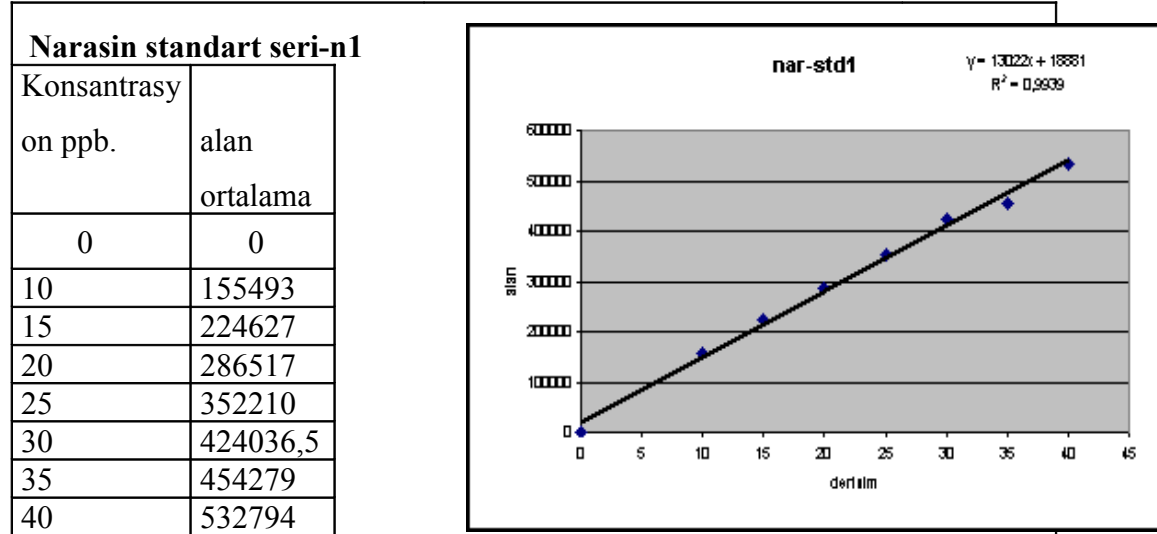
Şekil 5: Spike denemelerinde kontrol grubu (blank) doku kromatogramı:

4.1.1.3. Lineerite Çalışmaları : Doğrusallığın sağlanması için yapılan deneme testlerinde Monensin için sırasıyla, (blank) 0,2,3,4,5,6,7 ve 8 ng/ml -ppb konsantrasyonlarında enjeksiyonlar yapılarak LS-MS de test edildi ve doğrusallık sağlandı ve tespit edilebilir monensin düzeyi (LOD) 1 ppb, hesaplanabilir düzey (LOQ) ise 4 ppb olarak ölçüldü.



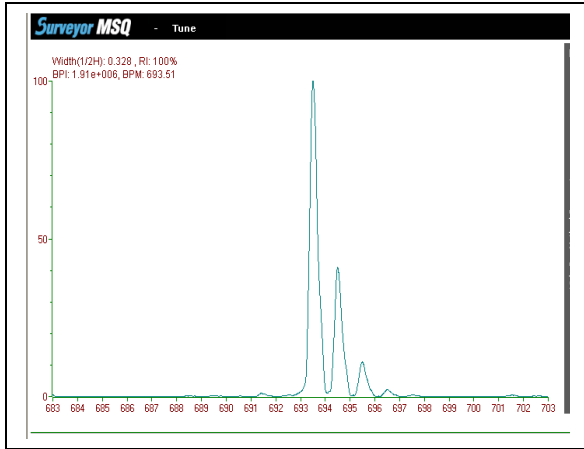
Grafik 1: Monensin lineerite grafiği

Narasinin lineeritesi için LS-MS de yapılan çalışmada cihaza sırasıyla blank, 10,15,20,25,30,35 ve 40 ng/ml – ppb enjeksiyonlarında doğrusallık sağlandı ve tespit edilebilir narasin limiti (LOD) 2 ppb, hesaplanabilir düzey (LOQ) ise 5 ppb olarak ölçüldü.

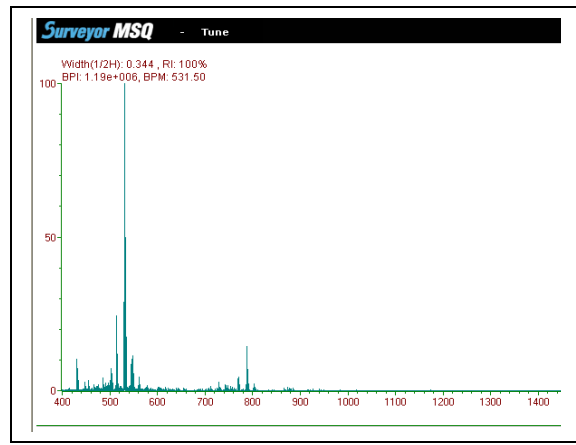


Grafik 2: Narasin lineerite grafiği

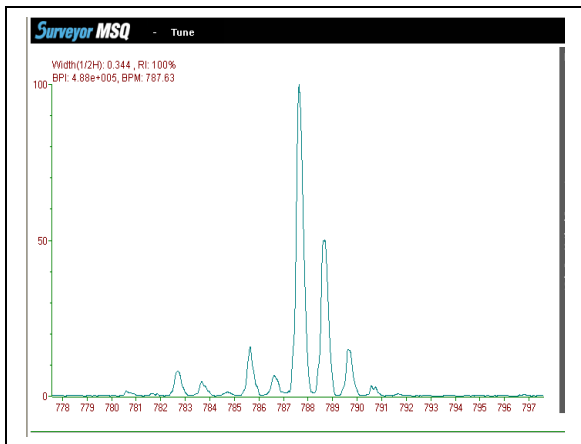
Tarama testlerinde, monensin ve narasin için LC-MS ve LC-MSMS sistemlerinde elde edilen spektrumların görünüşü aşağıda kromatografik şekillerde sunulmaktadır.



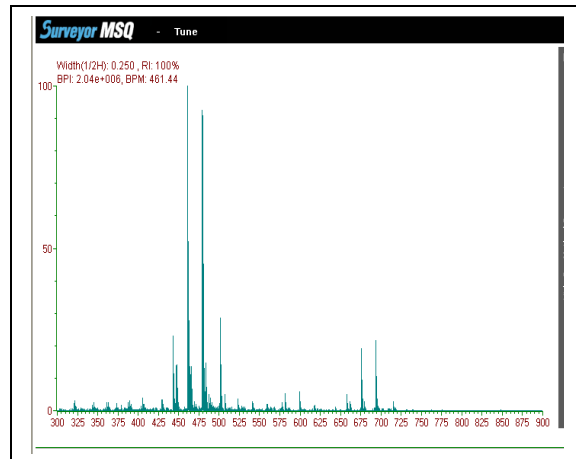
Şekil 6: Monensin-SIM spektrumu



Şekil 7: Monensin - MS spektrumu



Şekil 8: Narasin- SIM spektrumu



Şekil 9: Narasin-MS spektrumu

4.1.2. LC-MSMS Sisteminde Doğrulama Analizleri (Confirmation Test).

Doğrulama testleri için AFSSA'nın referans metodu ve J.Rosen'in metotlarından ile analizlerin tesbit limitleri kadar standart enjeksiyon yapılarak öncelikle laboratuvar şartlarında imkanlar dahilinde en düşük tesbit limiti (LOD), hesaplanabilir limit (LOQ) ve geri kazanım (recovery) saptaması yapıldı. Kısaca monensin ve narasinin kas dokusundan ayrıştırılması, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirlilikten temizlenmesi sağlanarak LC-MSMS sistemi ile doğrulama yapıldı. Elde edilen sonuçlar referans metot performans değerleriyle kıyaslanarak uyumlu olduğu gözlemlendi.

4.1.2.1. LC-MSMS Sistemi özellikleri:

Analitik sistem özellikleri			
LC-MSMS:	GOLD Tandem LC-MSMS, ZIVAK Ltd. Şti.	Mobil Faz	Metanol + Am.asetat (0.1 M).
LC	Gold Liquid Chromatography	Gradient Akış Programı	Çöz. A ve Çöz. B
Bilgi işlem:	Xcalibur	Analiz süresi	6 dakika
Dedektör	Gold Tandem MSMS Triple quadrapol,	İyonizasyon metodu	ESI (+)
LC- Kolon	Synergi max RP, 20 x 2.0 mm; 5µ	İyon dedeksiyon modu	SRM
		Enj. Vol	20 µl

Tablo 10: LC-MSMS sisteminin özellikleri.

Zaman	Çözelti – A (Metanol) %	Çözelti – B (Amonium asetat) %	Akış Oranı
0 dak	100	0	0.3 ml
1-2	100	0	0.3 ml
2-3	75	25	0.3 ml
3	75	25	0.3 ml
4-5	100	0	0.3 ml
5	100	0	0.3 ml
6	100	0	0.3 ml

Tablo 9: LC-MSMS sistemi mobil faz gradient akış programı

Koksidiyostat madde	Tespit limiti (Detection limit)	Hesaplanabilir limit (Quantitation limit)	T Retetion Time - Geliş zamanı	Con.V:	Ded.	Recovery %
Monensin	0,5 ppb	1 ppb	2,5-2,9	45	ESI (+)	95
Narasin	1 ppb	2 ppb	3,3-3,7	45	ESI (+)	92

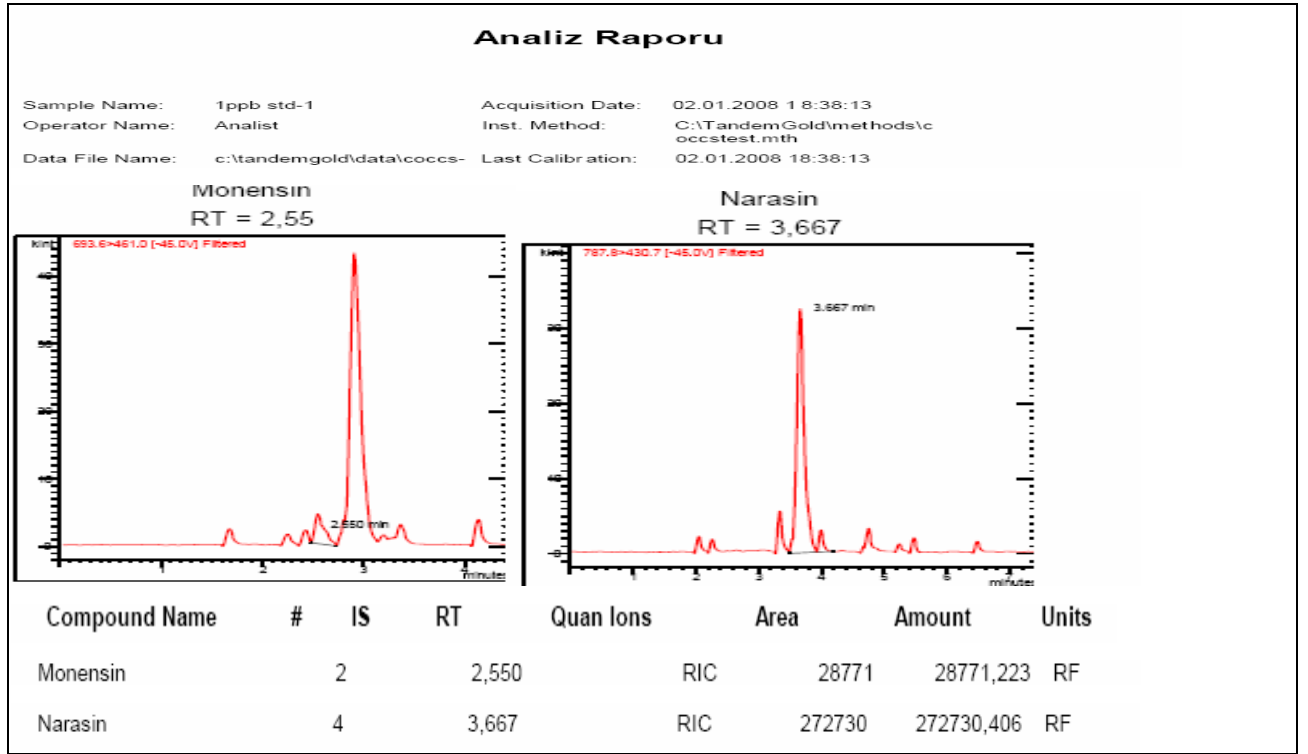
Tablo10: Monensin ve Narasin için doğrulama testlerinde LC-MSMS analitik parametreleri:

Koksidiyostat madde	LC-MS spektrum (Mass spectrum- Q1)	LC-MSMS 1.iyon (Daughter MS - Q2)	, LC-MSMS, 2.iyon (Daughter MS- Q3)
Monensin	693.6	675.1	460.5
Narasin	787.8	530.6	430.7

Tablo11: Doğrulama testlerinde Monensin ve Narasin için LC-MS kütle spektrumu ve MSMS iyon değerleri

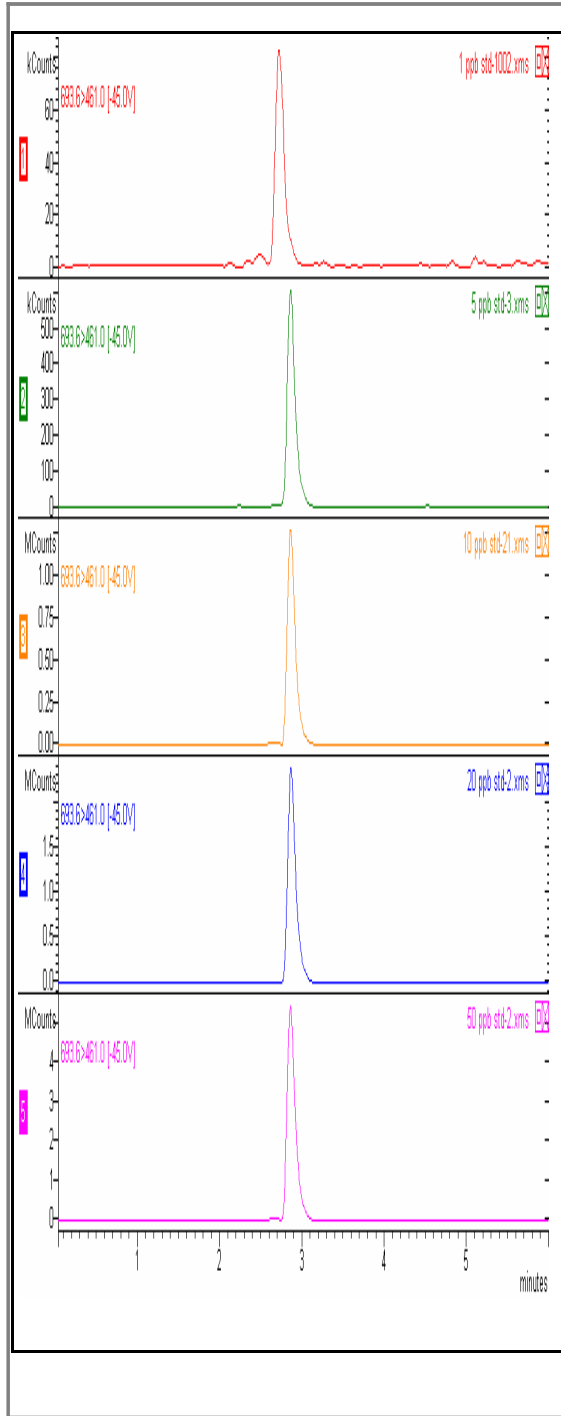
4.1.2.2.Doğrulama analizlerinde elde edilen kromatogramlar :

Doğrulama analizlerinde hesaplanabilir düzey olarak belirlenen monensin ve narasin için sırasıyla 1 ng/ml ve 2 ng/ml üzerinden yapılan çalışmalarda MSMS sistemi elektrospray pozitif iyonizasyon modülüyle (ESI) molekülleri parçalayarak ana iyonun görünebilirliğini ve miktar tanımlamasını stabil olarak test edilmektedir. Hesaplanabilir düzeyin 1/2 konsantrasyonunu ise sırasıyla 0.5 ng/ml ve 1 ng/ml düzeyini teşhis limiti olarak tanımlayabiliyor. Analitik parametrelerde tekrarlanabilirlik, molekülün ana iyonu ile bu molekülün parçalanmasıyla oluşan 1. ve 2. türemiş (daughter) iyonlarının oranları ve geliş zamanları ve geri alım kazançları istikrarlı olarak tespit edilebilirliği gözlemlendi. Metot performans değerleri açısından alınan sonuçlar referans alınan PVKAE ve AFSSA laboratuvarlarının resmi metotlarıyla uyumlu olduğu gözlemlendi.

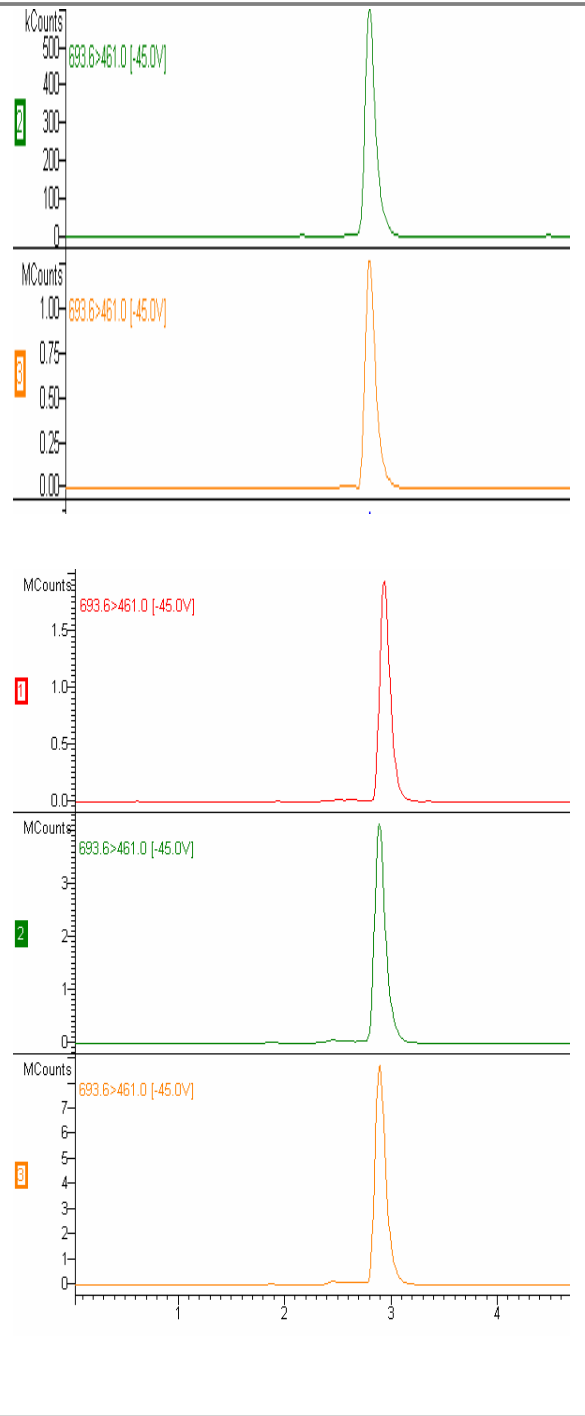


Şekil 10: 1 ppb düzeyinde monensin ve narasin standart çözeltilerin enjeksiyonu neticesinde alınan kromatogramlar.

Monensin için Lineerite çalışlarında, 1, 5, 10, 20 ve 50 ng/ml' lik standart çözelti ve spiked doku kromatogramları aşağıda şekil 11 ve 12'de sunulmaktadır.

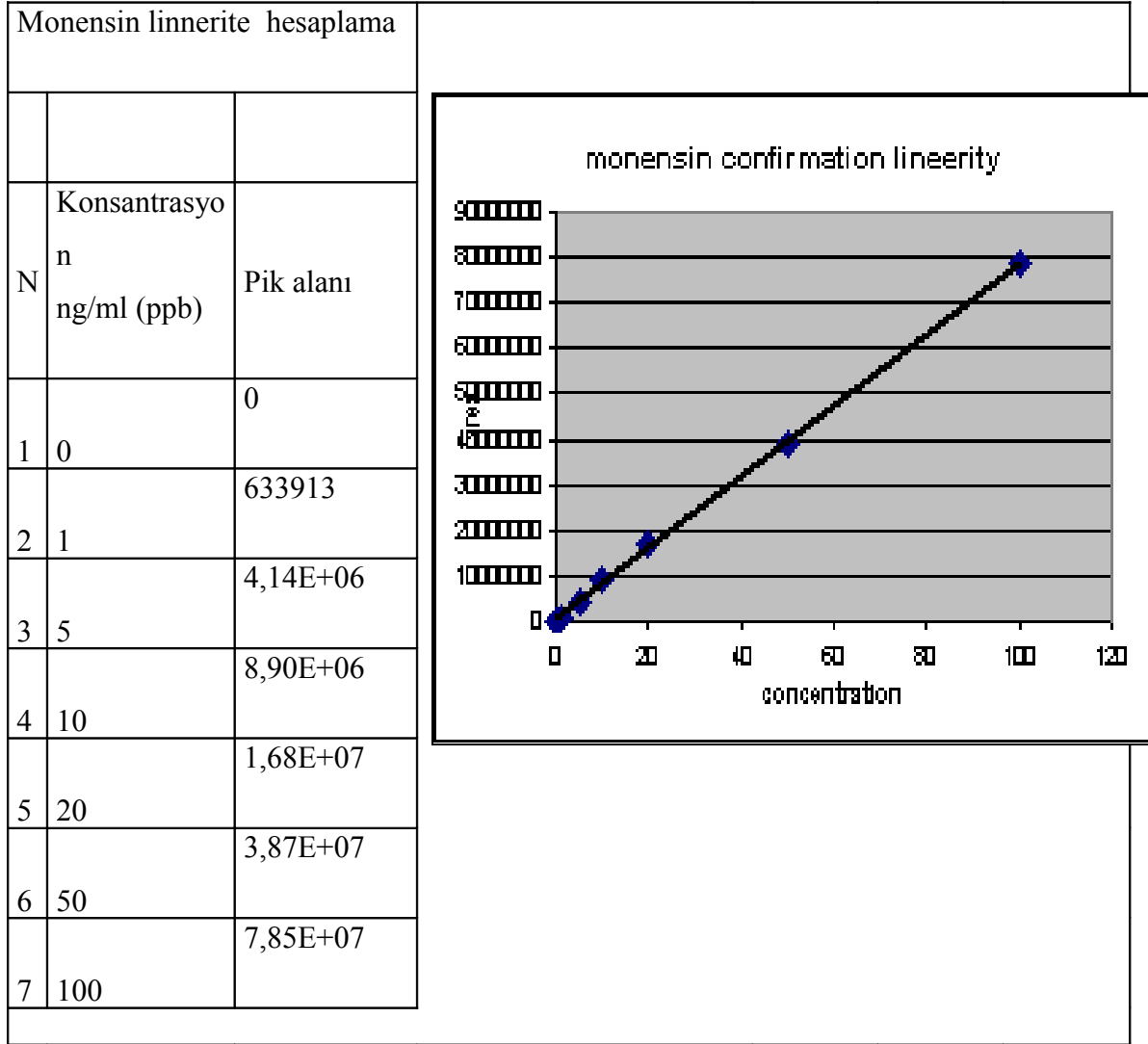


Şekil 11: Monensin std. çözeltileri ile lineerite çalışmaları



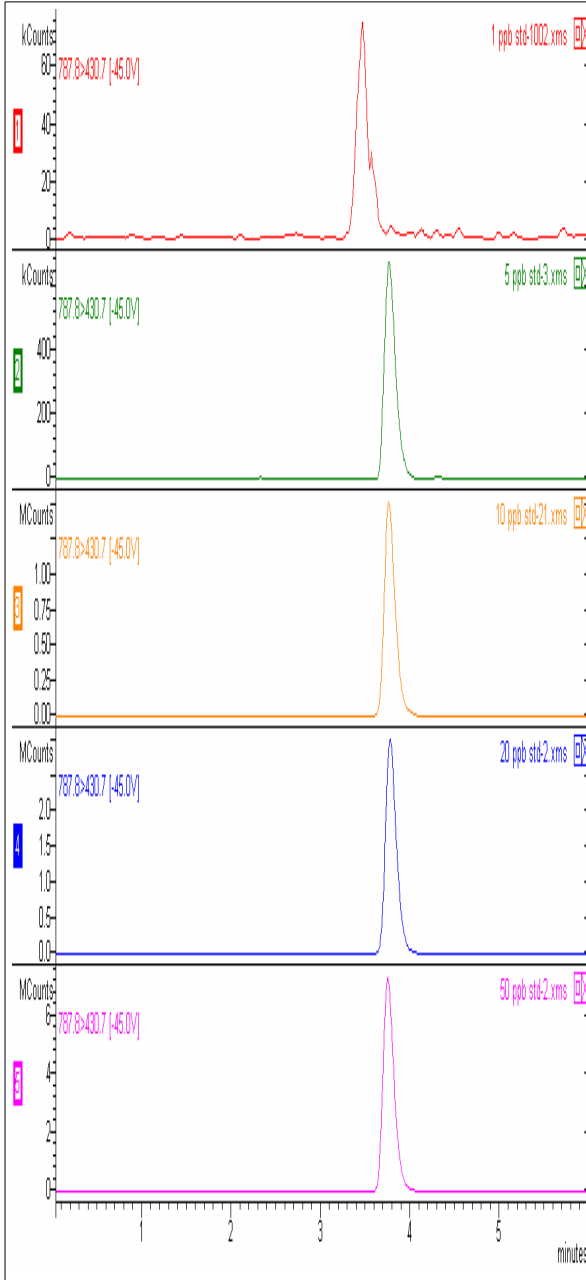
Şekil 12: Monensin std. spike doku lineerite çalışmaları

Monensin için sırasıyla 1, 5, 10, 20, 50 ve 100 ng/ml. (ppb)'lik standart maddelerin LC-MSMS sistemindeki doğrulama test verilerine göre lineerite sağlandığı görüldü.

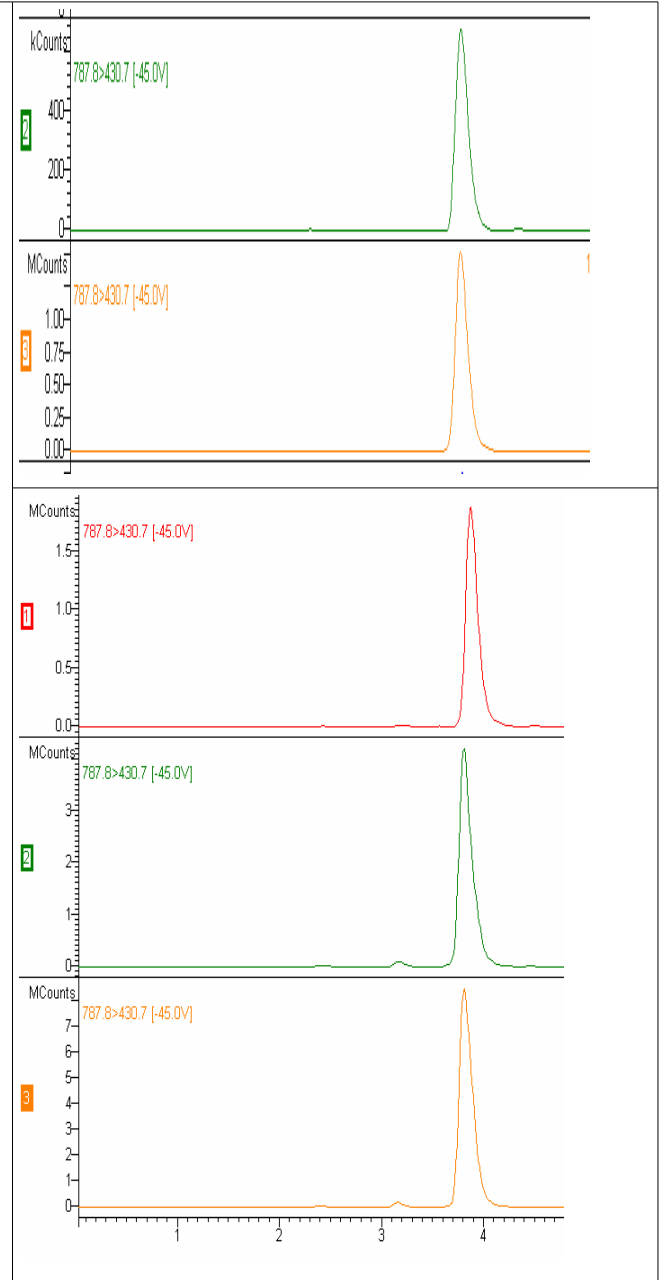


Grafik 3: Monensinin doğrulama test lineeritesi

Narasin için Lineerite çalışmalarında sırasıyla 1, 5, 10, 20 ve 50 ng/mL'lik standart çözelti ve spiked doku kromatogramları aşağıda şekil 13 ve 14'de sunulmaktadır.

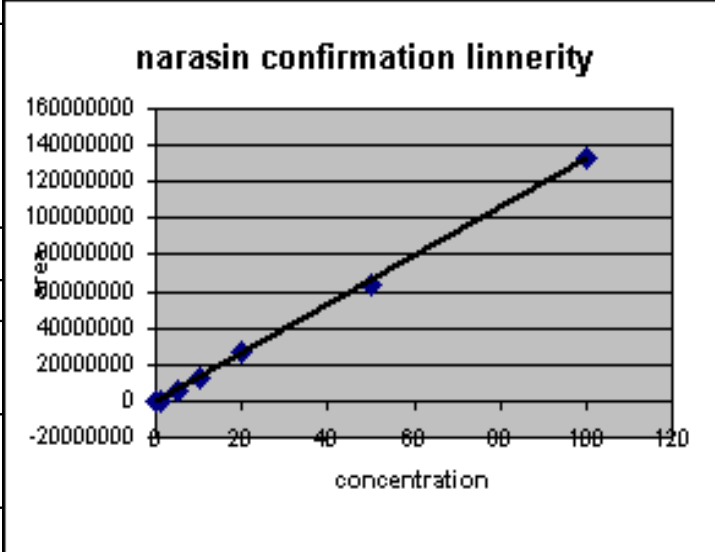


Şekil 13 Narasin std. ile lineerite çalışmaları



Şekil 14: Narasin spike-doku linnerite çalışmaları

Narasin için sırasıyla; 1, 5, 10, 20, 50 ve 100 ng/ml – (ppb)’lik standart maddelerin LC-MSMS sistemindeki doğrulama test sonuçlarına göre lineerite sağlandığı görüldü.

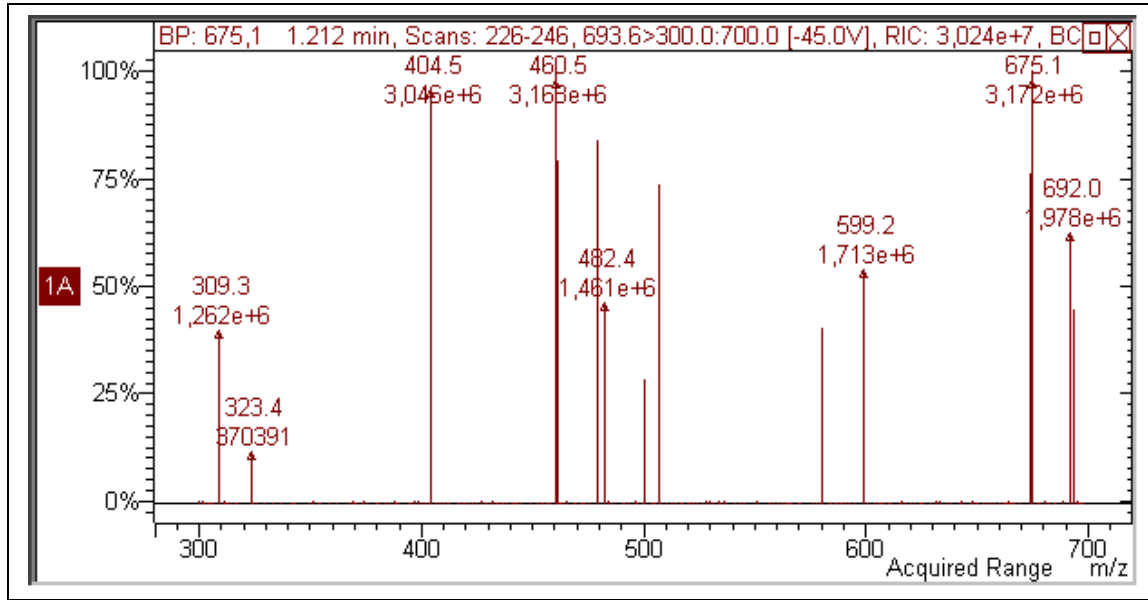
Narasin confirmation linearity						
Num.	Konsantrasyo n ng/ml (ppb)	Pik alanı				
1	0	0				
2	1	390497				
		5,99E+0				
3	5	6				
		1,33E+0				
4	10	7				
		2,61E+0				
5	20	7				
		6,37E+0				
6	50	7				
		1,34E+0				
7	100	8				

Grafik 4: Narasinin doğrulama test lineeritesi

4.1.2.3. LC-MSMS Sisteminde monensin ve narasin standart çözeltileri ile metod kalibrasyonu çalışmasında elde edilen kütle spektrumları ve bunların daughter iyonlarının tespit edildiği kromatogramlar.

Monensin-Na, LC-MS main mass spectrum no: Ana iyon: 693.6

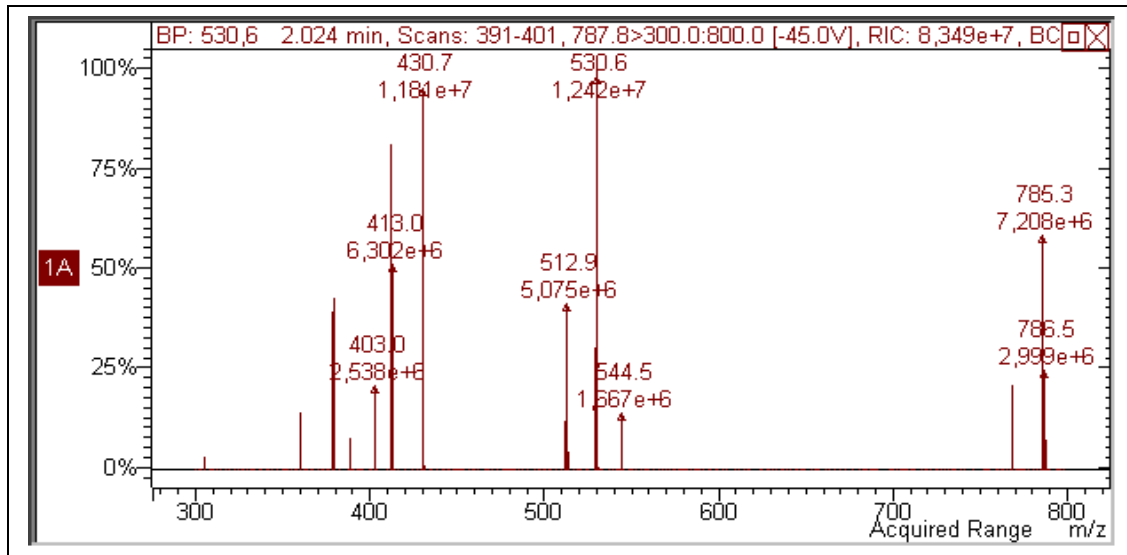
LC-MSMS -Daughter mass spectrum no: D1-, 675.1 ; D2- 460.5, D3- 404.5



Şekil 15: Monensin-Na. LC-MS kütle spektrumu ve MSMS iyon değerleri

Narasin LC-MS main mass spectrum no: 787.8

LC-MSMS -Daughter mass spectrum no: D1- 530.6; D2-430.7; D3-785.3



Şekil 16: Narasinin LC-MS kütle spektrumu ve MSMS iyon değerleri

4.2. Piyasa araştırması için toplanan tavuk eti ve yumurta numunelerinin monensin ve narasin kalıntıları yönünden analitik sonuçları:

Bu araştırma bölümünde tavuk doku ve ürünlerinde antikoksidial ilaç kalıntılarının tarama testleri için çalışmalar yürütüldü. LC-MS sisteminde birinci kütle spektrumları üzerinden arama yapılmaktadır. Bulunan değerler üzerinden ikinci aşamada ise LC-MSMS doğrulama analizleri yapılabilmektedir.

Yukarıda belirtilen yöntem ile PVKAE’de analize aldığımız 150 (yüzelli) adet yumurtadan monensin ve narasin için hesaplanabilir düzeyde herhangi bir kalıntıya rastlanılmadı. Yine broyler etinden deri, but ve göğüs kaslarından karışım olarak hazırlanan test materyallerinin analizinden de negatif sonuç alındı. Doğrulama amacıyla negatif sonuçlar üzerinde tekrar edilen analizlerde de pozitif kalıntı tespit edilemedi.

Piyasaya insanların tüketimine sunulan tavuk ve yumurta numunelerine ait kromatogramlardan anlaşıldığı üzere, yapılan analitik çalışmalara göre yumurta ve tavuk kas ve karaciğer dokularında pozitif monensin ve narasin kalıntılarına rastlanılmadığı ve insanların tüketime sunulmak üzere marketlerin, bakkalların raflarına yerleştirilmiş numunelerden alınan örneklerde kalıntıya rastlanılmadı.

Numune No:	1 den 150 adede kadar numaralandırılmış yumurta numuneleri
Alınış Tarihi	14 Mayıs – 20 Haziran 2007
Cinsi	Yumurta
Ortalama ağırlığı	50-65 g./ad. Yumurta
Kesim/Pk. Tarihi*	10 Mayıs-18 Haziran (genel olarak günlük veya 2-3 günlük)
Alındığı Yer	B.Evler, Bağcılar, Bakırköy, K.çekmece, Gaziosmanpaşa, Fatih, Eminönü, Beyoğlu, Şişli, Güngören, Tuzla, Maltepe, Pendik, Kadıköy, Beykoz
Özel İşareti	Bir grup numunede Omega 3,
Saklama koşulları	Normal satış reyonları
Organolepsisi	Kendi yapı ve özelliklerinde,
Satışa arz	Satışa arzedilmiş halde
Düşünceler	Deformasyon, çatlak, kırık, delik olup olmadığı ve görünümü
*İlk- son kullanım sürelerine göre raf ömrü dahilinde alındı. Serin yerde sunulmaktadır.	

Tablo13: Piyasadan toplanan yumurta numuneleri kayıt örneği

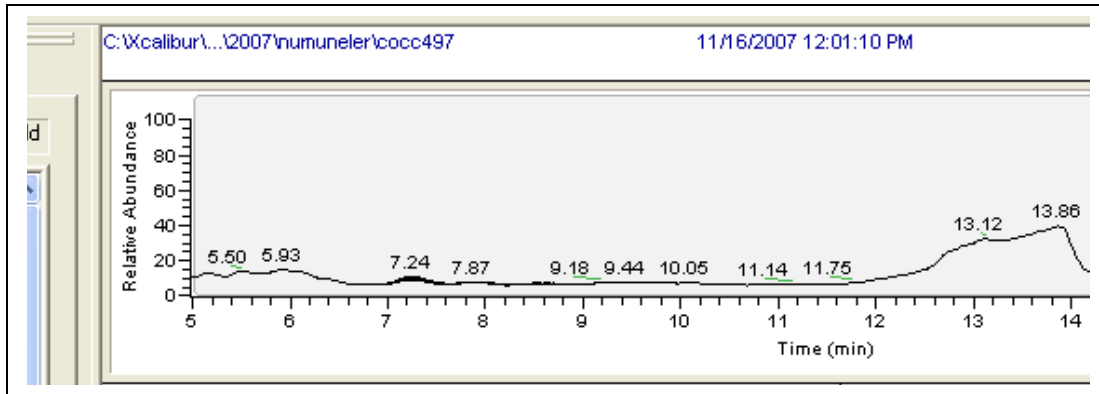
Numune No:	1 den 150 adede kadar numaralandırılmış tavuk eti numuneleri
Alınış Tarihi	10 Mayıs – 18 Haziran 2007
Cinsi	Piliç eti
Miktarı	Piliç eti: 250-300 g/ad. numune
Hangi dokular	Tavuk eti: deri+but+göğüs
Kesim/Pk. Tarihi	6 Mayıs - 15 Haziran (1 haftalık raf ömrü içinde sunulmaktadır)
Alındığı Yer	B.Evler, Bağcılar, Bakırköy, K.Çekmece, Gaziosmanpaşa, Fatih, Eminönü, Beyoğlu, Şişli, Güngören, Tuzla, Maltepe, Pendik, Kadıköy, Beykoz,
Özel İşareti	Yok
Isısı	Piliç eti:-4,+2°C
Organolepsisi	Normal görünümde, koku ve doku mukavemeti spesifik karakterde.Raf ömrüne riayet edilmektedir.
Satışa arz	Ambalajlı olarak satışa sunulmuş halde
Düşünceler	Halka satışa arz edildiği şekilde market reyonundan alındı.

Tablo 14: Piyasadan toplanan tavuk eti numuneleri kayıt örneği

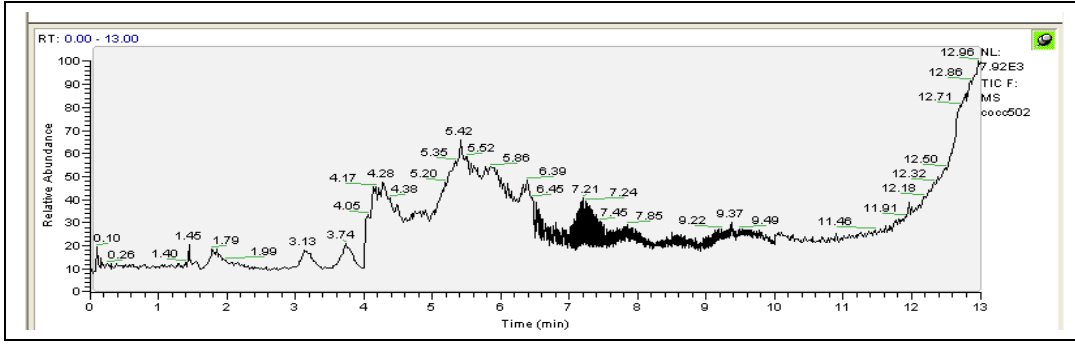
Piyasadan insanların tüketimine sunulmuş olan tavuk ve yumurta örneklerinin iyonofor antikoksidiyal ilaç kalıntıları yönünden tetkikinde analitik sistemlerin ölçüm parametreleri sınırları dahilinde pozitif bulguya rastlanılmadı.

İstanbulda tüketime sunulan kanatlı dokularında ve yumurtada monensin ve narasin kalıntılarının araştırılmasında kullanılan numunelere ait kromatogramlar aşağıda (şekil 17, 18 ve 19) de sunulmaktadır.

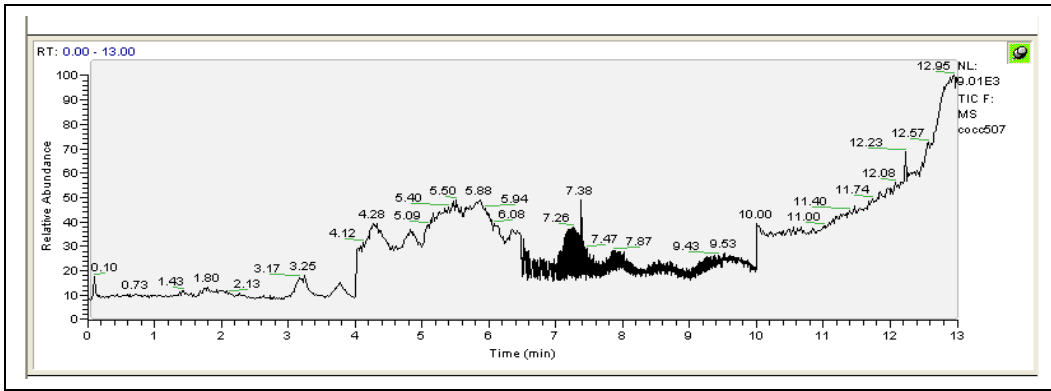
Monensin ve narasinin kalıntılarının analizi için bir tarama spektrum görüntüsü:



Şekil 17: İyonofor koksidiyallerden monensin ve narasine ait sim modunda bir tarama (screening kromatogram) spektrumu



Şekil 18: Negatif sonuçların alındığı tavuk kaslarına ait kromatogramlar:

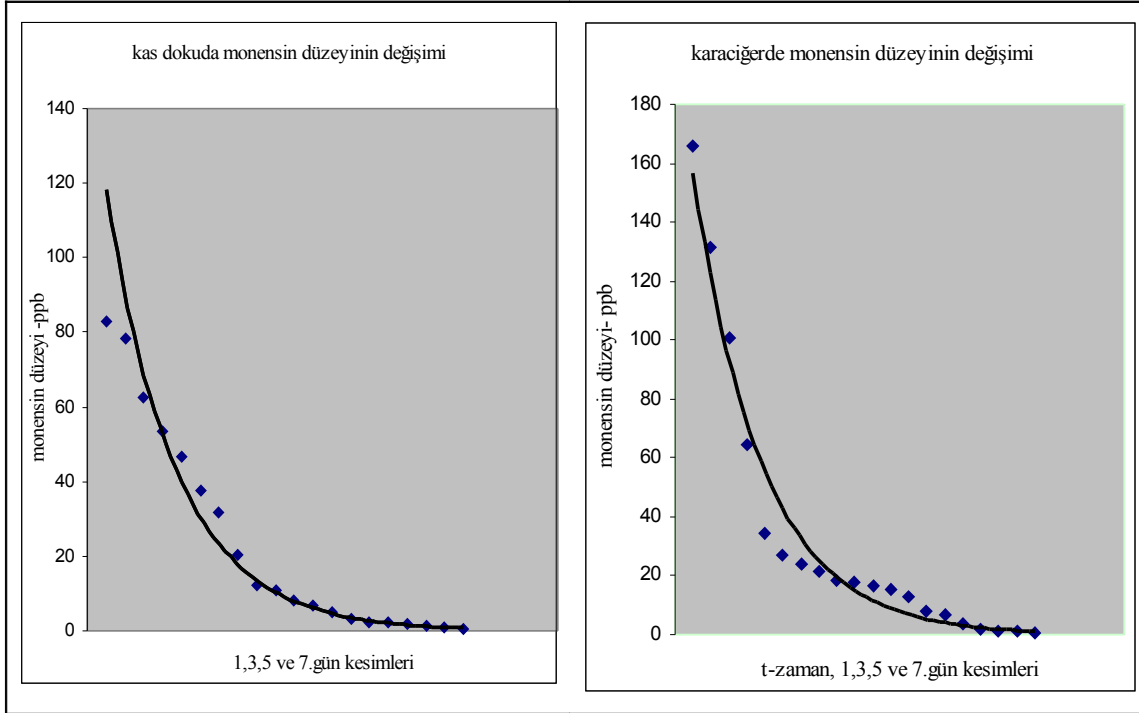


Şekil 19: Negatif sonuçların alındığı yumurta dokusuna ait kromatogramlar:

4. İyonofor antikoksidiyal ilaç ilaveli yemlerin yedirme denemesi çalışmalarında broiler tavuklardan alınan doku örneklerinde kalıntı düzeylerinin tayini (in vivo çalışmalar)

4.3.1. Monensin Grubu:

Monensin ile beslenen tavukların 1,3,5 ve 7. günlerin sonunda kesim sonrası dokularından alınan numuneler LC-MSMS sisteminde ölçülerek kromatografik olarak değerlendirildi. Kas ve karaciğer dokularında kalıntı düzeyinin zamana bağlı değişim grafiği aşağıda sunulmaktadır.



Grafik 5: Monensinle beslenen tavukların 1, 3, 5 ve 7. günlerde kas ve karaciğer dokularında monensin düzeyinin değişimi

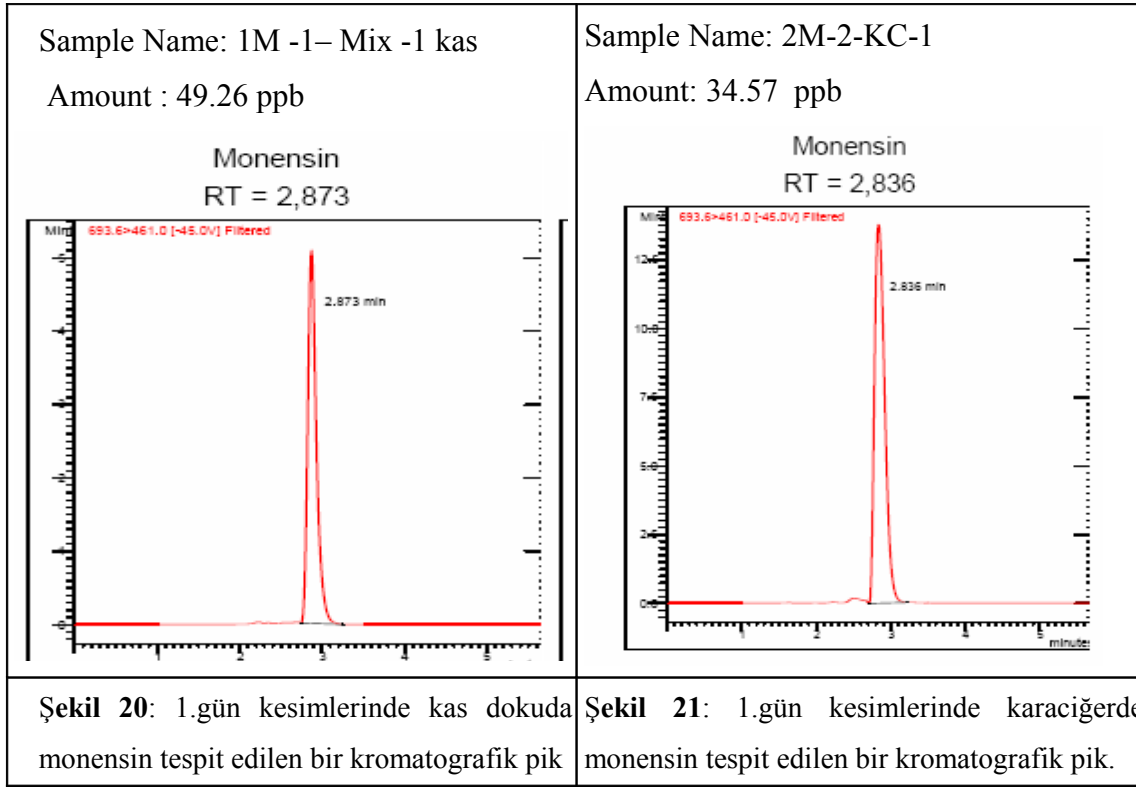
İyonofor antikoksidiyal yedirilen monensin grubu tavuklardan alınan kas doku örneğine ait kromatogram incelendiğinde, grupları temsilen kesim neticeleri, koksidiyostat kalıntı seviyesinin zamana bağlı değişim grafiğinden hızlı bir düşüş gösterdiği oldukça net bir şekilde bize göstermektedir. Bu çalışmalarda, iyonofor ilaveli yemlerle besleme süresi sonunda yemlemeyi durdurulmasını takiben, monensin kalıntı düzeyi 1. gün hızla azaldığı görülmektedir. Kas dokuda gün içinde MRL düzeyinin

altına indiği tespit edildi. Sonraki günlerde kas dokularda MRL düzeyinde ve üzerinde herhangi bir monensin kalıntısı tespit edilemedi. Karaciğer dokuda ise 1.gün sonunda MRL düzeylerine indiği belirlenirken, 3. gün MRL düzeyi ve bunun altında, 5. gün tespit limiti ve altına inmekte, 7. gün ise hiç bir düzeyde kalıntı tespit edilmedi.

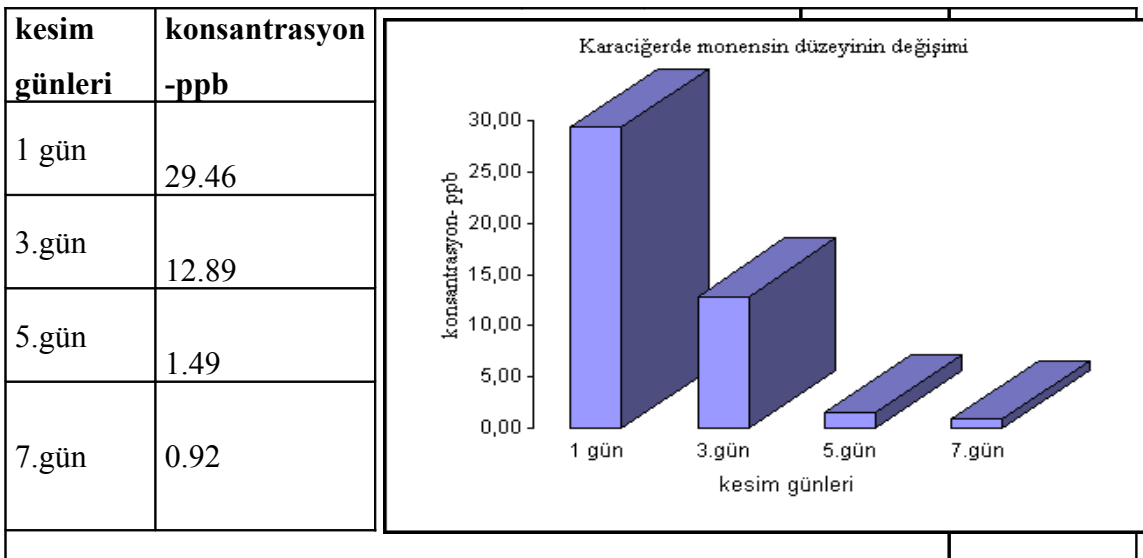
10 günlük monensin ilaveli yemle besleme süresi bittiğinde ertesi sabah kesime başlandı. Gün içi ortalama kas doku için 15.5 ppb düzeylerinde bulundu. Karaciğer dokuda ise 1.gün ortalama monensin kalıntı düzeyi 29.46 ppb düzeyinde bulundu. 1. gün, 1. kesimlerde broyler dokularında ortalama 46.8 ppb'lik (ham veri) bir kalıntı düzeyine eşdeğerdir. % 95 geri alım kazancı hesaba katıldığında 49.26 ppb reel kalıntı olarak hesaplandı. Broyler karaciğerinde 1.gün

1.kesimlerde ortalama 62.79 ppb'lik bir ham veri elde edildi. Reel olarak % 95 geri alım kazancı hesapaba katıldığında, 68.25 ppb'lik bir kalıntı düzeyine eşdeğerdir. Tavukların kas ve karaciğer dokusundan elde edilen kromatografik figürler aşağıda sunulmaktadır (Şekil 20 ve 21).

LC-MSMS sisteminde ölçümü yapılan kas numunesi ve karaciğer numunesinde monensin kalıntılarına ait örnek kromatogramlar şekil 20 ve 21' de verilmektedir.

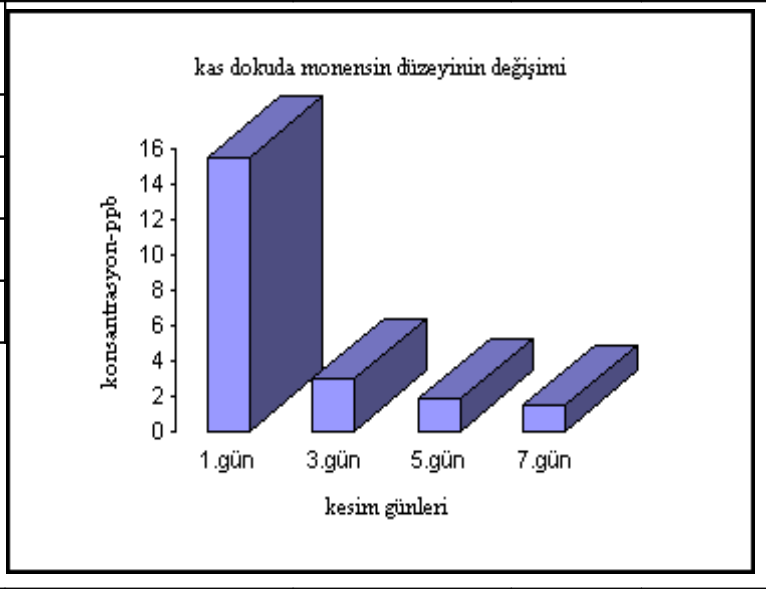


Monensin grubu broylerlerin dokularında kalıntı seviyelerindeki değişimler zamana bağlı olarak kesime sevk edilerek incelendi. Monensin ilaveli yemleme durdurulduktan sonrası 1,3,5 ve 7. günlerde kesilen broyler kas ve karaciğer dokularından elde edilen kalıntıların düzeyindeki azalma aşağıda grafik 6 ve 7 de verilmektedir.



Grafik 6: Kesim öncesi bekleme süresini temsilen 1,3,5 ve 7.günlerde kesimi yapılan broyler karaciğer dokularında ortalama monensin düzeyleri.

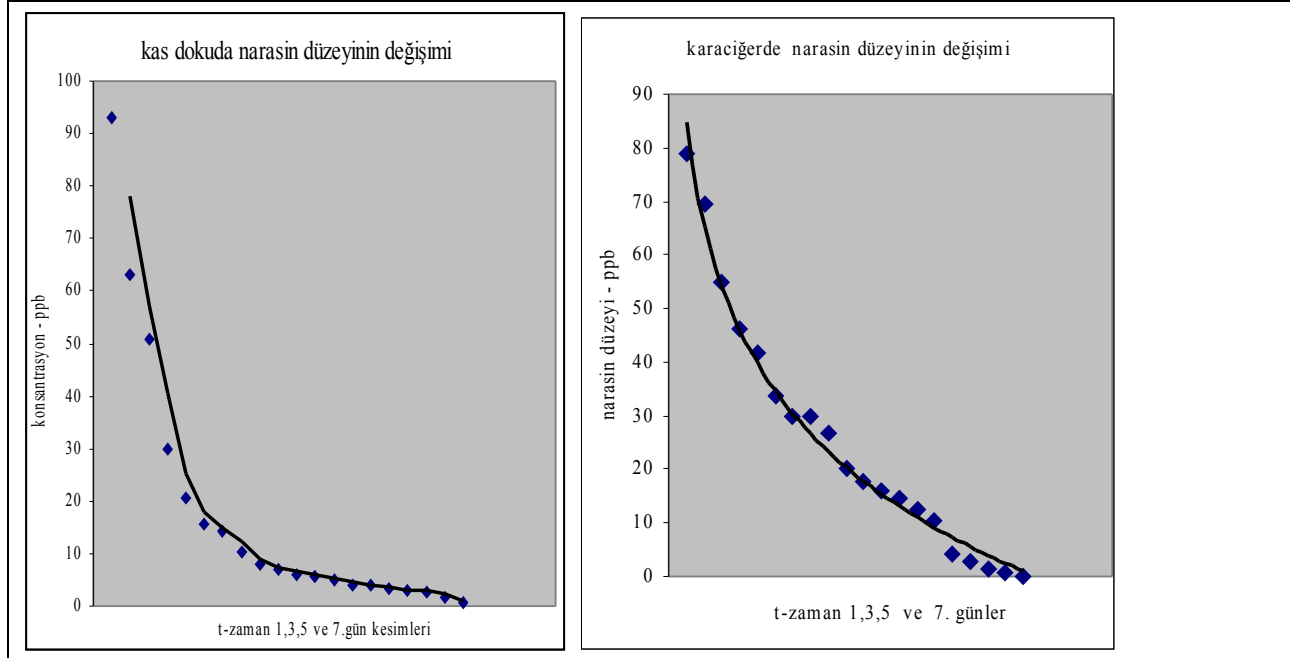
Kesim günleri	konsantrasyo n -ppb
1.gün	15.5
3.gün	2.98
5.gün	1.77
7.gün	1.38



Grafik 7. Kesim öncesi bekleme süresini temsilen 1,3,5 ve 7.günlerde kesimi yapılan broyler kas dokularında monensin düzeyleri.

4.3.2. Narasin Grubu:

Narasin ilaveli yemle beslenen tavukların 1,3,5 ve 7. günlerin sonunda kesim sonrası dokularından alınan numuneler LC-MSMS sistemi ile ölçülerek alınan kromatografik verileri değerlendirildi. Kas ve karaciğer dokularında kalıntı düzeyinin zamana bağlı değişim grafiği aşağıda sunulmaktadır.



Grafik 8: Narasinle beslenen tavukların 1,3,5 ve 7. günlerde kas ve karaciğerde dokusunda narasin düzeyinin değişimi.

İyonofor antikoksidyal yedirilen narasin grubu broylerlerden alınan kas doku örneklerine ait kromatogramlar incelendiğinde, grupları temsilen kesimler sonunda monensine benzer şekilde narasin kalıntı düzeyi de zamana bağlı olarak hızlı bir azaldığı görüldü. Narasin kalıntı düzeyi kas dokuda 1. gün hızla azalarak MRL seviyesi ve MRL düzeyinin altına indiği tespit edildi. 3. gün MRL düzeyinin altında, 5. gün tespit limiti düzeyi ve altında bulunurken, 7. gün ise hiç bir düzeyde kalıntı tespit edilmedi. Karaciğer dokuda ise 1.gün sonunda kas dokuya göre biraz daha kontrollü bir azalım gösterirken, MRL düzeylerine indiği belirlendi. 3. gün MRL düzeyi altında, 5. gün tespit limiti ve altında tespit edilirken, 7. gün ise hiç bir düzeyde kalıntı tespit edilmedi.

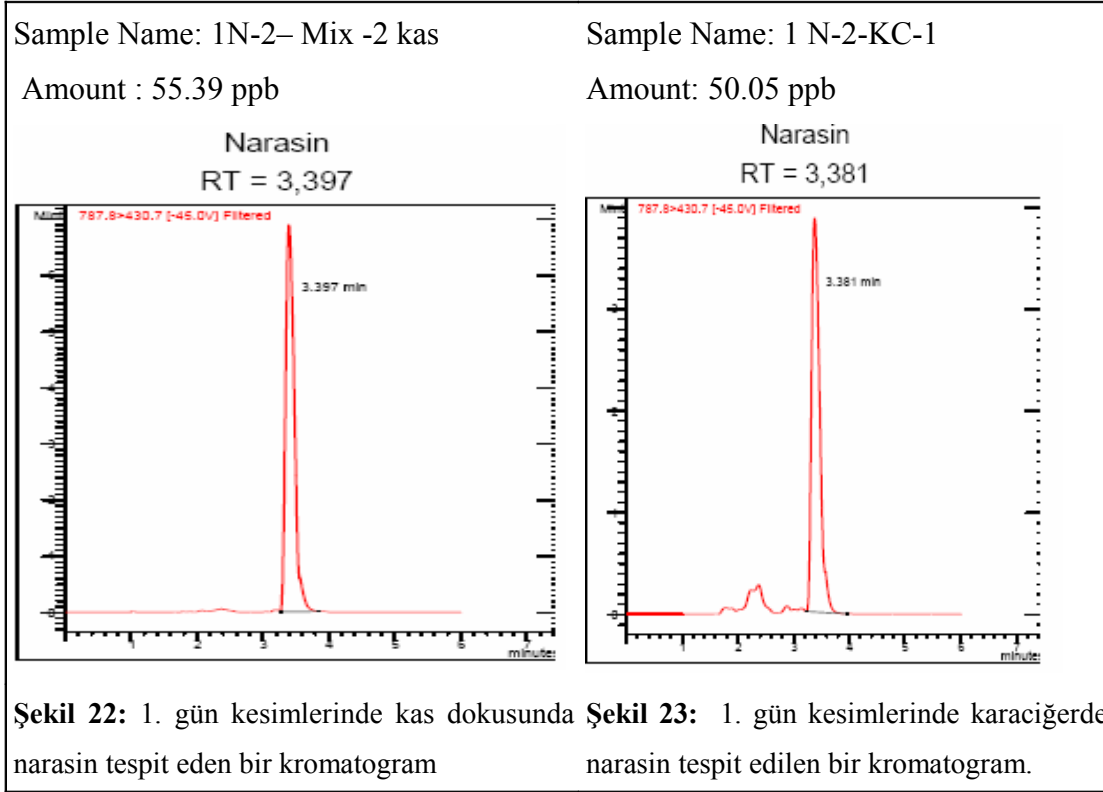
10 günlük narasin ilaveli yemle besleme süresi sonrasında kesime sevk edilen broyler kas dokularında narasin kalıntısı, 1. gün kas dokuda ortalama 18.1 ppb; karaciğer dokuda ise 62.3 ppb düzeyinde bulundu.

Broyler dokularında 1. gün, 1. kesimlerde ortalama 59.23 ppb'den başlayan narasin kalıntı düzeyi, gün içinde kesim sonunda ortalama 6.7 ppb seviyelerine düştüğü gözlemlendi. Karaciğer dokusunda ise 78.9 ppb düzeylerinden 20.2 ppb düzeylerine düştüğü belirlendi.

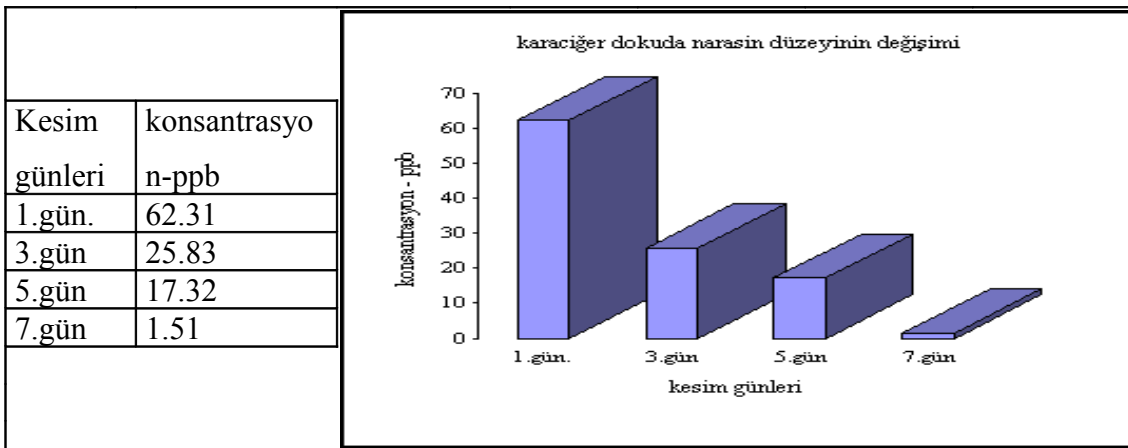
Narasin grubu üyelerinden, 1. gün kesimlerinde, broyler kas dokularında 50.96 ppb'lik bir (ham veri) bir kalıntı, % 92 geri alım kazancı hesaba katıldığında 55.39 ppb reel kalıntı düzeyine eşdeğerdir (şekil 22). Tavuk karaciğerinde ise 46.05 ppb ham veri; reel olarak %92 gerialım

kazancına göre hesaplandığında yaklaşık 50.05 ppb düzeyinde narasin kalıntısına eşdeğerdir (şekil 23). Tavuk kası ve karaciğeri dokularında tespit edilen narasin kalıntılarına birer adet örnek kromatogramlar aşağıda sunulmaktadır.

LC-MSMS isteminde ölçümü yapılan bir broyler kas ve karaciğer numunelerinde narasin kalıntılarına ait örnek kromatogramlar aşağıda sunulmaktadır.

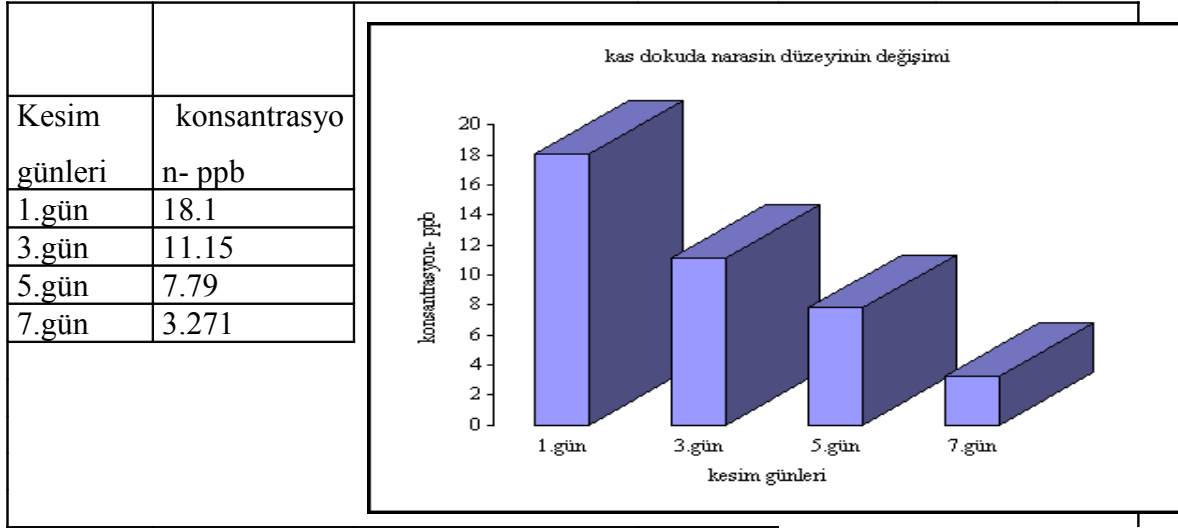


Narasin grubu broylerlerin dokularında kalıntı seviyelerindeki değişimler zamana bağlı olarak kesime sevk edilerek incelendi. Narasin ilaveli yemleme durdurulduktan sonrası 1,3,5 ve 7. günlerde kesilen broyler kas ve karaciğer dokularından elde edilen kalıntıların düzeyindeki azalma aşağıda grafik 9 ve 10'da verilmektedir.



Grafik 9: Kesim öncesi bekleme süresini temsilen 1,3,5 ve 7.günlerde kesimi yapılan tavukların karaciğer dokularında narasin düzeyleri.

Tavuk kas doku numunelerinin incelenmesi neticesinde elde edilen narasin kalıntı düzeyindeki değişimin görünümü aşağıdaki grafik 10’da verilmektedir



Grafik 10: Kesim öncesi bekleme süresini temsilen 1,3,5 ve 7.günlerde kesimi yapılan tavukların kas dokularında narasin düzeyleri.

4.4. ISI FAKTÖRLERİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

4.4.1. MONENSİN GRUBU SONUÇLARI

4.4.1.1 Laboratuvar Ortamında Deneysel Olarak Uygulama – İn vitro (Spike doku):

İyonofor antikoksidial içermeyen yemle beslenen tavuk dokularına konsantrasyonu bilinen standart monensin çözeltileriyle katım (spike) yapılarak test edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu çalışmada monensin ile katım yapılan dokular farklı ısı işlemlerine maruz bırakılarak kalıntı düzeyinde ne gibi değişimler meydana geldiği test edildi. Isı faktörü olarak ülkemizde yaygın şekilde uygulanan pişirme ve saklama usulleri esas alındı. Mangalda kızartma, tencerede haşlama yöntemleri kullanıldı. Yine kesim sonrası stoklama amacıyla - 20 °C de muhafaza işlemine benzer şekilde derin dondurucuda 1 hafta süreyle muhafaza edildikten sonra analize alındı.

4.4.1.2. Kızartma işleminde kayıp oranları:

Spike çalışmalarında kızartma testinde monensin kalıntılarının kayıp oranı			
Numune sayısı	Spike standart (ppb)	Tespit (ppb)	Kayıp % (ham veri)
n- 10	100	84.52	15.48
Ortalama		84.5	Std. sapma (± 2.6)
Reel Değerler %		Recovery: % 95	
	Ham veriler	Reel Değer %	Reel kayıp %
Kızartma etteki kalıntı miktarı %	84.5	88.9	11.1 (± 2.6)

Tablo 15: Spike çalışmalarında kızartma testinde monensin kalıntılarının kayıp oranı

4.4.1.3. Haşlama işleminde kayıp oranları:

Spike çalışmalarında haşlama testinde monensin kalıntılarının kayıp oranları				
Numune sayısı	Spike std. miktarı (ppb)	Haşlama ette tespit ppb	Haşlama et suyunda tespit - ppb	Toplam kalıntı
n-10	100 ppb	78.8225	8.637	87.4595
Ham Veriler (Oratalama) %		78.8	8.6	Std. sapma (± 2.5)
Reel Değerler %		Recovery: % 95		
Haşlama ette kalıntı - ppb	Et suyunda kalıntı %	Doku+su %	Ette kayıp %	Reel kayıp %
82.96	9.05	92.01	17.04 (± 2.5)	7.99

Tablo 16: Spike çalışmalarında haşlama testinde monensin kalıntılarının kayıp oranı

4.4.1.4. Dondurma işlemi etkisi:

Spike çalışmalarında – 20 °C’de dondurma testinde monensin kalıntılarının kayıp oranı			
Numune sayısı	Spike standart (ppb)	Tespit (ppb)	Kayıp % (ham veri)
n- 10	100	92.801	9.80
Ortalama		92.8	Std. sapma (± 3.9)
Reel Değerler		Recovery: % 95	
	Ham veriler	Reel Değer	Reel kayıp %
Donmuş etteki kalıntı miktarı %	92.8	97.7	2.3 (± 3.9)

Tablo 17: Spike çalışmalarında – 20 °C de dondurma testinde monensin kalıntılarının kayıp oranı.

Monensin kalıntıları üzerine ısı faktörlerinin etkilerinin analizinde SPSS istatistik test sistemine göre ANOVA - Oneway analizinde Duncan hesaplama metodu kullanıldı.

ANOVA analizi verilerine göre; kızartma deneyinde 100 ppb spike yapılan tavuk eti dokularının analizinde ortalama % 84.52 ($\pm$ 2.6); haşlama deneyinde 78.82 ($\pm$ 2.5) dondurma deneyinde ise % 92.80 ($\pm$ 3.9) monensin kalıntısı bulundu. Bu istatistik verilerine göre;

- Monensin kızartma grubu ile monensin haşlama grubu kıyaslandığında istatistik analizine ($P<0.05$ 'e) göre aralarındaki kayıp farkı önemlidir.
- Monensin kızartma grubu ile monensin – 20 °C'de dondurma grubu kıyaslandığında istatistik analizine ($P<0.05$ 'e) göre aralarındaki kayıp farkı önemlidir.
- Monensin haşlama grubu ile monensin – 20 °C' de dondurma grubu kıyaslandığında istatistik analizine ($P<0.05$ 'e) göre aralarındaki kayıp farkı önemlidir.

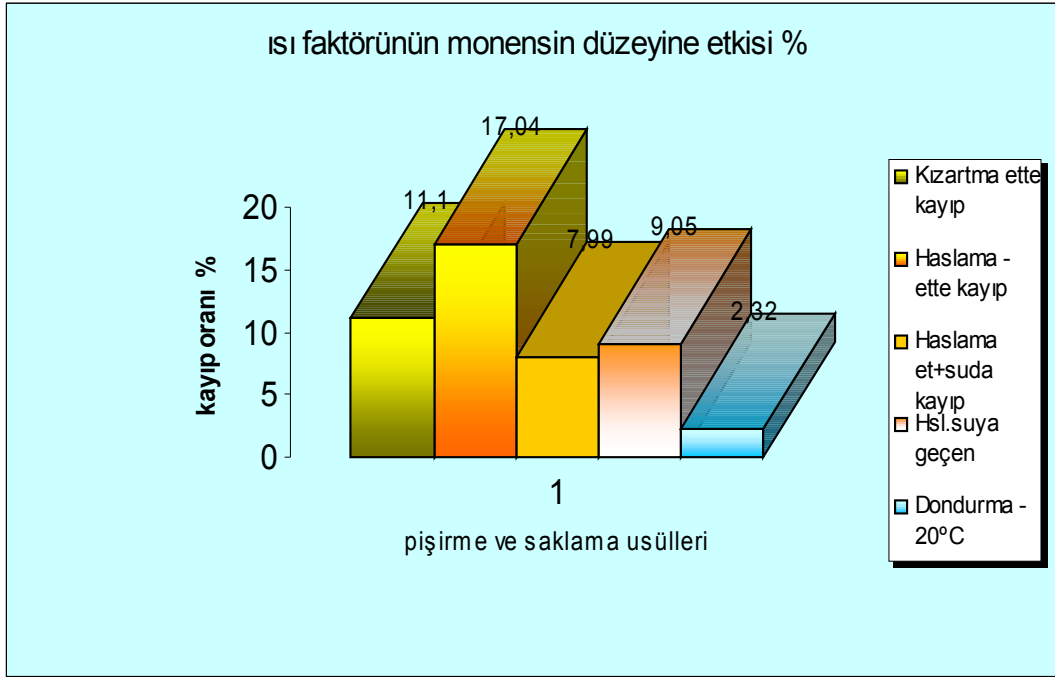
4.4.1.5. Monensin kalıntı düzeyine ısı faktörlerinin etkilerinin değerlendirilmesi:

Isı işlemlerinin etkileri araştırılırken elde edilen değerler ortalama veriler kullanılarak grafize edilerek aşağıda grafik 7, 8 ve tablo 18 de sunulmaktadır. Monensin kalıntılarını azaltıcı yönde pozitif olarak etkileyen ısı faktörleri önemli sayılabilecek kayıplara neden olduğu gözlemlendi. Kızartma ve haşlama işlemlerinde sırasıyla 11.1 ve 17.04 oranında bir kayıp tespit edildi. Ancak haşlama işleminde tavuk eti olarak değerlendirildiğinde %17.04 olarak bulunan kayıp miktarı haşlama suyuna geçen kalıntı miktarı %9.05 hesaba katıldığında %7.99'a düşmektedir. Eğer tavuk haşlanmış eti ve suyu birlikte tüketilmesi halinde pişirme işlemiyle kayıp oranı %7.99 olarak tespit edildi. Dondurma işlemi sırasında ise – 20 °C de % 2.32 olarak tespit edildi.

Monensin için ısı faktörlerinin etkileri üzerine, farklı pişirme usulleri ve saklama koşullarına baz alınarak yapılan denemelerde kalıntı üzerinde kayıp oranları aşağıdaki tablo 18 ve grafik 11' de verilmektedir.

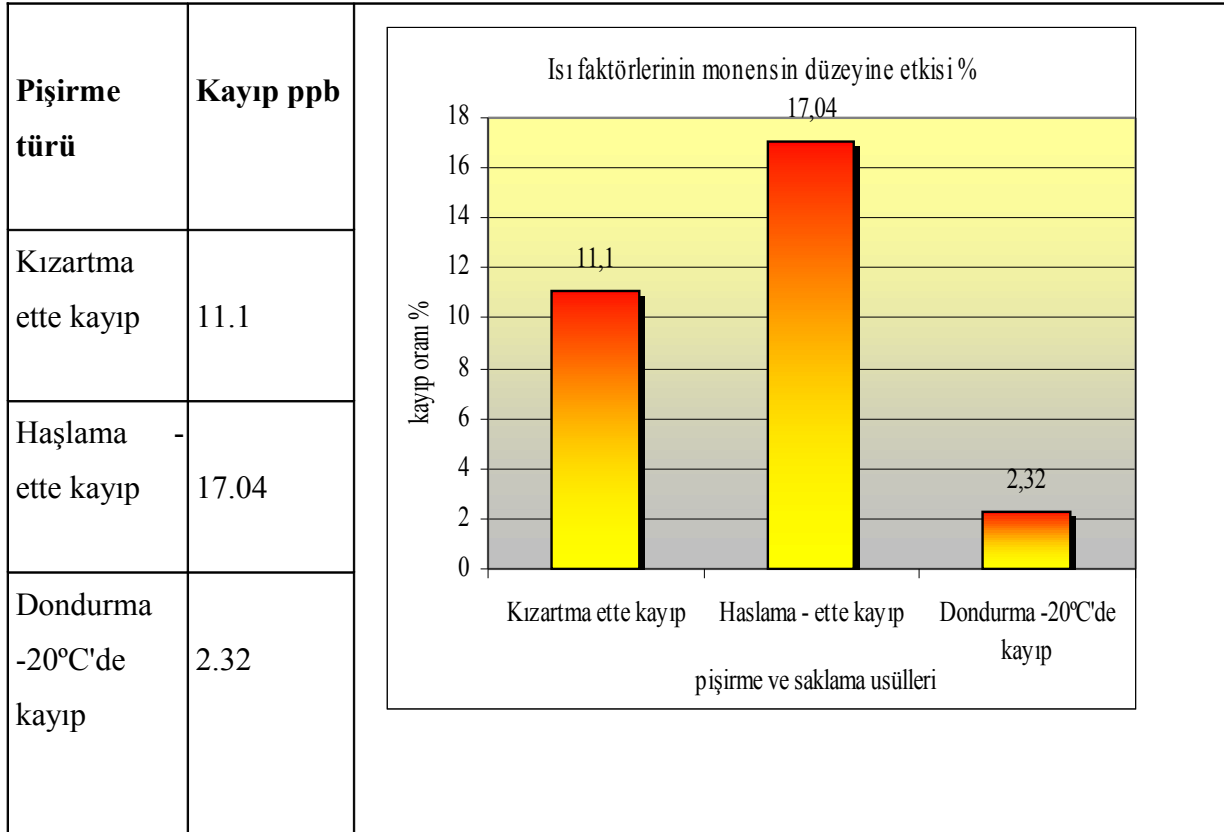
Piştirme türü	Kayıp %
Kızartma ette kayıp	11.1
Haşlama - ette kayıp	17.04
Haşlama et + suda kayıp	7.99
Haşlama suya geçen	9.05
Dondurma -20°C	2.32

Tablo18:Piştirme usullerine göre ısı faktörünün monensin düzeyinde kayıp oranları



Grafik 11: Isı faktörlerinin etkisiyle pişirme usullerine göre kızartma et, haşlama et, haşlama et ve suyu ve dondurulmuş et örneklerindeki monensin kayıplarının kıyaslanması.

Monensin için, farklı pişirme usulleri ve saklama koşulları baz alınarak yapılan denemelerde kalıntı düzeyleri üzerinde kayıp oranları grafik 12 de verilmektedir.



Grafik 12: Isı faktörlerinin etkisinin kıyaslanması, pişirme usullerine göre kızartma et, haşlama et, ve dondurulmuş et örneklerindeki monensin kayıpları.

4.4.2. NARASİN GRUBU SONUÇLARI:

İyonofor antikoksidial içermeyen yemle beslenen tavuk dokularına konsantrasyonu bilinen standart narasin çözeltileriyle katım (spike) yapılarak test edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu çalışmada narasin ile katım yapılmış dokular farklı ısı işlemlerine maruz bırakılarak kalıntı düzeyinde ne gibi değişimler meydana geldiği test edilmeye çalışıldı. Isı faktörü olarak ülkemizde yaygın şekilde uygulanan pişirme ve saklama usulleri esas alındı. Mangalda kızartma, tencerede haşlama yöntemleri kullanıldı. Yine kesim sonrası stoklama amacıyla - 20 °C de muhafaza işlemine benzer şekilde derin dondurucuda 10 gün süreyle bekletilerek analize alındı.

4.4.2.1. Laboratuvar Ortamında Deneysel Olarak Uygulama (Spike doku):

Narasin için Kızartma Testi Verileri:

Spike çalışmalarında 100 ppb'lik narasin standart çözeltisi yüklenen dokuların kızartma işlemi sonrasında elde edilen kalıntı düzeyleri ve kayıp oranları.

Spike çalışmalarında kızartma testinde narasin kalıntılarının kayıp oranı			
Numune sayısı	Spike standart (ppb)	Tespit (ppb)	Kayıp % (ham veri)
n- 10	100	82.940	17.06
Ortalama		82.9	Std. sapma (± 3.7)
Reel Değerler %		Recovery : % 92	
	Ham veriler	Reel Değer %	Reel kayıp %
Kızartma etteki kalıntı miktarı %	82.9 (± 3.7)	90.2	9.8

Tablo 20: Spike çalışmalarında kızartma testinde narasin kalıntılarının kayıp oranı

Narasin için Haşlama Testi Verileri:

Spike çalışmalarında 100 ppb'lik narasin std. yüklenen dokuların haşlama işlemi sonrasında elde edilen kalıntı düzeyleri:

Spike çalışmalarında haşlama testinde narasin kalıntılarının kayıp oranları				
Numune sayısı	Spike std. miktarı (ppb)	Haşlama ette tespit ppb	Haşlama et suyunda tespit - ppb	Toplam kalıntı - ppb
n-10	100 ppb	75.5703	10.4444	86.0147
Ham Veriler (Oratalama)		75.6	10.4	Std. sapma (± 4.9)
Reel Değerler %		Recovery: % 92		
Haşlama ette kalıntı %	Et suyunda kalıntı %	Doku+su %	Ette kayıp %	Reel kayıp %
82.1	11.35	93.49	17.86 (± 4.9)	6.5

Tablo 21: Spike çalışmalarında haşlama testinde narasin kalıntılarının kayıp oranı

Narasin için Dondurma testi:

Spike çalışmalarında 100 ppb'lik narasin std. yüklenen dokuların – 20 C de dondurma işleminin sonrasında elde edilen kalıntı düzeyleri:

Spike çalışmalarında – 20 °C’de dondurma testinde narasin kalıntılarının kayıp oranı			
Numune sayısı	Spike standart (ppb)	Tespit (ppb)	Kayıp % (ham veri)
n- 10	100	89.540	10.46
Ortalama		89.5	Std. sapma (± 4.7)
Reel Değerler		Recovery % 92	
	Ham veriler	Reel Değer	Reel kayıp %
Donmuş etteki kalıntı miktarı %	89.5 (± 4.7)	97.3	2.7

Tablo 22: Spike çalışmalarında – 20 °C de dondurma testinde narasin kalıntılarının kayıp oranı

Narasin kalıntıları üzerine ısı faktörlerinin etkilerinin analizinde SPSS istatistik test sistemine göre ANOVA - Oneway analizinde Duncan hesaplama metodu kullanıldı.

ANOVA analizi verilerine göre; kızartma deneyinde 100 ppb spike yapılan tavuk eti dokularının analizinde ortalama % 82.94 ($\pm$ 3.7); haşlama deneyinde 75.42 ($\pm$ 4.9) dondurma deneyinde ise % 89.54 ($\pm$ 4.7) narasin kalıntısı bulundu.

Aynı satırda farklı harflerle girilen kızartma, haşlama ve dondurma grupları arasındaki fark ($P<0.05$ 'e göre) önemlidir.

- Narasin kızartma grubu ile narasin haşlama grubu kıyaslandığında istatistik analizine ($P<0.05$ 'e) aralarındaki kayıp farkı önemlidir.
- Narasin kızartma grubu ile – 20 °C'de dondurma grubu kıyaslandığında istatistik analizine ($P<0.05$ 'e) aralarındaki kayıp farkı önemlidir.
- Narasin haşlama grubu ile – 20 °C' de dondurma grubu kıyaslandığında istatistik analizine ($P<0.05$ 'e) aralarındaki kayıp farkı önemlidir.

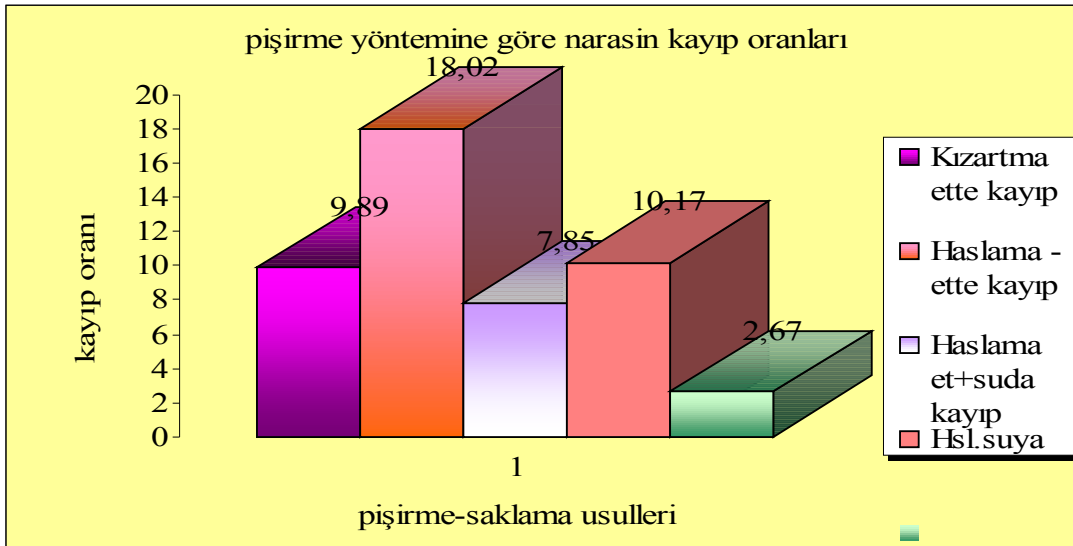
4.4.2.2.Narasin kalıntı düzeyine ısı faktörlerinin etkilerinin değerlendirilmesi:

Isı işlemlerinin etkileri araştırılırken elde edilen değerler ortalama veriler kullanılarak aşağıda grafik 10,11 de ve tablo 23 de sunulmaktadır. Narasin kalıntılarını azaltıcı yönde pozitif olarak etkileyen ısı faktörleri önemli sayılabilecek kayıplara neden olduğu gözlemlendi. Kızartma ve haşlama işlemlerinde sırasıyla % 9.89 ve % 17.86 oranında bir kayıp tespit edildi. Ancak haşlama işleminde yalnız tavuk eti olarak değerlendirildiğinde %17.9 olarak bulunan kayıp miktarı haşlama suyuna geçen kalıntı miktarı % 11.4 hesaba katıldığında % 6.5'e düşmektedir. Eğer haşlanmış tavuk eti ve suyu birlikte tüketilmesi halinde pişirme işlemiyle kayıp oranı % 6.5 olarak tespit edildi. Dondurma işlemi sırasında ise – 20 °C de % 2.7 olarak tespit edildi.

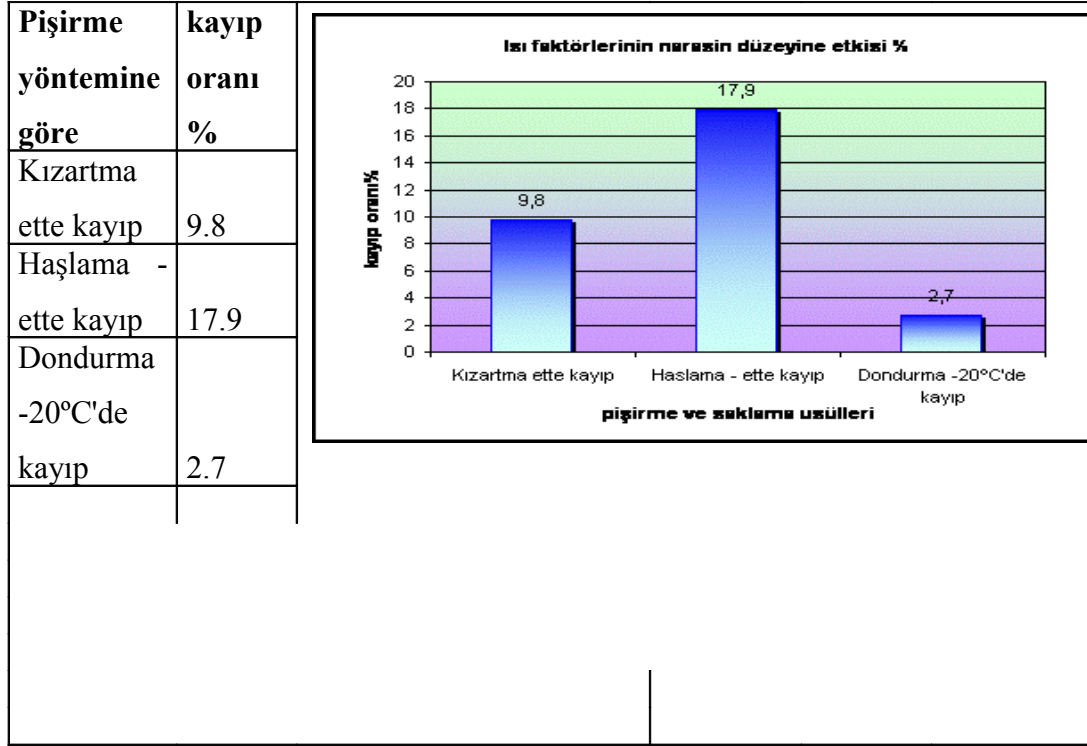
Narasin için farklı pişirme usulleri ve saklama koşullarına göre kalıntı seviyesindeki değişimler ve % kayıp oranları aşağıdaki tablo 23 ve grafik 13 de sunulmaktadır.

Piştirme yöntemine göre	kayıp oranı %
Kızartma ette kayıp	9.8
Haşlama - ette kayıp	17.9
Haşlama et+suda kayıp	6.5
Hsl.suya geçen	11.4
Dondurma -20°C	2.7

Tablo 23: Narasinin piştirme usullerine göre kayıp oranları



Grafik 13: Isı faktörlerinin etkisiyle piştirme-saklama usüllerine göre kızartma et, haşlama et, haşlama et ve suyu ve dondurulmuş et örneklerindeki narasin kayıplarının kıyaslanması.



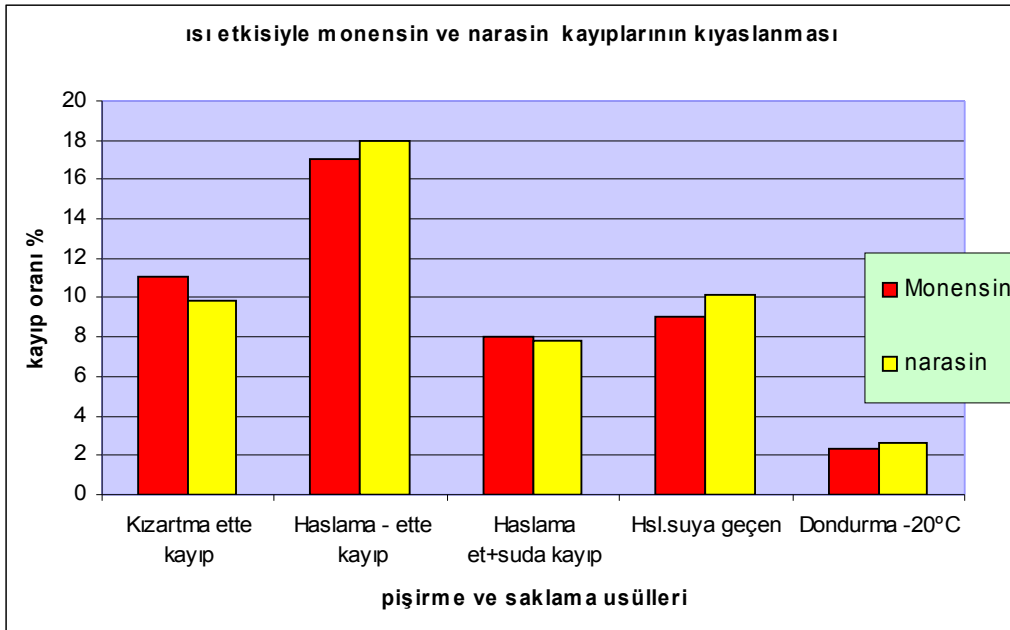
Grafik 14: Isı faktörlerinin etkisinin kıyaslanması, piştirme usullerine göre kızartma et, haşlama et ve dondurulmuş et örneklerindeki narasin kayıpları.

4.4.3. MONENSİN VE NARASİN KAYIPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Monensin ve narasin kalıntılarına pişirme ve saklama usullerine göre ısı faktörlerinin etkileri incelendi ve elde edilen verilere göre genel olarak benzer şartlarda kayıp oranları monensin ve narasin için paralellik arz etmektedir. Azda olsa farklılık arz eden değişimler kızartmada monensin narasine göre bir miktar fazla kayıp göstermekte haşlama et için ise narasin monensine göre az bir miktar kayıp göstermektedir.

Spike çalışmada monensin ve narasin kayıplarının kıyaslanması			
	Piştirme yöntemine göre	Monensin kayıp oranı %	Narasin kayıp oranı %
1	Kızartma ette kayıp	11.1	9.8
2	Haşlama - ette kayıp	17.04	17.9
3	Haşlama et+suda kayıp	7.99	6.5
4	Haşlama suya geçen	9.05	11.4
5	Dondurma -20°C	2.32	2.7

Tablo 24: Tavuk etini pişirme usullerine göre ısı faktörünün etkisiyle monensin ve narasin düzeyi oranlarının karşılaştırılması.



Grafik 15: Tavuk etini pişirme işleminde ısı faktörünün etkisiyle monensin ve narasin düzeylerindeki kayıp oranlarının karşılaştırılması.

4.4.4. İn vivo Çalışmada Isı Faktörlerinin Etkilerinin Araştırılması:

Tavuklara yedirme denemeleri (in vivo olarak) sonucu elde edilen tavuk etlerinin ısı işlemlerine maruz kalması sonucu gözlenen kayıp oranları spike çalışma sonuçlarına göre biraz daha yüksek bulundu.

4.4.4.1. Monensin ilaveli yemle beslenen tavuk dokularıyla (in vivo) çalışmada monensin kalıntı düzeyine ısı faktörlerinin etkileri:

Yedirme deneyi (in vivo) sonrası, pişirme işlemlerine bağlı olarak ısı faktörlerinin etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada elde edilen veriler ışığında kayıp miktarları hesaplanarak aşağıdaki tablo 25, 26’ da sunulmaktadır.

Monensin için kızartma usulüyle pişirme (in vivo)

Monensin için in vivo çalışma da kızartma test sonuçları			
Numune sayısı	Çiğ kas doku	Kızartma kas doku	Kayıp % (ham veri)
n- 10			13.0987
Ortalama	48.2	43.1	13.1 (± 5.1)
		Std. sapma	(± 5.1)

Tablo 25: Monensin için in vivo çalışma da kızartma test sonuçları

Monensin için haşlama usulü ile pişirme (in vivo):

Monensin in vivo çalışma da haşlama test sonuçları			
Numune sayısı	Çiğ kas doku	Haşlama et doku	Kayıp % (ham veri)
n- 10			19.9341
Ortalama	12.83	10.52	19.9 (± 4.7)
		Std. sapma	(± 4.7)

Tablo 26: Monensin - in vivo çalışma da haşlama testinde kayıp

Monensin kalıntıları üzerine ısı faktörlerinin etkilerinin analizinde SPSS istatistik test sistemine göre ANOVA - Oneway analizinde Duncan hesaplama metodu kullanıldı.

ANOVA analizi verilerine göre; monensin ilaveli yem yedirilen tavuk dokularının ısı işlemi görmemiş çiğ kas grupları, kızartma grubu ve haşlama grubuyla kıyaslanarak % kayıp oranları belirlendi. Çiğ kas dokusuna göre kalıntı kayıp oranı sırasıyla kızartma ve haşlama gruplarında % 13.1 (± 5.1) ve % 19.9 (± 4.7) olarak belirlendi.

- Monensin çiğ kas doku grubu ve monensin kızarmış kas doku grubu arasında istatistik analizine ($P<0.05$ ’e) göre kalıntı kayıp farkı önemlidir.
- Monensin çiğ kas doku grubu ve monensin haşlanmış kas doku grubu arasında istatistik analizine ($P<0.05$ ’e) göre kalıntı kayıp farkı önemlidir.
- Monensin kızartma grubu ve monensin haşlama grubu arasında kayıp farkı istatistik analizine ($P<0.05$ ’e) göre önemlidir.

4.4.4.2. Narasin ilaveli yemle beslenen tavuk dokularıyla (in vivo) çalışma ve dokulardaki narasin kalıntı düzeyine ısı faktörlerinin etkileri:

Narasin için kızartma usulüyle pişirme (in vivo):

Narasin için in vivo çalışma da kızartma test sonuçları			
Numune sayısı	Çiğ kas doku	Kızartma kas doku	Kayıp % (ham veri)
n- 10			11.2148
Ortalama	34.44	30.75	11.2 (± 3.3)
		Std. sapma	(± 3.3)

Tablo:27 Narasin için in vivo çalışma da kızartma test sonuçları

Narasin için haşlama usulüyle pişirme (in vivo):

Narasin için in vivo çalışma da haşlama test sonuçları			
Numune sayısı	Çiğ kas doku	Kızartma kas doku	Kayıp % (ham veri)
n- 10			20.4489
Ortalama	39.77	32.27	20.4 (± 7.6)
		Std. sapma	(± 7.6)

Tablo 28: Narasin için in vivo çalışma da haşlama test sonuçları

Narasin kalıntıları üzerine ısı faktörlerinin etkilerinin analizinde SPSS istatistik test sistemine göre ANOVA - Oneway analizinde Duncan hesaplama metodu kullanıldı.

ANOVA analizi verilerine göre; narasin ilaveli yem yedirilen tavuk dokularının ısı işlemi görmemiş çiğ kas grupları, kızartma grubu ve haşlama grubuyla kıyaslanarak % kayıp oranları belirlendi. Çiğ kas dokusuna göre narasin kalıntı kayıp oranı sırasıyla kızartma ve haşlama gruplarında % 11.2 (± 3.3) ve % 20.4 (± 7.6) olarak belirlendi.

- Narasin çiğ kas doku grubu ve narasin kızarmış kas doku grubu arasında kalıntı kayıp farkı istatistik analizine ($P < 0.05$ 'e) göre önemlidir.

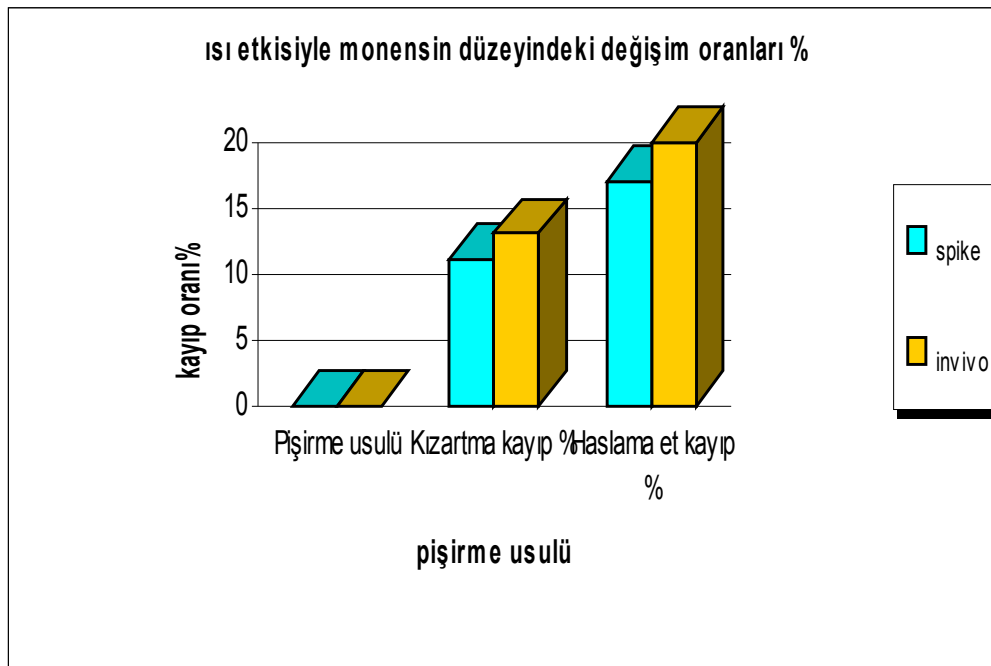
- Narasin çiğ kas doku grubu ve narasin haşlanmış kas doku grubu arasında kalıntı kayıp farkı istatistik analizine ($P < 0.05$ 'e) göre önemlidir.
- Narasin kızartma grubu ve narasin haşlama grubu arasında kayıp farkı istatistik analizine ($P < 0.05$ 'e) göre önemlidir.

4.4.5. Pişirme Yöntemlerine Göre Isı Faktörleri Etkilerinin Değerlendirilmesi

4.4.5.1. Spike ve in vivo çalışmalarda monensin kalıntı düzeyinde kayıp oranları:

Tavuk eti için pişirme usullerine göre monensin düzeyinde kayıp oranları		
Piştirme usulü	spike çalışma	in vivo çalışma
Kızartma kayıp %	11.1	13.1
Haşlama et kayıp %	17.04	19.93

Tablo 29: Tavuk eti için pişirme usullerine göre monensin düzeyinde kayıp oranları

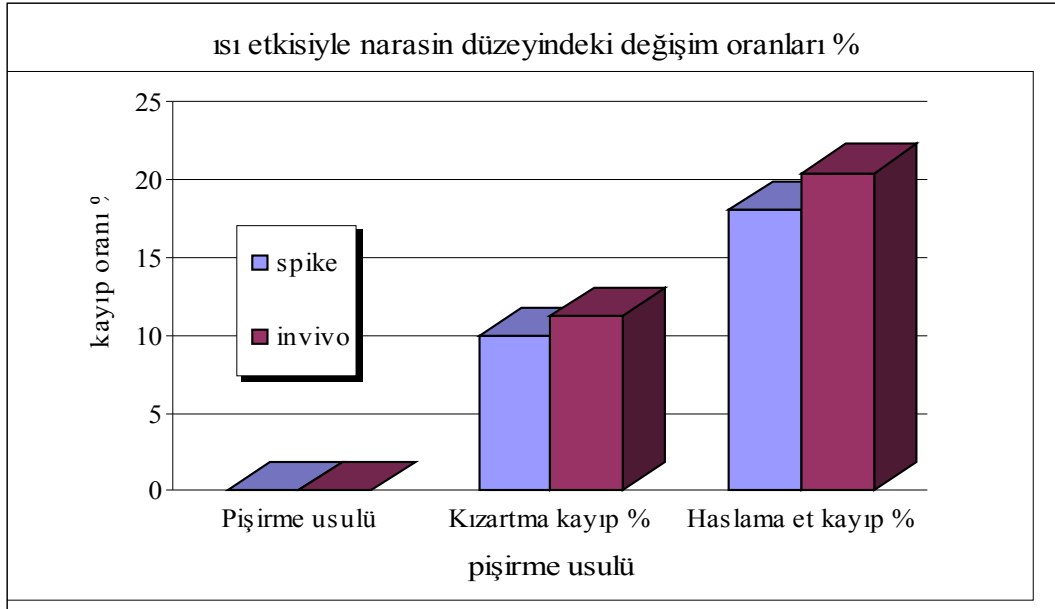


Grafik 16: Tavuk eti için pişirme usullerine göre monensin düzeyinde kayıp oranları

4.4.5.2. . Spike ve in vivo çalışmalarda narasin kalıntı düzeyinde kayıp oranları:

Tavuk eti için pişirme usullerine göre narasin düzeyinde kayıp oranları		
Piştirme usulü	spike	in vivo
Kızartma kayıp %	9.89	11.2
Haşlama et kayıp %	17.86	20.4

Tablo:30 Tavuk eti için pişirme usullerine göre narasin düzeyinde kayıp oranları

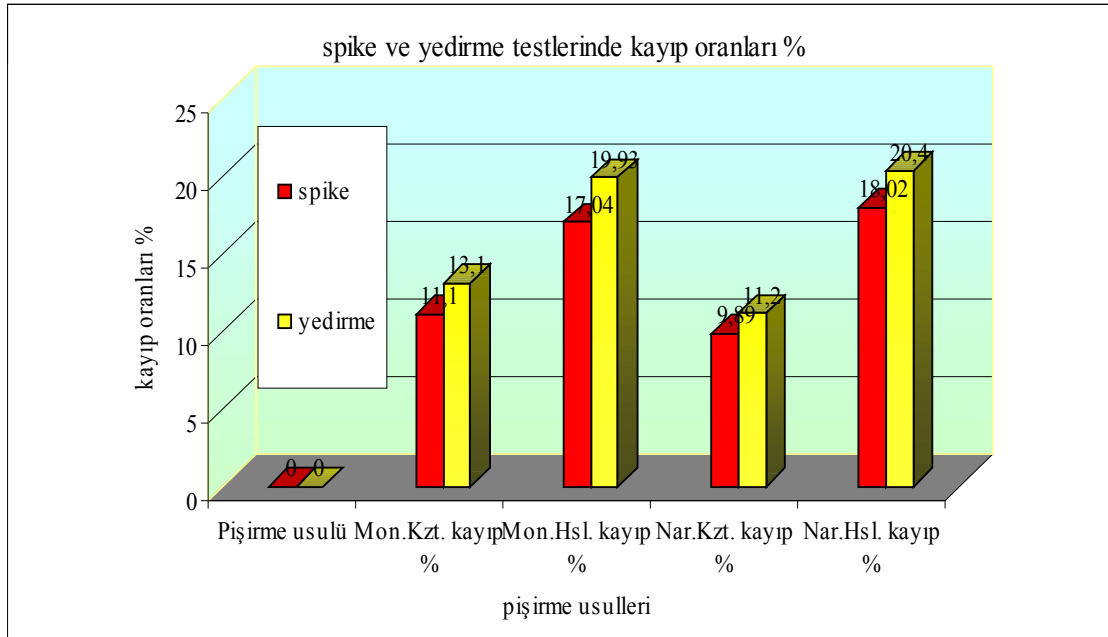


Grafik 17: Tavuk eti için pişirme usullerine göre monensin düzeyinde kayıp oranları

4.4.5.3. Monensin ve narasin kalıntıları için kızartma ve haşlama testlerinde spike ve in vivo denemelerinin karşılaştırılması:

Piştirme usulü	spike	in vivo
Mon.Kzt. kayıp %	11.1	13.1
Mon.Hsl. kayıp %	17.04	19.93
Nar.Kzt. kayıp %	9.89	11.2
Nar.Hsl. kayıp %	17.86	20.4

Tablo 31: Monensin ve narasin için spike ve in vivo - yedirme testlerinde alınan ortalama kayıp oranları



Grafik 18: Tavuk etinde ısı faktörlerinin etkileri ile spike ve yedirme testlerinde alınan kayıp oranlarının kıyaslanması.

4.5. GENEL DEĞERLENDİRME :

İyonofor grubu antikoksidial ilaçların kalıntıları üzerine kurulan çalışma programında, bu grubun üyelerinden monensin ve narasinin kanatlılarda yaygın kullanımı söz konusudur. Buna bağlı olarak doku ve ürünlerde gıda güvenliği bakımından olası riskleri değerlendirmek, piyasaya sunulan kanatlı doku ve ürünlerini doğrudan son tüketim noktasından alarak, gerçekçi bir analitik yaklaşım sağlamak ve Türk mutfağı pişirme tarzına göre ısı faktörlerinin etkilerini araştırmak gayesiyle iyi bir çalışma ve verimli neticeler alındı.

Elde edilen veriler ışığında; Gıdalarda ilaç kalıntılarının izlenmesi açısından PVKAE de referans laboratuvarlarında yapılan analizlerde piyasaya sunulan tavukların dokularında ve yumurtalarında insan sağlığı için tehlike arz edebilecek bir kalıntı bulgusuna rastlanmadı. Bunun en önemli etmenlerinden biri, gerek kanatlı sektörünün son yıllarda giderek bilinçli üretime yönelmesi, TKB'nın üretimden tüketime güvenli gıda politikası neticeinde 2000 yılından beri ulusal kalıntı izleme programına göre denetimlerini sürdürmesidir. Kısaca gıda kontrolü zincirindeki her halka, bilinçlenme sürecine girdiğinin göstergesidir.

Doğrulama testlerinde çok hassas düzeylere inilebildiği gözlemlendi. 0.5 ppb tespit limitine inilmesi AB laboratuvarlarına benzer değerlere ulaşılabilirdiğini ve stabil sonuçlar alınabildiği gözlemlendi. Geri alım kazancı ve tekrarlanabilirlik sonuçlarının da uygun olduğu test edildi.

VERİLERİN ANALİZİ

Çalışma planı dahilinde analitik sistemlerin performans testleri sonuçları referans metotlara uygun olarak tespit limiti, hesaplama limiti, lineerite, geri alım kazancı, tekrarlanabilirlik, geliş zamanı, doğruluk-kesinlik gibi temel parametrelerin sağlandığı belirlendi. Sonrasında piyasa sunulan tavuk eti ve yumurtalarında monensin ve narasin kalıntılarının araştırılması için toplanan numuneler ekstrakte edilerek analitik cihazlarda ölçümler yapıldı. Tavuk etlerinde ve yumurtalarda monensin ve narasin kalıntılarına rastlanılmadı.

Monensin için 693.7 kütle değerlerinin tespit limiti 1 ppb ve hesaplanabilir limit için 4 ppb düzeylerinde, geri alım kazancı % 80 ve ESI (+) iyonizasyon şartlarında tarama testleri yapıldı. Narasin için 787.8 kütle değerlerinin tespit limiti 2 ppb ve hesaplanabilir limit için 5 ppb düzeylerinde. geri alım kazancı % 85 ve ESI (+) iyonizasyon şartlarında tarama testleri yapıldı.

Yukarıda ifade edilen parametrelere göre LOD veya LOQ düzeyinde herhangi bir kalıntı tespit edilmedi.

Doğrulama analizlerinde analitik sistemlerin hassasiyet şartları ve analiz modüllerinin ayarları daha çok aranan molekülün parmak izi diye tabir edilen adres üzerine yöneltilmektedir.

Monensin için mass spectrumu olan 693.6 üzerinden daughter iyonları olan 1. iyon 675.1 ve 2. iyon 460.5 pik değerleri hedef alındı. Narasin için sırasıyla mass spektrumu 787.8, ana molekülden parçalanarak türemiş (daughter) iyonları olan 1. iyon 530.6 ve 2. iyon 430.7 pik değerleri hedef alındı.

LC-MS ve LC-MSMS sistemlerinde numunelerin analizlerinin neticesinde alınan kromatografik değerlerin hesaplanması ve verilerin karşılaştırılması, bir gıda maddesinin güvenliğini doğrudan ilgilendirecek hassasiyette sonuçların rapor edilmesi aşamaları önemli bir adımdır.

Monensin ve narasin kalıntıları üzerine ısı faktörlerinin etkilerinin incelenmesi aşamalarında iyonofor antikoksidiyaller bakımından negatif olduğu bilinen tavuklardan alınan doku örnekleriyle laboratuvar ortamında doku yüklemesi çalışmaları yapıldı. Bu spike edilen numunelerin kızartma, haşlama ve dondurma testleri sonrasında alınan sonuçları değerlendirildi ve ısı faktörlerinin etkilerinin kalıntı düzeyine etkisi incelendi. Grup içi ve gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Aynı şekilde broilerlere monensin ve narasin ilaveli yem yedirilerek kesim öncesi bekleme süresini temsilen doku örneklerinde kalıntı düzeyleri ve bunlar üzerinde ısı faktörlerinin etkileri incelendi.

İstatistiksel verilerin değerlendirilmesinde SPSS sistemi ile ANOVA istatistik programı kullanıldı.

5. TARTIŞMA

5.1- İyonofor antikoksidial ilaçların kalıntı analizlerinde analiz metodu ve performans değerleri üzerine;

Ulusal Referans Laboratuvar olan PVKAE de rutin olarak kullanılmakta olan analiz yöntemleriyle elde edilen sonuçlar ve kalibrasyon dataları metod performans kriterlerine göre tespit sınırları (LOD) ve hesaplanabilir ölçüm sınırları içinde (LOQ) olduğu gözlemlendi. Aynı çalışmanın C. Elliott ve arkadaşlarının yayınladığı derlemede yer alan LC-MSMS analitik parametreleriyle de paralellik arzettiği belirlendi (28). Söz konusu analitik çalışmaların in vitro çalışmalar olarak düzenlendiği ve farklı screening testlerin karşılaştırıldığı belirtilmektedir. Bunlardan ELISA yönteminde böbrek hücre kültüründe *E.tenella* antijenlerinin tespiti esasına dayanmaktadır ve tespit edilebilir limit (LOD): 0.5µg/L seviyesine inildiği rapor edilmektedir. Ancak bu yöntemde gerek inkübasyon süresinin uzunluğu, gerekse kısmi olarak diğer büyütme faktörleri ile etkileşme riski nedeniyle rutin testlerde sorun olabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle araştırma amaçlı çalışmalar için dikkate alınabilecek bir analiz yöntemi olarak değerlendirilebilir. Rutin testler için immun respons oluşması sırasında diğer büyütme faktörlerinin etkileri yanılığa neden olabilir (28).

Diğer bir tarama yöntemi ise TLC-Bioautographic analiz metodu ile hayvansal dokularda iyonophore grubu antikoksidiallerden monensin, salinomisin ve lasalosid kalıntılarının büyük bir kısmını tespit edebildiği belirtilmektedir. Ancak bu yöntemde de analiz süresinin uzunluğu, aynı zamanda ekstraksiyon solventlerinin büyük hacimlerde kullanılması dezavantajları olarak değerlendirilmektedir (28).

İmmuno assay screening test yöntemiyle yapılan analitik denemeler antikor üretim tekniğine dayanmaktadır. Bağışıklık kazanan hayvanlardan elde edilen antikorların, iyonofor koksidiyostatlarla bir taşıyıcı protein vasıtasıyla kompleks oluşturması sağlanmaktadır. Antikorlar (poliklonal ve monoklonal) iyonoforların çoğuna bağlanmaktadır Ancak az sayıda da olsa, salinomisin ve narasin hariç iyonofor metabolitlerine karşı çapraz reaktivite geliştiğini göstermiştir (28).

HPLC tekniği ile analitik çalışmalarda lasalosid, fluoresans kromatografik karakter göstermekte, diğer iyonofor kalıntıları ise türevlendirme (derivatizasyon) tekniği ile dokulardan ayrıştırılabilmektedir. HPLC yönteminde tüm karboksilik iyonoforlar için multiresidue çalışması mümkün olmamaktadır. Monensin, narasin ve salinomisin bir yöntemle kombine edilebilirken lasalocid tek başına ayrı bir ekstarksiyon tekniği ile ayrıştırılabilmektedir. UV/VIS dedektor kullanılarak hassas değerlere inilebilmektedir. Ancak lasalosidin ayrıca fluorescens dedektörle

analiz edilmesi gerekir.

Mass Spectrometric metot ile karboksilik iyonofor kalıntılarının doğrulama testlerinde en hasas ve düşük limitlere kadar analiz imkanı sunulmaktadır. Electrospray LC-MS sistemi, kolay ve hızlı bir ekstraksiyon yöntemiyle temizleme aşamaları gerektirir. Günümüzde de yayınlanmış metotlara göre kütle spektrometrik ve buna bağlı Tandem MS (Triple quadrapol) dedection sistemleriyle 0.5 ppb düzeylerinde hesaplanabilir düzeye (LOQ) inilebilmektedir.

Bu çalışmada kullanılan tarama test metotları PVKAE' de rutin olarak uygulaamakta olan ulusal referans metod olup kalıntı analizleri konusunda akreditasyona müracaat aşamasındadır. AB nin referans laboratuarlarından BVL tarafından ring testleri ve laboratuarlar arası işbirliği neticesinde doğrulanmış bir analiz yöntemidir. Tarama testleri için aranan kriterlerden biri olan genel tarama yani SIM modunda karboksilik iyonofor molekölü veya benzeri tüm olasılıkları inceler. Pek çok şüpheli veri içerisinde aranan molekölün kütle değeri sınırlarına uygun olanlar kromatografik olarak pozitif veya pozitif şüpheli olarak değerlendirir. Rutin veya araştırma amaçlı binlerce numune için uzun sürebilecek ve çok hassas analitik şartlar oluşturmak yerine kolay ve hızlı bir tarama testi ile bir yaklaşım sağlamak daha kullanışlıdır. AB' nin metot validasyonu kriterlerine göre tarama testleriyle elde edilen pozitif veya şüpheli numuneler miktar tayini ve hassasiyet testleri için MSMS tekniği ile doğrulanırken, negatif sonuçlardan da belirli bir sayıda örnekleme yaparak doğrulama gerekliliğini belirtmektedir. Her aşaması kontrol esasına dayanan ve gerek uygulayıcı ve gerekse analitik sistemlerden doğabilecek olumsuzlukları en aza indirebilecek bir dizi prensip ve kontrol işlemlerinin hazırlanmasını gerekli kılmaktadır.

E.Cheneau ve ark.'nın Fransa AFSSA'da kanatlılarda iyonoforların farmakokinetik çalışmaları için hazırladıkları bir araştırma sırasında LC-MSMS ile kantitatif bir analiz metodu geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu metod öncelikli dikkate alınan husus, EC direktifleri (EC/524/70), bu direktif üzerinde daha sonra yayınlanan regülasyonlar (1831/2003/EC) ve AB nin yem katkılarıyla ilgili resmi otoritesi EFSA'nın yayınladığı direktiflerdir (1,5,6,7,8,9,12). AFSSA laboratuarlarında Cheneau ve ark.'ı tarafından kanatlıların yenilebilir dokularında ve plazmada monensin kalıntılarını Liquid Chromatography Electrospray Tandem MS analizde, 0.5 ppb gibi oldukça düşük seviyelerde miktar tayini yapılabilen bu metodu valide etmişlerdir. Çalışmalarında hesaplanabilir düzey (LOQ) olarak ise 2.5 ppb olarak bildirilmektedir yani stabil olarak miktar tayini için hesaplanabilir güvenilir seviye olarak bu düzeyi test edebildiklerini bildirmektedirler.

Gerek AB ve gerekse diğer gelişmiş ölkelerde yürütölen analitik çalışmalarda sadece bir laboratuar için değöl işbirliğı yapılabilcek diğer laboratuarların da test edebileceğı en güvenilir ölçüm sınırlarını baz alınmaktadır. Sadece ulaşılabilcek en uç analitik sınırlara gitmenin maliyetini, zamanı verimli kullanmayı ve çevresel faktörleri de dikkate alınması gerekmektedir.

Çok hassas limitlere inilebilen ve doğrulama çalışmalarında kullanılabilecek bir metot olarak düzenlemişlerdir. AB nin CRL Community References Laboratory sorumluluğunda olduklarından bu metodu daha sonra AB ülkelerine de tavsiye etmişlerdir (23). Mobil fazda amonyum asetat ilave edilmesi iyonoforları ESI, pozitif iyonizasyon ve secici reaksiyon monitoring modu (SRM) için için son derece önemli olduğu belirtilmektedir. Bu özellik nedeniyle mobil faza amonyum tampon kullanımına gereksinim duyulmadığı belirtilemektedir. Mobil fazda organik çözücü olarak asetonitril ve su oranını (1/1) bire bir kullandığında analitik süre biraz uzun sürmektedir. Mobil fazı formik asit ile asitlendirdiklerini, ancak en düşük tespit seviyesinde recovery %58.7' ye düştüğü, diğer konsantrasyonlarda %88-102.2 olarak belirlendiği görülmektedir. Ayrıca analiz süresi de uzun olmakta; 16 dakikalık analiz süresinde monensin ve narasinin geliş zamanları da 11-12. dakikaları bulmaktadır.

Ekstraksiyon basamakları hemen tüm metotlarda birbirine benzemekle beraber küçük değişik uygulamalarla hassasiyet dereceleri değişmektedir. Dokulardan iyonoforların ayrıştırılması ve purifiye edilmesi amaçlandığından, SPE filtreler değişik marka ve modellerle kullanıma sunulmaktadır. Bu da belirli bir ekonomik değer oluşturmaktadır. Bir kısım araştırmacı ise filtrasyon yerine likit likit ekstraksiyon yöntemiyle biraz daha fazla solvent ve santrifuj işlemleri uygulayarak temizleme ve aranacak kalıntı miktarını en az kayıpla tespit edebilecek yöntemleri kullanmaktadırlar. Burada seçici olunacak nokta hem ekonomik, hem çevreci ve hemde halk sağlığı açısından istenilen performans değerlerine ulaşabilecek bir metot olmasıdır.

Cheneau'nun metodunda elde edilen performans değerlerinin geneli bizim uyguladığımız çalışmada elde edilen değerlerle uyumlu olduğu gözlenirken mobil fazda organik çözücü olarak metanol kullanımı ve metanol/su oranının (75/25) organik çözücü lehine artırılması analiz süresini 4 dakikalara indirmiştir. Kullanılan analitik kolon ise kısa boyutlu olduğundan kolonun her bir analiz için şartlanmasında sorun yaratmakta, peş peşe verilen enjeksiyonların performansını olumsuz etkilemektedir. Burada analiz süresini ve mobil faz akış hızını değiştirerek standart çözelti piklerinde tekrarlanabilirlik, doğruluk, kesinlik ve seçicilik özelliklerinde stabil sonuçlar elde edildi. Analiz süresini 6 dakikaya çıkartarak kolonun daha iyi şartlanması sağlandı, mobil faz isokratik akış programından gardient akış programına alındı. Cheneau, analitik kolon olarak C-18 kolon kullanmış, bizim çalışmamızda daha polar karakterde olan synergi max - RP kolon ve 20x2.0 mm, 5µ kolon kullanılarak analiz süresinin kısılması ve piklerin daha stabil görüntülenmesi sağlandı. İyonoforlar'dan monensin ve narasin için MRL değerleri en düşük 8 ppb olduğu düşünüldüğünde analizlerde 0.5 veya 1 ppb'den düşük seviyelere inmek pratik olarak bir anlam ifade etmemektedir.

Kullandığımız metot bir multiresidue analiz metodu olması nedeniyle genelde olduğu gibi az sayıda kimyasal çözelti kullanımı tercih edilmektedir. Ancak standart çözelti hazırlanması sırasında

daha uzun süreli stabiliteyi sağlamak için bir takım denemeler yapıldı. Cheneau ve Josen'nin metotlarında, stok çözeltiler metanol ile hazırlarken, Elliott, Kennedy gibi araştırmacıların kullandığı bir kısmı analiz metotlarında asetonitril kullanmışlar veya stok çözelti metanol ile hazırlanırken çalışma çözeltileri asetonitril ile hazırlanmaktadır. Bizim çalışmamızda hem asetonitril, hem de metanol ile

denemeler yaptığımızda önemli bir ayrıntı tespit edildi. Stok çözelti iyonofor koksidiyostatların yapısına en uygun ve stabiliteyi en iyi sağlayan çözücü belirlendi. Metanol hem stok çözelti, hem de çalışma çözeltilerinin hazırlanmasında en stabil sonuçların alınmasını sağladı. Narasin burada en sorunlu iyonofor olarak göze çarpmaktadır. Asetonitrille hazırlanan standart çözeltiler yapısı gereği çok çabuk yıkımlanmakta, aynı gün içinde devam eden analiz sırasında performans değerleri % 50-70 arasında kayba uğramaktadır. Buradan narasin için yıkımlanma sözkonusu olduğu anlaşılmış ve diğer metotlar detayli incelendiğinde methanolun daha stabil bir çözücü olduğu anlaşılmış ve denemelere metanol ile devam edilerek stabilite sağlanmıştır. Başlangıçta asetonitril ile hazırlanan çözeltilerin buzdolabı şartlarında 1 hafta süreyle kullanımı tavsiye edilirken son zamanlardaki çalışmalarda ise, günlük hazırlanması gerektiği ve özellikle stok standart çözeltilerinin methanol ile hazırlanması üzerine dikkat çekildiği gözlenmektedir. Bizim çalışmamıza ve kullandığımız aktif maddenin yapısına uygun olması nedeniyle metanol ile çalışma standart çözeltilerinin hazırlanması bize avantaj sağlamış ve gün içerisinde stabil çalışma imkanı vermiştir. İlk bölüm çalışmalarımızda ise 2-3 saat içinde dahi narasin düzeyinde önemli kayıplara neden olunduğu gözlenmiştir.

Tarama teslerinde PVKAE laboratuvarında rutin testlerde kullanılmakta olan LC-MS ve MSMS kullanılmıştır. Ancak bu cihazlarda meydana gelen arıza nedeniyle TÜBİTAK bünyesinde kullanılmakta olan ZİVAK AR-GE laboratuvarlarına ait LC-MSMS sistemiyle doğrulama çalışmaları yürütüldü. Burada analitik cihazlarının kalibrasyonu ve metot uyarlaması için biraz zaman kaybı yaşandı. Ancak daha yeni ve hassasiyet değerleri açısından daha verimli olan Gold Tandem Triple Quadrupole sistemiyle analizlerin tamamlandı. Aynı model cihazların ve analitik kolonların kullanımı neticesinde performans değerlerinin istenilen düzeye indirilmesi için yine AB nin referans metotları rehberliğinde ön denemeler yapıldığında 10 gün içerisinde istenilen performansa ulaşıldı. PVKAE Laboratuvarındaki sonuçlarla karşılaştırıldığında

sonuçları itibarıyla uyumlu olduğu görüldü. MRL verilmiş ürünlerde MRL/2 düzeyinde LOD'a ulaşılmasının yeterli olması hassasiyet bakımından önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir.

Bu denemelerde ilk numunelerin yeteri kadar purifiye edilememesinde kaynaklanan sorunlar yaşandı, ancak santrifuj işleminde 3000 RPM yerine 4000 RPM. yapılması, yine 10 dak olan santrifüj süresinin 15 dak.'ya çıkarılması gibi manüplasyonlar, santrifüj sıcaklığının 10 °C yerine 4 °C' ye indirilmesi, ekstraksiyon sırasında faz oluşumunda ortam ısısının önemi dikkate alınca

yaşanan zorluklar zaman içinde birer birer aşılabildi. Analiz metotlarının geliştirilmesinde en önemli husus laboratuvar şartlarının uluslar arası standartlara uygun şartlarda (Akredite veya GLP uyumlu) olmasıdır. Bu metotların farklı laboratuvarlara uyarlama çalışmalarında ise (laboratuvar içi validasyon) pek çok sorunlar yaşanmaktadır. Gerçek uygulama şartlarında mevcut cihazların performanslarından, kimyasalların kalitesinden, kısaca altyapının uygunluğundan ve analistlerin laboratuvar deneyimlerine bağlı olarak test sonuçları ve performansı üzerinde etkili olmaktadır. Kısaca şartları lehine çevirebilecek irade ve bakış açısı yaşanabilecek olumsuzlukların aşılmasında önemli olmaktadır.

Yumurta numunelerinin ekstraksiyonu sırasında yaşanan sorunlar: Yumurta analizlerinde ekstraksiyonda doku organik çözücü oranlarında ve kirliliğin azaltılması amacıyla kullanılan Na₂SO₄ tüplere ilave edildiğinde sorun yaşandı. Özellikle yumurtanın yapısı jeloz kıvamda olması nedeniyle katılaşma meydana gelmiş ve yumurta ekstraksiyonunda Na₂SO₄ kullanılmamış yerine organik çözücülerin oranlarını değiştirerek likit-likit ekstraksiyon yapıldı. Bu sorun tavuk dokularında yaşanmadı. Bu da yumurtanın yapısındaki albumin nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir.

Numune alımlarında karşılaşılan dikkat çekici bir husus: Gıda yasasında değişiklikler neticesinde genele olarak ve de özellikle büyük firmaların - markaların yumurtalarını açık violler yerine ambalajlı karton paketlerde veya violler üzerinde açıklayıcı bilgiler, adres ve kullanım süresi, imal yeri tarih v.b. notlar bulunan etiketler bulunan kapalı naylon ambalaj uygulamasına başlamışlar. Pek az örnek eskisi gibi açık viollerde herhangi bir bilgi veya tarih içermeyen küçük mahalle bakkallarında veya pazarda satıldığı müşahade edildi.

Örnek alınmasında göze çarpan bir husus. Bazı firmalar yumurtayı gramajlarına göre, organik oluşuna veya ilave vitamin, omega 3 ihtiva etmesi gibi ayırt edici özellikleri ön plana çıkaran gruplara ayırmışlar. Ancak bu konuda bakanlıkça yasal kriterler oluşturulmadığı ancak tescil v.b. izinlerle sunulduğu belirtilmektedir.

5.2- Tavukların antikoksidiyal yemle beslenmesi (in vivo çalışma) sırasında gözlemler üzerine değerlendirmeler:

Monensin içeren yemle beslenen tavukların narasin grubuna ve kontrol grubuna göre daha fazla tüketim yaptıkları ve kilo artışı sağladıkları ancak hareket kabiliyetlerinin azaldığı gözlemlendi. Klinik semptomlara bakıldığında besi süresinin son dönemlerde işaret edilen belirtilere rastlanıldı. Bu da gösteriyor ki, besi süresi başlangıcında görülmediği halde iyonofor grubu ilaçların yemle birlikte verilisinde günlük alım potansiyeli giderek artmakta, metabolizmanın bunu tolere etmede zorlanmakta ve hareket yeteneğinde azalma, aşırı su tüketimi ve alt ıslatma gibi semptomatik belirtiler ortaya çıkmaktadır. Monensin ve narasin gruplarında kontrol grubuna göre su tüketimi

daha fazla olduğu gözlemlendi. Tavukların kesim sonrası diseksiyonu sırasında M grubunun daha fazla yağlı olduğu buna karşılık, N grubunda karaciğer dokusu üzerinde yer yer renk değışiklikleri gözlemlendi. Birkaç tavuk karaciğerinde anormallik boyutunda bir durum belirlendi. Safra kesesinin atrofiye durumunda olduğu ve çok küçük ebatlarda ve iinin boş olduğu gözlemlendi.

Kontrol grubuna göre 10 günlük süre içinde her iki grupta da canlı ağırlık kazancının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu tablo iyonofor grubu ilaçların vücuda alınmasını takiben metabolik olarak yemden yararlanmanın artırılması, Ca, Na, K, gibi minerallerin hücreye girişlerinde artış ve dolayısıyla vücutta su tutulması, dokuların hücresel olarak kapasitelerin artması ve canlı ağırlık kazancında artış meydana gelmesine neden olduğu anlaşılmaktadır.

İyonofor ilaveli yemlerle besleme süresi sonunda yemlemeyi durdurulmasını takiben, monensin kalıntı düzeyi 1. gün hızla azaldığı; kas dokularında gün içinde MRL düzeyinin altına indiğı belirlenirken; sonraki günlerde kas dokularda MRL düzeyinde ve üzerinde herhangi bir monensin kalıntısı tespit edilemedi. Karaciğer dokuda ise 1.gün sonunda MRL düzeylerine indiğı belirlenirken, 3. gün MRL düzeyi ve bunun altında, 5. gün tespit limiti ve altına inmekte, 7. gün ise hiç bir düzeyde kalıntı tespit edilmedi.

Broyler karaciğerinde 1.gün 1.kesimlerde ortalama 62.79 ppb'lik bir ham veri elde edildi. Reel olarak % 95 geri alım kazancı hesaba katıldığında 68.25 ppb'lik bir kalıntı düzeyine eşdeğerdır.

10 günlük monensin ilaveli yemle besleme süresi bittiğinde ertesi sabah kesime başlandı. Gün içi ortalama kas doku için 15.5 ppb düzeylerinde bulundu. Karaciğer dokuda ise 1.gün ortalama monensin kalıntı düzeyi 29.46 ppb düzeyinde bulundu. 1. gün, 1. kesimlerde broyler kas dokularında ortalama 46.8 ppb'lik (ham veri) bir kalıntı düzeyine eşdeğerdır. % 95 geri alım kazancı hesaba katıldığında 49.26 ppb reel kalıntı olarak hesaplandı.

Narasin grubu broyler dokularında monensine benzer şekilde narasin kalıntı düzeyi de zamana bağılı olarak hızlı bir azaldığı, kas dokuda 1. gün hızla azalarak MRL seviyesi ve MRL düzeyinin altına indiğı tespit edildi. 3. gün MRL düzeyinin altında, 5. gün tespit limiti düzeyi ve altında bulunurken, 7. gün ise hiç bir düzeyde kalıntı tespit edilmedi. Karaciğer dokuda ise 1.gün sonunda kas dokuya göre biraz daha kontrollü bir azalım gösterirken, MRL düzeylerine indiğı belirlendi. 3. gün MRL düzeyi altında, 5. gün tespit limiti ve altında tespit edilirken, 7. gün ise hiç bir düzeyde kalıntı tespit edilmedi.

Broyler dokularında ilk gün 1. kesimlerde ortalama 59.23 ppb'den başlayan narasin kalıntı düzeyi, gün içinde kesim sonunda ortalama 6.7 ppb seviyelerine düştüğü; karaciğer dokusunda ise 78.9 ppb düzeylerinden 20.2 ppb düzeylerine indiğı belirlendi.

Narasin için sırasıyla kas ve karaciğer dokularında ham veri olarak ortalama 50.96 ppb ve

62.3 ppb düzeyinde bulunurken, reel olarak ise %92 gerilim kazancına göre kas ve karaciğer dokularında sırasıyla 55.39 ppb ve 67.7 ppb düzeyinde kalıntı seviyesine eşdeğer olduğu hesaplandı. Günlük değerleri baz aldığımızda gerek kas dokuda ve gerekse karaciğerde kalıntı miktarları hızlı bir düşüş göstermektedir. 3. gün yani 2 kesimlerde tespit limitlerine bir başka ifadeyle MRL düzeyinin altına indiği belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, kanatlı metabolizmasının oldukça hızlı olması ve monensin ve narasin gibi iyonofor koksidiyostatların formülasyonlarında yapılan geliştirme çalışmalarıyla kısa sürede vücuttan atılımın gerçekleştiği gözlenmiştir.

5.3. Dokulardaki kalıntı analizleri neticesinde elde edilen kromatogramlara göre değerlendirmeler:

Monensin grubu için besleme süresi sonunda yasal arınma süresinin 1. günü yapılan kesimlerde kas dokularındaki kalıntı düzeyi yüksek bulunmuştur. Gün içerisinde yapılan kesimlerde kas dokularda ortalama değeri 15.5 ppb düzeyinde tespit edilirken karaciğer dokusunda da 29.6 ppb seviyelerinde bulundu. Burada karaciğerde daha yüksek oranlarda değerler bulunabileceği beklenirken kas dokusundaki ortalamaların üzerinde değerlere bulunması dikkat çekicidir. Kas dokusundaki atılım grafiği eğrisi incelendiğinde atılımın daha uzun süreli olduğu gözlenmektedir. Akla ilk gelen sebep kanatlı metabolizmasının çok hızlı olması nedeniyle ana molekülün kısa sürede atılımı gerçekleşmekte olasılığıdır. Aynı zamanda kanatlı sektöründe ilk kullanımından (Elencoban, Lilly) günümüze kadar gelen süreç içerisinde molekül üzerinde de AR-GE faaliyetleri nedeniyle değişikliğe gidilmesi neticesinde kanatlılarda hızla metabolize olduğunu göstermektedir. Bu konudaki çalışmalar ilacın etkinliği yanında gıda güvenliğini de riske etmeden yasal arınma süresinin kısaltılması ve kesim öncesi zaman kaybetmeden tüketime sunulabilecek duruma getirilmeye çalışılmaktadır.

M.Rokka ve ark., yumurta numunelerinde uyguladıkları analiz metodunda narasin için LOD : 0.9 ppb, lasalosid için LOD: 2 ppb olarak elde etmişlerdir. Yumurtacı tavukların yemlerine narasin ve lasalosid ilave edilmesinin, yemlerine iyonofor ilave edilmemiş kontrol grubuna göre yumurta veriminde herhangi bir azalma veya değişiklik gözlenmediğini bildirmişlerdir. 7 günlük withdrawal period sonunda narasin kalıntısı konsantrasyonu ölçülmüş ve 0.9-1.7 ppb düzeylerinde tespit edildiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada lasalosidin daha hızlı transfer olduğu 3 gün içinde kalıntılarının tespit edilebildiği, salinomisin ise 10 günlük süre içinde kalıntısına rastlanıldığı bildirilmektedir (49).

Yıllar süren araştırmalar sonrasında AB'nin resmi otoritesi EFSA ve EMEA 2005, 2006 ve 2007 yıllarında peş peşe tebliğler yayınlamıştır. İyonoforlardan lasalosid 1994'lerde MRL almışken, diğerleri için uzun yıllara araştırmalar devam etmiş ve yıllar sonra sırasıyla narasin ve monensin için de EC tarafından MRL tebliğleri yayınlanmıştır. Kanatlılarda kullanıma sunulan pek

çok antikoksidial ürün arasında

iyonoforların gerek güvenilirlik ve gerekse halk sağlığı açısından bir adım öne çıktığı gözlenmektedir. Bu grup antikoksidial ilaçların risk parametreleri belirlenmesi, MRL verilmesi, monensin ve narasin için gıda güvenliği ve halk sağlığı dikkate alınarak yasal arınma süresi test çalışmaları sonuçları günlük alım limitleri (ADI) için belirlenen değerlerle ilgili raporlar dikkate alındığında iyonofor grubu antikoksidiallerin kullanımının daha da yaygınlaşabileceğini işaret etmektedir.

5.4. Isı faktörleri Üzerine yürütülen çalışmalarla ilgili değerlendirmeler:

Kanatlı dokularında iyonofor antikoksidial kalıntıları üzerine çok sayıda analitik çalışmalar yapılmış (23,26,28,29,37,49,51,60) ve farklı çalışma yöntemleri geliştirilmiştir (21,23,39,40,43,49, 50,51). Ancak ısı faktörlerinin etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmadı. Türkiye de Baydan ve arkadaşlarının sulfonamidler üzerine pişirme sırasında ısı faktörünün etkilerini araştıran bir çalışma yaptıkları ve az da olsa kalıntı düzeyinde bir kayıp kaydedildiği rapor edilmektedir (16,17).

M.Rokka ve ark., Finlandiya’da 2005 yılında yumurta tavuklarında narasin ilaveli yemle beslenmesi ve yumurtada narasin kalıntılarının araştırılması, narasin ilave edilmeyen yemle beslenenlere göre farklılıkları araştırmışlar. Bu çalışmada ayrıca yumurtanın sarısı ve beyazında kalıntı düzeylerini araştırmışlar, aynı zamanda 10 dakikalık pişirme sonrasında kalıntı düzeyindeki değişimleri incelemişlerdir. 21 günlük besleme periyodunun ardından yumurta sarısında tespit edilen narasin kalıntısı düzeyi 5.9-13.8 µg/kg (ortalama 10.6 µg/kg) olurken, yumurta beyazında kalıntı tespit edilememiştir. Kalıntı tespit edilen yumurtalar 10 dakikalık pişirme işlemi neticesinde ısı işlemi uygulanmayan yumurtadaki narasin konsantrasyonuna göre farklılıklar tespit edilmiş. Ancak bu istatistiksel bir anlam taşımadığı belirtilmektedir. Üzerinde daha geniş kapsamlı deneme çalışmaları gerekmektedir (49).

Dehai ve ark. (1996) kanatlı dokularında ormetoprim ve sülfadimetoksin kalıntılarının çeşitli pişirme, -20 °C’de dondurma ve bekletme ile az da olsa azaldığını, ancak bunun istatistiksel bir anlam ifade edebilecek kadar yeterli veri olmadığını belirlemişlerdir (24).

Bu çalışmalardan elde edilen verilerle kıyasladığımızda iyonoforlar üzerinde ısı faktörlerinin etkileri hakkında önemli bir veri elde edildiği düşünülmektedir. Çünkü hem monensin ve hem de narasin kalıntıları üzerinde pişirme yöntemlerine göre değişen oranlarda bir azalma söz konusu olduğu görüldü. Eğer haşlama tekniği ile pişirilmesi ve haşlama suyunun atılması halinde kanatlı etinde % 20’ ler düzeyinde azalma üzerinde durulması gereken bir kayıptır. Dolayısıyla konu üzerinde biraz daha spesifik araştırmalar yapılabileceği fikri oluşmaktadır. Ayrıca kızartma tekniğinde mangal tipi bir ızgara sisteminde kayıp oranları %10 lar seviyesinde olması dikkat çekicidir. Polar karakterdeki iyonoforların dokudan suya geçişleri, ısı etkisiyle buharlaşma sırasında

uçup uçmadığı ve olası buharlaşmadaki kayıp oranları araştırılabilir.

Yenilebilir kanatlı dokularında (kas, karaciğer) iyonofor kalıntılarının ısı faktörlerinden nasıl etkilendiği konusunda bir çalışmaya rastlanılmaması bu çalışmamızda bizlere bir açılım sağladı ve araştırılması gerekli olan önemli bir etmen olarak değerlendirildi. Kanatlı etinde ülkemiz şartlarında pişirme usullerinde uygulanan yöntemler esas alınarak deneme çalışmaları yapıldı. Ancak çalışmalarımız klasik yöntemlerle ve belirli bir pişirme süresi baz alınarak uygulama yapıldı. Tavuk eti için haşlama testinde bir tencere içinde ve az bir miktar su ilave edilerek pişirme yapıldı. Kızartma testinde ise bir mangalda çift taraflı olarak ızgara yapıldı. Isı işlemlerinde bir örnekliliği sağlama amacıyla sabit sıcaklık ve basınç faktörlerine uygun malzemeler kullanıldı.

Yöresel olarak kimi bölgelerde uzun süreli kimi bölgelerde kısa süreli, az sulu çok sulu pişirme yöntemleri kullanılabilir. Bu pişirme sırasında damak tadına uygun ilave bitkisel veya sos benzeri katkılar yapılabilmektedir. Bizim çalışmamızda sadece kızartma ve haşlama teknikleriyle yapılan denemelerde monensin ve narasin kalıntılarının nasıl etkilendiği araştırıldı. Buradan hareketle pişirme süresi, isteğe göre az pişmiş çok pişmiş talebinin etkileri, düdüklü tencere veya normal tencerede pişirme, kapaklı veya kapaksız tencere ile pişirme gibi pek çok doğrudan veya dolaylı etkileri de göz önüne aldığımızda çalışmaları belirli bir yaklaşım doğrultusunda ele alabiliriz. Yani çok sayıda faktör araştırma sonuçlarını az ya da çok etkileyebilecek durumda olabilir.

Isı faktörleri dikkat edilmesi gereken ve üzerinde farklı kriterleri baz alarak geniş çalışma konuları olan bir husustur. Toplumun tüketim alışkanlıklarının gıdalar üzerinde yapılan işlemlerin olası kalıntılar üzerine nasıl bir etki yarattığı, kalıntı seviyesi üzerine arttırıcı veya azaltıcı etkilerinin olup olmadığının tetkik edilmesi gerekmektedir. Özellikle henüz savunma sistemi gelişmemiş küçük yaştaki çocukların gelişimini yakından ilgilendiren ve hemen her gün sofralarımızın değişmez üyeleri olan gıda maddeleri üzerine eğilmek ve ısı faktörlerinin etkilerini irdelemek bu alandaki araştırmacılar için yenilik olabilir.

5.5. Tarama testi sonuçlarının değerlendirilmesi;

İstanbul'da tüketime sunulan kanatlı doku ve ürünlerinden alınan numunelerin analizlerinde pozitif kalıntı tespit edilememiştir. Bu durum bize şu yaklaşımı sağlamaktadır. Önemli bir tespit 2000–2005 yılları arasında kanatlı doku ve ürünlerinde kalıntı taramasının çok sıkı takip edilmesi ilk yıllarda alınan pozitif veya şüpheli durumların üzerine cezai yaptırımlar uygulanması kanatlı sektörünün daha dikkatli olunduğunun bir göstergesi şeklinde yorumlanabilir. Monensin ve narasin'in son zamanlarda ürün formülasyonunda yapılan iyileştirmelerle daha hızlı metabolize olması sağlanmıştır. Yasal arınma süresinin (Monensin) 6 saate kadar indirilmesi konusunda çalışmalar yapıldığı ve EFSA tarafından da raporlandırıldığı belirtilmektedir.

EFSA raporlarında yer alan araştırma sonuçlarına göre monensin ve narasin için belirlenen MRL ve Withdrawal time değerleri uzun süreli olarak ve farklı şartları, teknik, sistematik ve kişisel uygulama faktörlerini temel alarak yapılmakta ve ortalama en uygun verileri ölçüt olarak kabul etmektedir. Bu çalışmamızda elde edilen veriler itibariyle tutarlılık gösterdiği gibi hassasiyet konularında daha iyi sonuçlara ulaşmış olduğumuz önemli bir gelişmedir. Bu durumu üzerinde çalışılan analitik cihazlarımızın yeni ve yüksek hassasiyet değerlerine ulaşabilmekte ve stabilitesini muhafaza edebilmesi şeklinde ifade edilebilir. Bir sistemin farklı tarihlerde, farklı laboratuvarlarda ve farklı uygulayıcı kişilerce kullanılmasında birbirine yakın sonuçlar alınabilmesi olarak da değerlendirilebilir. Uygulama yapılan laboratuvarlar arası uyum, ring testi gibi ortak test çalışmalarıyla pekiştirilerek geçerlilik kazanır ve resmi yöntem olarak kullanılmaya başlanır.

EFSA 27 Temmuz 2004 yılında yayınladığı 70/524 sayılı EC direktifinde kanatlılar için koksidiyozis ile mücadelede korucu ve verim arttırıcı özellikleri nedeniyle kullanılmakta olan narasin için kas, karaciğer, böbrek, deri ve yağ doku gibi yenilebilir tüm ıslak dokularda 0.05 mg/kg olarak bildirilmiştir.

Aktif madde	kas	karaciğer	yağ/deri	Toplam kalıntı	KEGAL (ADI):
Monensin	8 µg/ kg	8 µg/ kg	25 µg/kg	19 µg/kg	(174-182 g) % 97-101
Narasin	50µg/ kg	50µg/ kg	50µg/ kg	50 µg/kg	< 5 µg/kg c.a.

Tablo 32: EFSA'nın Monensin ve Narasin için kanatlılardaki MRL tebliği değerleri

Tablodan anlaşıldığı üzere Monensin için bir insanın günlük alım limitleri ile ilgili olarak ADI: 174–182 g. Narasin için ise 5 ppb ve altındaki değerleri bildirmişlerdir.

AB'nin Sağlık Ajansı ve Veteriner Sağlık Ürünleri Kullanımı ve Gözlem Ofisi tarafından 16 Mayıs 2007 tarihinde yayınlanan 15 Mayıs 2007 tarihli kararıyla (EMEA/CVMP/192126/2007) monensin için maksimum kalıntı limiti olarak tavsiye edilen değerler yeniden belirlenmiştir. Aşağıdaki tabloda (tablo 33) görüldüğü üzere bir süre halk sağlığı açısından hiç bir bilgi yayınlanmayan iyonoforlarla ilgili yeni kararlar sunulmaktadır. Uzun yıllar kanatlı koksidiyozisi ile mücadelede vazgeçilmez şekilde kullanılmakta olan monensin ve narasin konusunda yürütülen çalışmaların olumlu sonuçlar verdiği anlaşılmaktadır.

Kanatlı doku ve ürünlerinde MRL değerleriyle ilgili yeni kararların AB otoritelerince peş peşe yayınlanması ve ardında hedef türlerin genişleyerek sığırlar için doku ve ürünlerde MRL verilmesi üzerinde düşünülmesi gereken önemli bir husustur. Mevcut şartlarda diğer antikoksidial ilaçların ve biyolojiklerin yanı sıra, iyonofor grubu antikoksidial ilaçların sıklıkla kullanılması, kısa süreli beslenme periyodunda verim arttırıcı, büyüme ve canlı ağırlık kazancında artış sağlanması asıl etkinin yanında büyük avantaj sağlamaktadır. Koksidiyozis ile mücadelede başarıyla kullanılmakta olan,

yıllarca ciddi bir direnç geliştiği saptanmayan bu tür yem katkılarına olan ilgi halk sağlığı açısından da yeterli riskli grubun dışında değerlendirilmektedir. Bu gelişmeler de, kalıntısı ve atılım sürelerinin net bir şekilde ortaya konulması ile birlikte gıdaların tüketime sunulduğu insanlar için tehdit oluşturmadığı, kısa sürede yasal arınma süresine sahip olması ve bu süreye uyulması halinde güvenli bir yem katkısı olduğu kanaati oluşturmaktadır.

İlaçların hedef türlerdeki etkileri ve kullanım sonrası atılım süreleri birden fazla laboratuarda ve tarafsız gözlem yapılan GLP belgeli ve akredite laboratuarlarda çok hassas değerlere kadar ölçülebilecek hale geldiğinden güvenli kullanım yönünde kararların alınmasına neden olmaktadır.

Farmakolojik aktif madde	Aranan Kalıntı adı	Hayvan türü	MRL değeri	Doku/ürün
Monensin	Monensin A	Sığır	2 µg/kg 10 µg/kg 30 µg/kg 2 µg/kg 2 µg/kg	Kas Yağ Karaciğer Böbrek Süt

Tablo 33: AB nin son monensin için yayınladığı 16 Mayıs 2007 sayılı kararları (EMA/CVMP/192126/2007)

5 gün boyunca peşpeşe Monteban 100 (80 mg kg⁻¹ yem) verilen kanatlıların dokularında narasin konsantrasyonunun zaman içerisinde dokulardaki konsantrasyonun nasıl değişime uğradığı aşağıdaki tabloda görülmektedir.

Son uygulama sonrası saat (h)	Doku konsantrasyonu (mg kg ⁻¹)			
	karaciğer	Kas	Böbrek	Yağ+deri
0	<0.042	<0.013	< 0.0254	0.059
6	<0.01	<0.01	< 0.01	<0.0282
12	<0.01	<0.01	< 0.01	<0.0254
24	<0.01	<0.01	< 0.01	<0.01

Table 34: Monteban 100 ile beslenen kanatlıların dokularında narasin konsantrasyonu

EFSA'nın raporlarında yer alan narasin ilaveli (Monteban 100) yemlerle beslenen kanatlılarda dokulardan hızla atıldığını, ilk kesim zamanı olan 0 saatte MRL düzeyi üzerinde tespitler yapıldığı, 6 ve 12. saatlerde yapılan kesimlerde sadece deri + yağ dokuda sırasıyla 28 ppb ve 25 ppb düzeyinde kalıntıya rastlanması hızla vücuttan atılımın gerçekleştiğini göstermektedir. Yaptığımız araştırmada, gerek in vivo ve gerekse in vitro çalışmalarda, ölçüm parametrelerimiz bu alanda yapılan son çalışmaların paralelindedir. Dolayısıyla, elde edilen veriler açısından ölçülebilecek en hassas ölçümler yapılabilir durumdadır. Monensin ve narasin ile beslenen

broylerlerin her bir grubunda da 6 saatten sonra kas dokularında MRL ve üzerinde herhangi tespit yapılmadı. Karaciğer dokusunda 1. gün içerisinde MRL düzeyine yakın değerler alınmasına rağmen gün sonuna doğru kesilenlerde kalıntı düzeyi 0 veya sıfır düzeyine çok yakın bulunması monensin ve narasin bu günkü formulasyonlarıyla kullanımında vücuttan atılımı oldukça hızlıdır. Halk sağlığı açısından kesim sonrası bekletme süresi olarak 1 gün yeterli olabileceği anlaşılmaktadır. Kas gruplarında 6 saat, karaciğer için 12 saat, deri ve yağ dokuları için 24 saatlik bekleme süresi baz alınırsa hemen bütün işletmeler akşamdan aç bıraktıkları hayvanları sadece su verilerek kesime aldıkları düşünülürse zaten pratikte dikkatle uygulandığı gözlenmektedir.

Monensin, narasin ve diğer iyonofor grubu antikoksidiyallerin yumurtacı gibi diğer kanatlılarda da kontrol edilmesi gelecekte önemli bir açılım sağlayabilir. Aynı zamanda küçük yaşlarda henüz rumen florası gelişmemiş kuzu, oğlak ve buzağılarda koksidiyozise karşı uygulamalarda iyonoforların atılımını ve etkinliğini araştırılması, bunların halk sağlığı açısından dokulardaki birikimi araştırılabilir. Ayrıca süt hayvanlarında uygulanması esnasında süte geçişi, sütte geçen olası kalıntılar üzerine ısı faktörlerinin etkileri yine UHT işleminin etkilerinin araştırılması kalıntı riski yönünden de önemli sonuçlar çıkarabilir.

KAYNAKLAR

1. **Anon (2007)**, Commission Regulation (EC) No 109/2007, of 5 February 2007 concerning the authorisation of monensin sodium (Coxidin) as a feed additive Adopted on 21 Nov. 2006. The EFSA Journal (2007) 109.
2. **Anon (2007)**. T.K.B. Yem Katkı ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı Ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ. Yetki Kanunu: 1734, Yayımlandığı Resmi Gazete: 03.05.2007, sayı: 26511 Tebliğ No 2007/9
3. **Anon (2007)**, Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliğinde değişiklik yapılması hakkında tebliğ. Tebliğ No: 2007/17, Resmi Gazete 09.03.2007, Sayı 26457.
4. **Anon (2007)** T.K.B Ulusal Kalıntı Kontrol Planı. 2007, KKGM, Akay Cad. No:3 06100 Bakanlıklar/Ankara,
5. **Anon (2007)** “Cross-contamination of non-target feedingstuffs by monensin authorised for use as a feed additive” Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. European Food Safety Authority, Adopted on 26 November 2007. The EFSA Journal (2008)592, 1-40.
6. **Anon (2007)** “Cross-contamination of non-target feedingstuffs by narasin authorised for use as a feed additive” Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. European Food Safety Authority, Adopted on 20 September 2007. The EFSA Journal (2007) 552, 1-35
7. **Anon (2006)** EMEA, Monensin, Summary Opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary use on the Establishment of Maximum Residue Limits, Summary Report. 16 May 2007 EMEA / CVMP / 192126 / 2007
8. **Anon (2006)** Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the Maximum Residue Limits for Monensin Sodium for chickens and turkeys for fattening, Adopted on 20 Nov. 2006, The EFSA journal (2006), 413, 1-13
9. **Anon (2005)** Update of the opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on a request from the EU Commission on the evaluation of the coccidiostats COXIDIN (Monensin Sodium), Adopted on 20 October 2005, The EFSA journal (2005), 283-1-53
10. **Anon (2005)** T.K.B. Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler İle Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik. Resmi Gazete: 19.01.2005 No: 25705

11. **Anon** (2004)Update of an opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the re-evaluation of coccidiostat, The EFSA Journal (2004) 77, 1-45
12. **Anon** (2003), European Parliament and the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition E.C.No: 1831/2003/E-JC
13. **Anon**(2002), Yem Katkı Ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı Ve Kullanımı Hakkında Tebliğ. Yetki Kanunu: 1734, Resmi Gazete: 18.12.2002, 24967 Tebliğ No 2002/66
14. **Anon** (1997), Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği 16 Kasım 1997 tarih ve 23172 sayılı Resmi Gazete Başbakanlık Basımevi, Ankara
15. **Barragry**, Thomas B. (1994), Veterinary Drug Therapy, Department of small animal clinical studies, Faculty of Veterinary Medicine University College Dublin Ireland. 1994. Lea&febiger 200 chester field parkway. Malvern, Pennsylvania 19355-9725 USA, 609-616
16. **Baydan E**, Özdemir M ve Kanbur M.(2001), Kanatlı dokularındaki sülfadiazin kalıntıları üzerine pişirme, dondurma ve benzeri işlemlerin etkileri, Çiftlik Dergisi. 203.81–90
17. **Baydan, E.**, Akkaya R., Traş. B., Bilgili A., Tanyıldızı S., Filazi A., Yarsan E. Özdemir. M. (1998) Etlik piliçlerde kullanılan çeşitli veteriner ilaçlarının kalıntıları üzerine pişirme, dondurma ve benzeri işlemlerin etkilerinin araştırılması: 1-Sülfonamid grubu bazı antibakteriyellerin incelenmesi, 2-Kinolon grubu bazı antibakteriyellerin incelenmesi. (TAGEM HS/98/16/02).
18. **Beasley, V** (1999), IVIS, Organic compounds that effect the heart Veterinary Toxicology.
19. **Bilgili, A.**(1990) Kanatlı üretiminde gelişmeyi hızlandırıcı ve koruyucu amaçla kullanılan antibakteriyel maddeler. Türk Vet. Hek. Derg. C:2 Sayı:7-8 S:31-36
20. **Bishop, Y.M.**(1996) The veterinary formulary, in: Handbook of Medicines Used in Veterinary Practice, 5th ed., Royal Pharmaceutical Society of Great Britain and British Veterinary Association, London, pp.176-178, 1996
21. **Callaway, T.R**, et all.(2003) Ionophores (such as monensin, lasalocid, laidlomycin, salinomycin and narasin) are antimicrobial compounds that are commonly fed to ruminant animals to improve feed efficiency. Curr. Issues Intest Microbiol, Sep 2003
22. **Chen, Min. et.all** (1979) Effect of Monensin and Lasalocid-Sodium on the Growth of Methanogenic and Rumen Saccharolytic Bacteria. Division of Laboratories and Research, New York State Department of Health, Albany, New York 12201
23. **Cheneau, E. et all.** (2007), Liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies. J. Of Chromatography B. 850, 2007, 15–23
24. **Dehai**, et all (1996), Effect of cooking on residues of ormetoprim and sulfadimethoxine in the muscle of channel catfish, Food Res. İnt, 29(3-4):339-344

25. **Dimenna, G.** (1989), Effect of antibiotic combination, dosing period, dose vehicle, and assay method on Salinomycin residue levels and their ionophoricity. *J.Agric. Food Chem.*1989, 37, 668-676
26. **Dubois, M. G., et.all** (2004) Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, Volume 813, Issues 1-2, 25 December 2004, Pages 181-189
27. **Ebrahimezhad, Y.**(2005). Effects of ionophorous drugs, salinomycin and lasalocid, on the performance of broiler chicks and the relations ship of these drugs to suplemantary methionin.*J.of Poultry science* 4 (11): 911-916
28. **Elliot, C. et.all.** (1998) Methods for the detection of polyether ionophore residues in poultry. *Veterinary Science Division, Stoney Road, Belfast,UK Analist*, june 1998 Vol.123(45R-56R)
29. **Jestoi, M. et. all.** (2007) An integrated sample preparation to determine coccidiostats and emerging Fussarium-mycotoxins in various poultry tissues with LC-MS/MS. *Journal Mol.Nutr.Food Res.* 51,625-637
30. **Jordan, F.T.W.** (1990) *Poultry disease.* Bailliere Tindal, İSBN 0-7020-1339-0 / 24-28. Oval road London/England 1990
31. **Kaya, S. ve ark.** (2002) *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*, Medisan yayınevi. Yayın no: 53 s:628-629,696 Ankara
32. **Kaya, S. ve ark.**(2000) *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji.* Medisan Yayınları seri 42 Ankara, Cilt 2, Protozoonları etkileyen ilaçlar, 489-494.
33. **Keleş, O.** Yıldırım, M. Gargılı, A. Arslan, M.Ö (1995) Salinomisinin aralıklı uygulanmasının antikoksidial etkisi. *İ. Ü. Vet. Fak. Derg.*2 (2)327-333,
34. **Keleş, O. ve ark.**(1995). İyonofor antikoksidial ve florokinolon antibiyotikler arasında etkileşim üzerine çalışmalar *İ. Üniv. Vet. Fak. Derg. C:21 Sayı:1* 1995
35. **Keleş, O. Ve ark.** (1995). Aflatoksin B1'in salinomisinin antikoksidial etkinliği ve koksidiyoza karşı oluşan immunité üzerine etkisi. *Pendik Vet. Mikrobiol. Derg. C:26 Sayı:1 S:91–99*
36. **Keleş, O.** Yıldırım, M. Ozan, K. Şener, S (1995). Bazı terapötik ajanların koksidiyoza karşı oluşan immünite üzerine olan etkileri. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 26(1) 101–110
37. **Kennedy, D.G,** Hughes PJ Blanchflower WJ., (1998) Ionophore residues in eggs in Northern Ireland: incidence and cause. *Food Addit. Contam. Jul;* 15(5):535-41.
38. **Kennedy, D.G.;** et al (1996); The incidens and cause of lasalocide residues in eggs in Northern Ireland *Food Add.Cont.,* 13-787-794
39. **Lynas, L.** Currie, D. McCaughey, W.J. McEvoy, J.D.G. Kennedy, D.G. (1998) *Food Addit. Contam.* 15, p: 162. 1998
40. **Matabudul, D. K.** Lumley, I. D. Points J. S. (2002) The determination of 5 anticoccidial drugs

(nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) *Analyst*. Jun; 127(6):760-8.

41. **McDouglas, L.R.**, et al (1998), Residuel activity of veteriner drugs in chickens after withdrwal of medicated feed, *Veterinary Parasitology* 74, 91-99
42. **McEvoy, J. D. G.** (2002)Contamination of animal feedingstuffs as cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Analytica Chemica Acta* 473, 3-26
43. **Mortier L**, Huet, AC. Charlier, C. Daeseleire E. Delahaut, P. Van Peteghem C. (2005)Incidence of residues of nine anticoccidials in eggs. *Food Addit Contam. Nov.* 22(11):1120-5.
44. **Mortier, L.** et. all. (2004) Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed.*Journal of Chromatography B*, 820,(2005) 261-270
45. **Oehme, F.W.** et.all. (1999) An analysis of the chronic oral toxicity of polyether ionophore antibiotics in animals. *Vet Hum Toxicol.*Aug; 41(4):251-7. Review
46. **Ozan, K** ve ark. (1993) Veteriner Hekimlikte kullanılan antiparaziter ilaçlar. İst. Üniv. Veteriner Fak. yay. Ders notu No:11 Avcılar/İstanbul
47. **Parelman, B.**; et all (1993) Effect on the accidental feeding lasalocide sodium to broiler breeder chickens. *Vet. Record* 13, 271-273
48. **Petekaya E.**(2001) Koksidiyozis ve Yem Katkılarıyla Koksidiyozis Kontrolü.Çiftlik Hayvanlarının Beslenmesinde Temel Prensipler Ve Karma Yem Üretiminde Bazı Bilimsel Yaklaşımlar. (Ed. H.Melih Yavuz) *Farmavet İlaç San ve Tic. A.Ş.* yayınları sayfa 803 – 834.
49. **Rokka, M.** Eerola, S. Perttila, U. Rossow, L. Venalainen, E. Valkonen. E. Valaja. J. Peltonen, K. (2005) The residue levels of narasin in eggs of laying hens fed with unmedicated and medicated feed. *Mol. Nutr. Food Res.* Jan; 49(1):38-42.
50. **Rokka, M.** Peltonen, K (2006) Simultaneus determenation of four coccidiostats in eggs and broiler meat: validation of an LC-MS/MS method, *Food Addit. Contam;* 2006, 23, 470-478
51. **Rosen, et. al.**(2001). Efficient and sensitive screening and confirmation of residues of selected polyether ionophore antibiotics in liver and eggs by Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analyst* 2001, 126,1990-1995
52. **Riddell, F.G.** (1990) The transport of Na⁺ and K⁺ ions thorough phospholipid bilayers mediated by the antibiotics salinomycin and naracin studied by ²⁹Na and ³⁹K-NMR spectroscopy. *BBA report, Biomembranes* Vol. 1024, Issue 1, 9 May 1990, pages 193–197
53. **Şener, S.**, (1993) Kanathılarda Karboksilik İyonoforların Toksikolojisi. *Uluslararası Tavukçuluk Kongresi.* 13–14 Mayıs 1993, Tebliğ; 337,
54. **Şener, S.**, Özel Farmakoloji (2006) İstanbul Üniv. Veteriner Fak. Yay. Yayın No: 4671, İSSN 975-404-770-7 s: 174-176 İstanbul

55. **Şener, S.**, (1995) Kanatlılarda sindirim dizgesinin morfo-fizyolojik özellikleri ve kanatlı farmakolojisi. Uluslararası Tavukçuluk Kongresi "95, 24–27 Mayıs 1995 İstanbul, Bildiriler, S:204–210
56. **Şanlı, Y.** Akar, F. Bilgili, A. (1993), Et tipi piliçlerde altlığı ıslatma sendromuna yol açan katılımcı etmenler üzerinde araştırmalar. Uluslararası Tavukçuluk Kongresi, 13–14 Mayıs 1993, İstanbul Bilimsel Tavukçuluk Derneği Yay. S:376–389,
57. **Unal H.H.**, (1999) Sığırların kas ve karaciğerlerinde benzimidazol grubu antihelmintik ilaç kalıntıların HPLC yöntemiyle analizi üzerinde çalışmalar. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, Haziran 1999 cilt 30 sayı 1, sayfa: 47–54
58. **Yadav, A.**, et all. (2001). Study of resistance against some ionophores in eimeria tenella field isolates. Veterinary Parasitology 102, 69–75.
59. **Williams R.B.** (2006) Relative virulances of a drug-resistant and a drug sensitive strain of Eimeria acervulina, a coccidium of chickens. Elsevier, Veterinary Parasitology 135, 15–23
60. **Wunsch, H.** et. all. (2004); Validation and Determination of Vet Drug Residues in Food and Feeding Stuff considering as Example of Coccidiostats by LC-MS-MS. Galab Laboratories Analyses Services.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : B.30.2.İST.0.06.00.00-5424
Konu : Etik Kurul Başvurusu

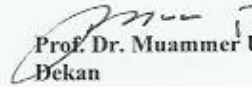
31.10.2006

FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi: 16.10.2006 tarih ve 2006-175 sayılı yazınız.

Anabilim Dalınız Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Oya KELEŞ'in danışmanlığı altında doktora eğitimini sürdüren Uzm. Vet. Hek. **Hasan Hüseyin ÜNAL**'a ait olan "**Kanathı doku ve ürünlerinde iyonofor grubu antikoksidial ilaçlardan Monensin ve Narasin kalıntılarının araştırılması ve farklı ısı işlemlerinin kalıntı düzeyi üzerine etkisi**" adlı Araştırma Projesinin Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna dair Etik Kurulun 31.10.2006 tarih ve 2006-35 sayılı yazısı ekindeki 31.10.2006 tarih ve 2006/175 sayılı kararı ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. Muammer UĞUR
Dekan

Ek 2: Etik Kurul Yazısı
Etik Kurul Kararı

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK KURULU

Sayı:2006/35

31.10.2006

İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlığı'na,

Fakültemiz Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Oya KELEŞ'in danışmanlığı altında doktora eğitimini sürdüren Uzm.Vet.Hek.Hasan Hüseyin ÜNAL'ın hazırlamış olduğu *"Kanatlı Doku ve Ürünlerinde İyonofor Grubu Antikoksidiyal İlaçlardan Monensin ve Narasin Kalıntılarının Araştırılması ve Farklı Isı İşlemlerinin Kalıntı Düzeyi Üzeriner Etkisi"* başlıklı araştırma projesine ait Etik Kurul kararı ekte sunulmuştur.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla arz ederim.



Prof.Dr. Tamer DODURKA

Etik Kurul Başkanı

Ek: 2 adet Etik Kurul Kararı

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK KURULU

İstanbul University Veterinary Faculty Ethic Committee

Karar No:2006/175

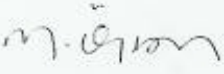
31.10.2006

İlg: İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlığı'nın 5297 sayı ve 19.10.2006 tarihli yazısı;

Fakültemiz Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Oya KELEŞ'in danışmanlığı altında doktora eğitimini sürdüren Uzm.Vet.Hek.Hasan Hüseyin ÜNAL'ın hazırlamış olduğu "*Kanatlı Doku ve Ürünlerinde İyonofor Grubu Antikoksidiyal İlaçlardan Monensin ve Narasin Kalıntılarının Araştırılması ve Farklı Isı İşlemlerinin Kalıntı Düzeyi Üzerine Etkisi*" başlıklı araştırma projesi kurulumuz tarafından incelenmiş ve "**Etik Kurul İlkelerine Uygun Bulunmuştur**".


Prof.Dr. Tamer DODURKA
Başkan


Prof.Dr. Oya KELEŞ
Başkan Yardımcısı


Doç.Dr. Mustafa ÖZCAN
Raportör

Doç.Dr. Ayşen ALTINER
Üye

Yard.Doç.Dr.Dr. Altan ARMUTAK
Üye

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hasan Hüseyin	Soyadı	ÜNAL
Doğ.Yeri	Söğüt	Doğ.Tar.	05.02.1965
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	34273052770
Email	hasanhunal@yahoo.com.tr	Tel	0 505 6707676 / 0532 7655453

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	Devam ediyor
Uzmanlık Eğit.	TKB, Pendik Veteriner Kontrol ve Arşt. Enst.	1998
Yük.Lis.	Fırat Üniversitesi	1988
Lise	Eskişehir Bahçelievler	1981

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Uzm Vet. Hekim, Toksikoloji Lab. Şefi	TKB Pendik Vet.Kont. ve Arşt. Enst.	1995- ---
2.	Veteriner Hekim	TKB. İnhisar İlçe Müd.	1993- 1995
3.	Veteriner Hekim	TKB. Iğdır- Aralık İlçe Müd.	1990-1993

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	50	
Fransızca	orta	zayıf	zayıf	-	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	46.252	45.629	45.005
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Autocad	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1.	Yüksek Lisans Diploması	Haziran, 1988	Fırat Ün. Veteriner Fak.
2.	Epidemiyoloji ve Bioistatistik	Nisan, 1995	Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü
3.	Mikoplazmosis	Mayıs 1995	Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü
4.	Anaerob	Ekim, 1995	Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü
5.	Poultry Coccidiosis	Eylül, 1996	Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü
6.	Brucellosis on Serological Methods	Ekim, 1996	Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü
7.	Chlamydiosis	Mayıs 1997	Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü
8.	Mikotoksinler ve Pestisitler, Yaz Okulu	1997	Ankara Ün. Veteriner Fak. Farmakoloji-Toksikoloji A.B.Dalı
9.	Uzmanlık Belgesi, Farmakoloji-Toksikoloji Bilim Dalı	Kasım, 1998	Tarım ve Köyşleri Bakanlığı
10.	Veterinary Drugs Quality Control and Residue analyses	Ekim, 1998	CNEVA –Fougeres, FRANCE
11.	Datasel Eğitim Sertifikası	Mart 1998	Datasel Eğitim Merkezi Ankara
12.	VIII. Beş Yıllık Kalkınma Planı Öze İhtisas Komisyonu	Aralık 1999	T.C. BAŞBAKANLIK Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığı
13.	Veteriner İlaçları Kalite Kontrol Testleri ve Farmakolojik Testler	Mayı- Haziran, 2000	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı
14.	Görevde Yükselme Eğitim Programı Katılım Sertifikası	Ekim 2000	TKB Personel Genel Müdürlüğü
15.	Pharmacovigilance For Veterinary Medicinal Products	Haziran 2001	TAIEX, EMEA, BGVV Laboratories, Berlin, Germany
16.	Food Analysis and Monitoring for Food Safety	Kasım 2001	Tubitak- Agilent, Istanbul
17.	English Courses Certificate Pre-intermediate	2001-2002	British English, Istanbul
18.	English Courses Certificate Upper-intermediate	2002-2003	British English, Istanbul
19.	Homotoxicology in Veterinary Medicine	Nisan 2002	The International Society of Homotoxicology Baden-Baden, Germany

20.	International Veterinary Public Health	Nisan, 2003	MASHAV-CINADGO
21.	Interlaboratory Testing of Certain Residues	Haziran 2003	TAIEX Office, Berlin, Germany
22.	Atomic Absorbtion and ICP Spectrometry	Haziran 2003	Perkin Erkin Elmer Instruments, Istanbul
23.	GMP for Non-Injectabl Veterinary Medicinal Products AGR 8001	Eylül 2003	TAIEX - CEESA of EU Commission, VIRBAC Office, Nice, France
24.	GMP for Injectabl Veterinary Medicinal Products	Nisan 2001	TAIEX - CEESA of EU Commission, VIRBAC Office, Girona- Spain
25.	SNAS Seminar on Position and Functioning of the National Accreditation Authority and national Monitoring, Auditing and Inspection GLP Authority in Slovakia	22 Agustos 2006	SNAS Slovak national Accreditation Service, Bratislava, Slovakia
26.	Good Laboratory Practice for Inspectors	Eylül 2006	Türkiye-Slovakia Twinning Project RTA GLP
27.	Inspection and study audit of toksikology&ecotoxicology according to the GLP principles	13 Eylül 2006	Slovak Medical University, Bratislava- Slovakia
28.	Training Courses of GLP for Inspectors of GLP studies	16-18 Eylul 2006	VULM a.s Horna 36, Morda, Slovakia
29.	Ecotoxicology and Biodegradation according to the GLP principles	30 Eylül, 2006	Ecotoxicology Centrum Bratislava, Slovakia
30.	Practical training of the GLP in the Laboratory of Toxicology and Working Environment	19-20 Eylül, 2006	Slovnaft Vurup, a.s.
31.	Training testing according to the GLP Principles and EU Standard EN ISO/IEC 17025:2005	02 Kasım, 2006	State Veterinary and Food Institute Botanicka 15 , Bratislava
32.	GLP for Member of National Monitoring Authority	Subat 2007	Türkiye-Slovakia Twinning Project RTA-GLP, RSH Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara
33.	Doktora Tez Çalışmaları	 2007 Tez çalışması Devam ediyor.	İstanbul Un. Vet.Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji A.B.Dalı, Istanbul
34.			

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Doğal bitkisel ürünler,

Arıcılık,

Spor yapmak. Yüzme, futbol,

Gezi amaçlı seyahatleri, yeni yer ve toplulukları incelemek