

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**İSTANBUL'DA TÜKETİME SUNULAN KANATLI ET VE
YUMURTALARINDA LASALOSİT, SALİNOMİSİN
KALINTI DÜZEYLERİ İLE FARKLI ISI İŞLEMLERİNİN
KALINTI DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

NAMIK BİLİCİ

**DANIŞMAN
PROF.DR.SÜLEYMAN ŞENER**

**İ.Ü.VETERİNER FAKÜLTESİ FARMAKOLOJİ VE
TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

TEZ ONAYI

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

01/07/2008




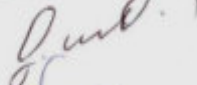

Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN

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
 Tez Sahibi : Namık BİLİCİ
 Tez Başlığı : İstanbul ilinde tüketime sunulan kanatlı et ve yumurtalarında Lasalosit, Salinomisin kalıntı düzeyleri ile farklı ısı işlemlerinin kalıntı düzeylerine etkisinin araştırılması
 Sınav Yeri : İ.Ü. Veteriner Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji Abd.
 Sınav Tarihi : 30 / 06 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Süleyman ŞENER (Danışman) 
2. Prof. Dr. Ahmet MENGİ 
3. Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER KELEŞ 
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 olmadığını beyan ederim.


Namık BİLCİ

İTHAF

Bilginin anlamının farkındalığını ömrü boyunca oluşturmaya çalışmış babam Abdullah BİLİCİ ve beni yetiştiren annem Cemile BİLİCİ'ye arz ve takdimimdir.

TEŞEKKÜR

Gerek lisans gerekse sonrasında engin bilgisi, bendeki emeği, katkısı ve rehberliği ile hocam Sayın Prof.Dr. Süleyman ŞENER'e, desteği, ilgileri ve yardımlarından dolayı Anabilim Dalı Başkanı ve çalıŐanlarına, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne, Kalıntı Laboratuvarı Őefi Sayın Uzm. Vet. Hekim H.Hüseyin ÜNAL'a, yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer dostum tabip sayın Dr. Sezai KURTARAN'a, bize imkân sağlayan CP yem fabrikasına, mevcut imkânlarını bize tahsis eden Tarpak Belediye Başkanı Sn. Hüseyin ÖTEYAKA'ya anlayıŐı için eŐime, değerli zamanlarından harcamama saygıyla sabreden oğullarım Rühata Bilal ve Bera Akif'e minnetle teŐekkürü ikrar ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İyonoforların tanımı ve özellikleri.....	4
2.2. Lasalosit ve salinomisin.....	5
2.3. lasalosit ve salinomisinin etkinlikleri.....	7
2.4. Lasalosit ve salinomisinin etkileşim ve toksisiteleri.....	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Numune.....	17
3.1.1. Kullanılan materyal, standart ve kimyasallar.....	19
3.1.1.1. Materyal.....	19
3.1.1.2. Kimyasallar.....	20
3.1.1.3. Karboksilik İyonoforlar İcin Cihaz koşulları.....	20
3.1.1.4. Standartlar.....	21
3.2. Numunenin hazırlanması.....	23
3.3. Ekstraksiyon.....	23
3.4. Geri kazanım.....	23
3.5. Analiz.....	24
3.6. Lc-MS koşulları.....	24
3.7. Materyal sağlanması, gruplandırma, yedirme ve ekstraksiyon.....	25
3.7.1. Yedirme, kesim ve ekstraksiyon.....	25
4. BULGULAR.....	27
4.1. Lasalosit ve salinomisinin analiz ve doğrulama parametreleri.....	30
4.2. Lasalosit ve salinomisin standart uygulamaları.....	31

4.3. Tespit çalışmaları.....	34
4.4. Antikoksidiyal ilaçlar için LS-MS tespit limiti çalışmaları.....	34
4.5. Linearite.....	39
4.5.1. Lasalosit linearitesi.....	39
4.5.2. Salinomisin linearitesi.....	41
4.5.3. Örnek numune kromatogramları.....	43
4.6. Lasalosit LC-MS analiz örnekleri.....	45
4.7. Salinomisin LC-MS analiz örnekleri.....	47
4.8. Lasalositin zamana ve ısı işlemlere bağlı doku yoğunluğu.....	49
4.9. Salinomisinin zamana ve ısı işlemlere bağlı doku yoğunluğu.....	51
4.10. Lasalosit spike edilen mix dokuların kızartma, haşlama ve dondurma sonrası kalıntı oranları.....	53
4.11. Salinomisin spike edilen mix dokuların kızartma, haşlama ve dondurma sonrası kalıntı oranları.....	55
5. TARTIŞMA	
KAYNAKLAR.....	64
HAM VERİLER.....	69
FORMLAR	72
ETİK KURUL KARARI	73
PATENT HAKKI İZİNİ	77
TELİF HAKKI İZİNİ.....	78
ÖZGEÇMİŞ	79

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.Lasalositin kimyasal yapısı ve özellikleri.....	5
Tablo 2.2.Salinomisinin kimyasal yapısı ve özellikleri	6
Tablo 3.1. Yumurta örneği alım tablosu	17
Tablo 3. 2. Piliç eti örneği alım tablosu.....	18
Tablo 3. 3. AB'de CRL referans laboratuvar bilgileri.....	19
Tablo 3.4. Antikoksidial İlaçlar İcin Uygulanan Cihaz Ayarları.....	20
Tablo 4.1. Lasalosit ve salinomisinin analiz ve doğrulama parametreleri.....	30
Tablo 4. 2. Lasalosit standart seri -1.....	31
Tablo 4. 3.Lasalosit standart seri -2.....	32
Tablo 4. 4. Lasalosit standart seri -3.....	32
Tablo 4. 5. Salinomisint standart seri -1.....	32
Tablo 4. 6. Salinomisint standart seri -2.....	33
Tablo 4. 7. Salinomisint standart seri -3.....	33
Tablo 4. 8. Lasalosit ve salinomisin enjeksiyon/alan tablosu.....	33
Tablo 4. 9. Lasalosit spike dokuda kızartma etkisi.....	53
Tablo 4. 10. Lasalosit spike dokuda haşlama etkisi.....	53
Tablo 4. 11. Lasalosit spike dokuda dondurma etkisi.....	54
Tablo 4. 12. Salinomisin spike dokuda kızartma etkisi.....	55
Tablo 4. 13. Salinomisin spike dokuda haşlama etkisi.....	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3. 1. Lasalosit kimyasal yapısı.....	21
Şekil 3.2. Lasalosit standartı sertifikası.....	21
Şekil 3.3. Salinomisin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 3.4. Salinomisin standartı sertifikası.....	22
Şekil 4.1. Piyasa araştırması negatif bulgu.....	28
Şekil 4.2. Piyasa araştırması negatif bulgu.....	28
Şekil 4.3. Piyasa araştırması negatif bulgu.....	28
Şekil 4.4. Lasalosit LC-MS/MS Spektrumu.....	30
Şekil 4.5. Salinomisin LC-MS/MS Spektrumu.....	31
Şekil 4. 6. 100ppb Standart Kromotogram (mix).....	34
Şekil 4. 7. 1ng/ml Standart Kromotogram (mix).....	34
Şekil 4. 8. 5ng/ml Standart Kromotogram (mix).....	35
Şekil 4. 9. 10 ng/ml Standart Kromotogram (mix).....	35
Şekil 4. 10. 25ng/ml Standart Kromotogram (mix).....	36
Şekil 4. 11. 50 ng/ml Standart Kromotogram (mix).....	36
Şekil 4. 12. 100ppb Standart Kromotogram (mix).....	37
Şekil 4. 13. Doku kromatogramı tespit limiti.....	37
Şekil 4. 14. Lasalosit ve salinomisin doku kromatogramı.....	37
Şekil 4. 15. Blank doku kromatogramları (Sırasıyla kontrol 1,2,3,5).....	38
Şekil 4. 16. Lasalosit linearitesi.....	39
Şekil 4. 17. Lasalosit spike doku kromatogramı.....	40
Şekil 4. 18. Salinomisin linearitesi.....	41
Şekil 4. 19. Salinomisin spike doku kromatogramı.....	42
Şekil 4. 20. Örnek numune mix. Kromatogramı.....	43
Şekil 4. 21. Lasalosit 1. kesim örneği.....	45
Şekil 4. 22. Lasalosit 3. kesim örneği.....	45
Şekil 4. 23. Lasalosit 5. kesim örneği.....	46
Şekil 4. 24. Lasalosit 7. kesim örneği.....	46
Şekil 4. 25. Salinomisin 1. kesim örneği.....	47
Şekil 4. 26. Salinomisin 3. kesim örneği.....	47

Şekil 4. 27. Salinomisın 5. kesim örneği.....	48
Şekil 4. 28. Salinomisın 7. kesim örneği.....	48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AB:	Avrupa Birliği
ADİ:	Acceptable Daily İntake
ALARA:	As Low As Reasonably Achivable
ANADA:	Abbreviated New Drug Application
ALT:	Alanine Aminotransferase
AP:	Alkaline Phosphatase
AST:	Aspartat amino transferaz
ATP:	Adenozin trifosfat
C:	Control Group
C.A.:	Canlı Ağırlık
CCα:	Decision limit
CCβ:	Detection capability
CPK:	Kreatin fosfokinaz
CRL:	Community Reference Laboratories
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
L:	Lasalosit
LC-MS:	Liquid Chromatography- Mass Spectrometry
LC-MSMS:	Liquid Chromatography- Mass Spectrometry-Mass Spectrometry
LDH:	Laktat dehidrojenaz

LLE:	Liquid-Liquid Extraction
LOD:	Definition of limit of detection
LOQ:	Limit of quantification
MCH:	Mean Cell Hemoglobin
MCHC:	Mean Cell Hemoglobin Concentration
MRL:	Maximum Residue Level
NRL:	National Reference Laboratories
OİE:	Office Internationale des Epizooties
Otorite:	Mevzuatı Düzenleyen Resmi Kuruluş
PEC:	Predicted Environmental Concentration
PNEC:	Predicted No Effect Concentration
PLT:	Platelet Count
PVKAE:	Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
S:	Salinomisin
TKİB:	Tarım ve Köyişleri Bakanlığı
V.b.	Ve benzeri
V.d.	Ve diğerleri
VMD.	Veterinary Medicines Directorate
VPC:	Veterinary Products Committee

ÖZET

Bilici N.(2008). İstanbul'da tüketime sunulan kanatlı et ve yumurtalarında Lasalosit, Salinomisin kalıntı düzeyleri ile farklı ısı işlemlerinin kalıntı düzeylerine etkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Koksidiyozis protozoonlardan özellikle *Eimerialar* tarafından meydana getirilen intestinal harabiyet ve emilim problemleri ile direkt negatif ekonomik etkinliklerinden dolayı maddi olarak son derece önemlidir. Koksidiyozisi önlemek amacıyla birçok ilaç kullanılmaya başlanmış halen de bu alanda arayışlar sürmektedir. Günümüzde kullanılan bir çok aktifin yanısıra karboksilik iyonoforlardan da monensin, salinomisin, narasin, lasalosit, maduramisin, semduramisin kullanılmakta, farklı kombinasyon ve dozajlamalarla arayışlar halen devam etmektedir. Bu çalışmada ilk olarak İstanbul'da tüketime arz edilen tavuk eti ve yumurtalardan aldığımız 150'şer ad. örnek lasalosit ve salinomisin yönünden tarandı. Daha sonra optimal yedirme koşullarında lasalosit ve salinomisin ile beslenen broylerlerden alınan örneklerde lasalosit ve salinomisin düzeylerine bakıldı. Belirtilen koşullarda Yapılan yedirme denemeleri sonrasında 1. 3. ve 5. ve 7. günlerde alınan dokularda yapılan analizlerden sonra 1. 3.ve 5. günlerde tespit edilen kalıntılı dokulardan 1. ve 3. gün dokuları kızartma, haşlama, +4°C'de bekletme ve dondurma işlemlerine tabi tutuldu. Sonuç olarak lasalosit ve salinomisin kalıntılarının ısı işlemlerden etkilendikleri tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Lasalosit, Salinomisin, İyonofor antikoksidiyal ilaç, Kalıntı düzeyi, Isı işlemi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1224

ABSTRACT

Bilici N. (2008). İstanbul University, Institute of Health Science, Pharmacology and Toxicology Department. Doctorate Thesis. İstanbul.

Research of Lasalocid and Salinomycin residues which are member of Ionophore anticoccidial drugs and effects of different heat factor on the residue levels in poultry tissues and products.

Coccidiosis, which is primarily caused by *Eimeria* sp., is an important disease because of its economic impact since it causes destruction of intestinal tissue and malabsorption. Although numerous drugs have been used against coccidiosis, researches on more effective new anticoccidial drugs are ongoing. In addition, different combinations and dosing regimens of currently used active substances including carboxylic ionophores such as monensin, salinomycin, narasin, lasalocid and maduramycin are still studied. In this study, 150 chicken meat and 150 egg samples chosen from those to be consumed in İstanbul were analyzed for lasalocid and salinomycin residues. Besides, the samples taken from broilers fed with diet containing lasalocid and salinomycin in optimum feeding conditions were tested for the same substances. The test results of these samples, which were taken on 1st, 3rd, 5th and 7th days after the exposure, showed that the residues were present in 1st, 3rd and 5th-day samples. Out of these samples, 1st and 3rd-day samples were exposed to frying, boiling, incubation in +4°C and freezing processes. The results indicate that lasalocid and salinomycin residues are sensitive to heat treatment.

Key words: Lasalocid, Salinomycin, Ionophor anticoccidial drug, residue level, heat factor

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 1224

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi ile yemden yararlanmanın artırılması ve/veya gelişmenin hızlandırılması için ilaç ve/veya biyolojik ajanların kullanımı günümüzde vazgeçilemez bir uygulama haline almıştır. Özellikle son asırda öne çıkan koruyucu amaçla ilaç kullanımı bir aktifin belli sürelerle verilen terapötik veya subterapötik dozlarının birçok hastalık etkenine karşı koruma sağladığı bilinmekte ve bu olgu yemden yararlanma ve besi performansı üzerine de doğrudan etkili olmaktadır. Bu olumlu metaflaktik yönlerinin yanısıra besin olarak kullanılacak hayvanlarda arınma süreleri, bıraktıkları rezidü miktarları ile bu rezidünün sofraya taşınması durumunda periyodik günlük alınabilecek en yüksek limitleri tüm dünyada ve ülkemizde önemle üzerinde durulan başlıca konulardan biri haline gelmiştir **(12,16,34,58,)**. Yem kaynaklı zararlılar içinde yemle verilen ilaçların payı kanatlılarda %10 ve bu oranın %80'i antibiyotik ve diğer anti-bakteriyel ajanlardan kaynaklanmaktadır **(17,28)**.

Karboksilik iyonoforlar kanatlılarda öncelikli olmak üzere birçok hayvan türünde koksidiyoz etkenlerine, kriptosporidiyoza, gram(+) bakterilere karşı koruyucu amaçla su ve daha ziyade yemlerine katılarak kullanılırlar. Eti yenilebilir evcil hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi ile yemden yararlanmanın artırılması veya gelişmenin hızlandırılması için antibiyotik kullanımı geçmişte olduğu gibi günümüzde de vazgeçilemez bir uygulama olarak devam etmektedir. Endüstriyel tip yetiştirmelerde ilaçların yem ya da içme suyu içerisinde kullanılması şeklinde uygulanan kollektif sağaltım yöntemi sürü sağaltımına olanak sağlaması, uygulama kolaylığı, zaman kazandırması, stres oluşturmaması, kontamine sularla bulaşabilen enfeksiyöz hastalık olasılığını azaltması ve suda az çözünen ya da çözünmeyen ilaçların kullanımını yemle sağlaması gibi önemli avantajlara sahiptir **(5,21,33,62)**.

Subterapötik dozlarda belli sürelerle yemlere katılarak kanatlılara yedirilmek suretiyle koksidi etkenlerinin vereceği zarardan onları koruyarak ekonomik kayıpların azalmasına, yemden yararlanmanın artmasına ve besi performansına olan pozitif etkilerinin yanı sıra iyonoforlar kalıntı yönünden de son derece önemlidirler **(6,38,41)**. Uygulama kolaylığı, etkinliği, maliyeti ve koruyucuğu açısından koksidiyoza karşı kullanılan ilaçların %80'ini iyonoforlar oluşturmaktadır **(29)**.

Koksidiyoziste etkilenen bölgenin bağırsaklar olması, kanlı ishale ve ölümlere kadar varan ciddi ekonomik kayıplara neden olmaları, mortalitenin yüksek olması ve seyrinin diaagnoz süresine bağlı oluşu nedeniyle koruyucu amaçla ilaç kullanımı tedaviye tercih edilir **(31)**.

Bunun yanısıra insan gıdası ve özellikle temel protein kaynağı olan eti yenilebilir 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 haline almıştır.

Endüstriyel tip yetiştirmelerde antibiyotikler verim artırıcı ve çoğu zaman da hastalıklara karşı koruyucu olarak çoğunlukla yeme karıştırılarak bazen de içme suyu içinde kullanılırlar. Bu uygulama ile

et üretimine yönelik işletmelerde aynı kesim ağırlığı için yemden % 3–12 oranında tasarruf sağlanabilir (33,59). Başka bir deyişle aynı ölçek yemden belirtilen oranda daha fazla verim sağlanır. Bu durum yem/et dönüşüm parametresinin pozitif yarar/kar sağlaması demektir. 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.

Gerçekte hayvan yemlerinin sağlığa zararlı yapıları barındırmalarının gıdaya yansıma şekilleriyle ilgili fazla literatür olmadığı, yem katkılarıyla diğer konulardaki literatüre kıyaslandığında oldukça az olduğu bilinmektedir.

Toplumsal olarak kanatlı eti tüketiminin yoğun ve yemlerde antikoksidiyal olarak karboksilik iyonoforların kullanılagelmesi nedeniyle kullanım şekli, dozu ve bekleme süresine uyulup uyulmadığı hususu kalıntı miktarı ile doğrudan ilintili olup bu da Veteriner Halk Sağlığı açısından son derece önemlidir. Dolayısıyla İstanbul gibi nüfus kesafeti fazla olan bir metropolde yasal arınma süresine uyulup uyulmadığı ve uyulmayanlarda toplumsal tüketim alışkanlıklarımızla aynı koşullarda yapılan ısıtma işlemlerinde kalıntı düzeyinin ne şekilde etkilendiği araştırılmaya değerdir.

Gıda maddesi olarak tüketime sunulan ve sürekli tüketim zorunluluğu bulunan kanatlı eti kanatlı hayvanların yaşam sikluslarında yapılmış ıslahlar sonucu kısa oluşu nedeniyle yasal ve zorunlu arınması gereken kimyasallardan arınma süresi oldukça kısa olup yetiştiricilerce bu süre göz ardı edilebilir düzeyde açıktır. 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 (3,4,8,9,12). Uygulamada, yem değişikliğinin getireceği alimenter değişimin besideki performans ve olası diğer yem değişikliği sonuçlarından etkilenmemek için bu değişim tercih edilmeyerek aynı yemle beslenme daha yarar sağlayıcı olarak görülür. İşte tüketicinin bilmesinin mümkün olmadığı ancak sağlığı açısından son derece risk taşıyan tüketimin yoğun, fiyatın makul, besin değerinin yüksek oluşu nedeniyle bu husus "Veteriner Halk Sağlığı" açısından son derece önemli bir sorun olarak durmaktadır. Konuya ilişkin şu ana kadar bilimsel bir yaklaşım literatürde mevcut olmayıp AB uyum sürecinde ülkemizin de ortak normlara uyumu konusunda kendi alanında bir ilk olma özelliğindedir.

Kanatlı yetiştiriciliğinde kullanımı sınırlandırılmayacak salinomisin ve lasalositin kullanım sonrası kalıntı problemi, varsa düzeyi, kalıntılı ürünün gerçekte toplumsal yemek kültürü şeklinde işlendiğinde kaybının olup olmadığı ve olası etkilenmede gerçekte düzeyin ne olacağı hususu bu çalışmayla ortaya konmak amaçlanmaktadır.

Bunu; toplumsal sağlık ve geleceğin sağlıklı sürdürülebilmesine olanak tanınması açısından değerlerin ifadesi olarak anlamlandırmak gereklidir.

Yemlere belirli oranlarda aktifler katılarak belli metabolik yararlar hatta özel hedefler amaçlamak bugün teknolojisi için mümkün ve son derece kolaydır. Sadece iyonofor antikoksidiyallerden lasalosit ve salinomisin için değil bütün antibakteri ajanlar için otoriteler yapılan bu ve benzeri çalışmalar ışığında kullanılabilme şekli ve düzeylerine ilişkin kararları oturturlar. İyonofor antikoksidiyaller özellikle broyler yetiştiriciliği başta olmak üzere etleri tüketilen birçok hayvan türünde kullanılan, daha az risk taşıyan, kalıntı problemi çok daha kısa süreli olan buna karşın tüketilebilirliği son derece fazla olan aktifler olmalarından ötürü iyi doze edildiklerinde çok daha güvenle kullanılabilir maddelerdir. Bundan dolayıdırki otoritelerce geçmişte antibakteriyel olarak kullanılan bir kısım aktifleri yapılan çalışmalar ışığında ya sınırlandırmış, ya kullanım sonrasına süre tahdidi konmuş, ya da yasaklanmıştır.

İyonofor antikoksidiyallerden lasalosit için EMEA uzun yıllar yapılmış çalışmalara dayanarak 2004 yılında MRL açıklamış ve bunu 2007’de değişimsiz revize etmiştir **(5,9)**. Salinomisin için çalışmaların şimdilik devam ettiği her hangi bir açıklamaya gidilmediği görülmüştür **(6)**.

Lasalosit ve salinomisinin fonksiyonları güvenlik indekslerinin darlığından çok daha önemli olup uzun süreler bu özgün alanda kullanılacağı, bu kullanımın tüketim şekillerine göre işlendiğinde son tüketicinin alacağı miktarın önemli olduğu düşünülmektedir. İşlenme şekillerine göre rezidüel değişimin önemi henüz yeni bir anlaşılma olup yapılan literatür taramasında buna ilişkin olarak verilerin son derece sınırlı olduğu, lasalosit ve salinomisin üzerine ısıl işlemlerin rezidüel yoğunluğa etkisinin ise hiç bakılmadığı izlenmiştir. Öncelikle kentsel alanlar başta olmak üzere protein kaynağı olarak yüksek tüketime sahip broyler etinde yapılan ısıl işlemlerin bu alanda yetiştiricilikte kullanılan iyonoforlar da dâhil birçok maddenin gerçekte tüketiciye ulaşma riski vardır. Ancak bunun salt düzeyi ve işlemlerden geçiş sonrası sağlık açıdan kabul edilebilir tüketim düzeyinde olup olmadığı daha önemlidir. Son yıllarda tüketim merkezli çalışmaların otoritelerce yasal normlarla da desteklendiği bir gerçektir. Uluslar arası ticarete de bu konu son derece üzerinde durulan bir husustur.

2. GENEL BİLGİLER

Lasalosit ve salinomisin mikroorganizmalardan elde edilip, koksidiyozise karşı öncelikle kanatlılar özelde entansif kanatlı yetiştiriciliği başta olmak üzere temelde broiler üretiminde ruminantlarda, tavşan ve bildırcın üretimi ile egzotik yetiştirmede kullanılan iyonofor antikoksidiyal ajanlardır. Antikoksidiyal etkisinden faydalanmanın yanısıra özellikle et üretimi yapan ruminant çiftliklerinde de yemden yararlanmanın artırılması amacıyla sıkça başvurulmuş antibakteriyel etkinliği de olan maddelerdir. Tek başına yada bir antibakteriyel veya vitaminlerle kombine edilerek yem ve sulara karıştırılmak suretiyle kullanılırlar.

İyonofor antikoksidiyaller temel özellikleri, yapıları, etkinlik alanları, toksisite ve etkileşimleri ile çevresel etki yönünden aşağıdaki gibi sınıflandırılarak açıklanması mümkündür.

2.1. İyonoforların Tanımı Ve Özellikleri:

İyonoforlar mikroorganizmalardan (streptomyces) elde edilen, biyolojik membranlarda iyonlara karşı geçirgenliği değiştirebilen ve stratejik dağılımlı oksijen atomları içeren organik moleküllerdir (58).

İyon taşıma özelliklerine göre üç gruba ayrılırlar:

Nötr iyonoforlar; elektrogenik 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 stasyonere kanallar oluştururlar (gramisidinler, alamektin, nistatin, amfoterisin B). Bu kanallar iyonlara karşı seçici değildir (58).

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 divalen iyonlarla kombine olurlar. Özellikle Na^+ ile biyolojik membranları geçme özelliği kazanırlar (58).

İonophore= ion bearer, iyon taşıyıcı, sürükleyici, hamili anlamındadır. Optimal şartlarda intrasellüler Na^+ konsantrasyonu düşük K^+ konsantrasyonu ise yüksek olup bu durum hücre dışında tersine ve Ca^{++} konsantrasyonu ise membran iki yüzünde denge halindedir. İyonoforlara maruz kalan hücrede bu denge çok kısa bir sürede alt üst olur. İnasellüler Na^+ konsantrasyonu artarken K^+ konsantrasyonu düşer ki burada değişim Na^+/Ca^{++} konsantrasyonu dengesinin bozularak Ca^{++} unda intrasellüler ortamda serbest konsantrasyonda dramatik bir hızda artışı intrasellüler faaliyet dizgesini bozar (5,9,31). Bu iyon transport mekanizması koksidi etkenlerinin kendilerine karşı bir direnç oluşturmasını önlerler ki bu bile tek başına karboksilik iyonoforların gelecekte de kullanım alanı olarak alternatifsiz kullanılabileceklerini gösterir (31).

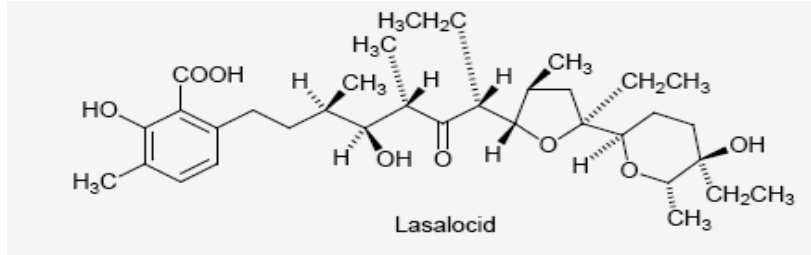
2.2. Lasalosit ve Salinomisin:

Lasalosit kirli beyaz renkte, suda çözünmeyen bir tozdur; *Streptomyces lasaliensis* kültürlerinden ve sentez yoluyla elde edilir (13,57). Monoasit bakteri fermentasyonunun ilk ürünü olup asidifikasyonla ekstraksiyonu sonunda lasalosit sodyum A olarak elde edilir. Homologu olan B, C, D ve E ise bir etil grubun metil grup ile farklı pozisyonlarda yer almasıyla oluşurlar ki bunlar en fazla ana molekülün %10'u kadardır. İUPAC CAS numarası Lasalosit monosodyum tuzu için X-537A olup molekül ağırlığı 590,8 ve moleküler formülü $C_{34}H_{53}O_8$ şeklindedir. Normal koşullarda, PH 5,5–7,0 arasında istikrarlı olmasına karşın pH 10,0'da ve yüksek ısıda stabilitesi bozulur. Koksidiyostat etkinliği salinomisinle aynı olmak üzere hedef koksidi etkenlerinde sırasıyla sporozoit, trofozoit, merozoit, şizont, makro ve mikrogametositler olmak üzere hemen bütün yaşam evrelerinde liposolübl ve dinamik fakat dönüşümlü olarak katyonlarla yaptıkları kompleksten kaynaklanır (8,13,57).

İsim

Lasalocid A sodium salt

Açık Formül



Kapalı Formül

$C_{34}H_{53}NaO_8$

Molekül Ağırlığı

612.77 g/mol

Erime Noktası

180 °C (dec.) (lit.)

Saklama Koşulları

Standart madde – 20 °C de saklanabilir.

Stabilite

Stok çözeltiler metanolde hazırlanır ve – 20 °C de muhafaza edilir. Çalışma çözeltileri 4 °C de 1 hafta stabil olarak saklanabilir.

Çözünürlük

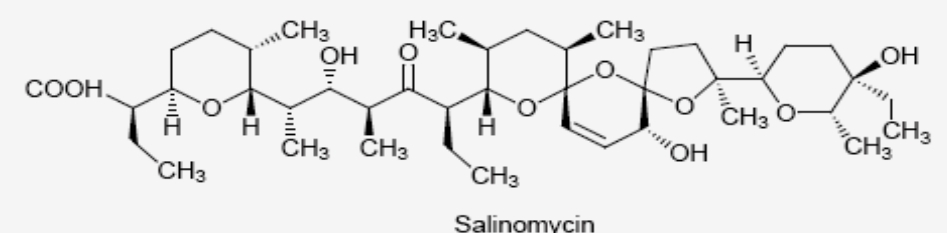
Metanol de çözünür. Seyreltmeler metanol ile yapılabilir.

Lasalosid	
Kullanılan Balonjoje	207-2
Tartım Miktarı	3.6mg
Çözücü	Metanol
Stok Derişimi	3.6mg/10ml
Ara stok (1µg/ml) çözelti için gerekli miktar	28µl

Tablo 2.1.Lasalositin kimyasal yapısı ve özellikleri

Lasalosit ve salinomisinin özelliklerinden ve halk sağlığında direk kullanılmıyor olmasından ötürü WHO eksperlerince kritik önemde değerlendirilmemiş dolayısıyla OİE tarafından Veteriner Hekimlik açısından koksidiyozun kontrolünde çok önemli bir antibiyotik olarak listelenmiştir (5,33).

Salinomisin ise *Streptomyces albus* kültürlerinden elde edilir. Kimyasal formülü $C_{42}H_{69}O_{11}Na$ olup molekül ağırlığı 772,99'dur. Tipik bir iyonofor özelliği olan monovalan alkali katyonlarla liposolubl reversibl dinamik kompleksler yapma özelliğindedir. Çevre koşullarına optimal şartlarda dayanıklıdır (10,34,57).

İsim	Salinomycin SV Sodium salt Penta hemihydrate
Açık Formülü	 <p style="text-align: center;">Salinomycin</p>
Kapalı Formül	$C_{42}H_{69}NaO_{11} \cdot 2.5H_2O$
Molekül Ağırlığı	818.02
Saklama Koşulları	4°C
Stabilite	Nötral ve alkali ortamlarda stabil, asidik ortamlarda stabil değildir. 50°C sıcaklıkta uzun süre dayanıklıdır.
Çözünürlük	Metanol, aseton, etil asetat, kloroform, benzen ve etil eterde kolaylıkla çözünür; suda yaklaşık 3.4mg/ml çözünür.

Salinomisin	
Molekül Formülü	$C_{42}H_{69}NaO_{11} \cdot 2.5H_2O$
M_A	813.03g/mol
Kullanılan Balonjoje	207-1
Tartım Miktarı	3.4mg
Çözücü	Metanol
Stok Derişimi	$(813.03 - 45) \times 3.4 / 813.03 = 3.212 \text{mg}/10 \text{ml}$
Ara stok (1µg/ml) çözelti için gerekli miktar	31µl

Tablo 2.2.Salinomisinin kimyasal yapısı ve özellikleri

2.3.Lasalosit ve Salinomisinin Etkinlikleri:

Karboksilik iyonoforlar iyonların girişini kolaylaştırarak koksidiyoz etmenlerinde aşırı iyon yüklenmesi sonucu koksidiyostat ve koksidiyosit etki oluştururlar. Bu grup bileşikler özellikle gram (+) ve bazı gram (-) jermler üzerinde antibakteriyel etkinliğe de sahiptir. Ne var ki, antibakteriyel ajan olarak terapötik indeksleri oldukça dardır (58). Etki şekli olarak tek değerli iyonları bağlama özelliğindeki salinomisinin ve hem tek hem de çift değerli iyonları bağlama özelliğine (zwitteryon) sahip lasalositin hücre zarı permeabilitesini iyonlara karşı pozitif yönlü değiştirmesinden dolayı intrasellüler iyon konsantrasyonunun bozulmasıyla beraber ATP üretimi, mitokondrial faaliyetler de dâhil olmak üzere bir çok metabolik fonksiyon engellenir (1,9,33,54).

Lasalosit ve salinomisin kullanım alanları; kuralları/şartları ülkemizin de model aldığı AB direktifleriyle oluşturulmaktadır. Yem katkısı olarak EC:70/524'te broilerlerde, 16 haftalığa kadar yumurtacı tavuklarda ve 12 haftalığa kadar hindilerde yemde bulunmasına izin verilen en yüksek miktarları eşit olup lasalosit 125 mg/kg salinomisin için 90 mg/kg'dır. Ancak yem katkılarına karşı toleransı düzenleyen EC:2002/32 kararda ise (ALARA=As Low As Reasonably Achivable) başarılabilir makul en düşük seviye esası salık verilmektedir. Bu da 40,65 milyon ton olan yumurta tavuğu, broiler, hindi ve tavşan yemi total üretiminin koksidiyostat katılarak üretilen miktarının 18,33milyon ton ile çok önemli bir paya sahip olmasından kaynaklanır (5,10).

Lasalosit ve salinomisin broiler yetiştirmelerinde zootekni, koruyucu ve sağaltıcı olarak sırasıyla 75 -125 ve 50-90 ppm konsantrasyonlarda yeme katılarak kesimden 5 gün öncesine kadar verililebilirler. (45) Karboksilik iyonoforlar kanatlılarda öncelikli olmak üzere koksidiyoz etkenlerine, gram (+) bakterilere karşı koruyucu amaçla su ve daha ziyade yemlerine katılarak kullanılmalrı; lasalosit 75-125mg/kg, salinomisin 50 -70 mg/kg dozla yasal olarak da 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 olarak kabul edilmiş ve en son 2007 yılında yumurtda için de 150 µg/kg olarak deklere edilmiştir (1,9,11,12).

Koksidi etkenlerinden *E.tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E.brunetti*, *E.mitis*, *E.necatrix*'in oral inokulasyonu ile broilerlerde yapılan bir çalışmada salinomisinden 66 ppm ve lasalositten 100 ppm ile sağıtılanlarda antikoksidiyal aktivitenin uygulama kesildikten sonraki birkaç gün devam ettiği, bunun da rezidüel olarak aktivitenin sürdüğünü kanıtladığı bildirilmiştir (23).

Ondokuz günlük broylerlere 1ppm diklazuril verildikten sonra 100 ppm lasalosit, 66 ppm salinomisinli yemler ayrı ayrı verilerek yapılan çalışmada inokulumdan 24 saat önce ilaçlı yem verilmesi kesilerek normal rasyona dönülmüş rezidünün intestinal lezyon azalmasına ve ağırlık kazancına pozitif etkisi görülmüştür (11,28,44)

Zootekni ve sağaltım amaçlarıyla yemlere katılarak yapılan çalışmalarda koksidiyozis enfeksiyonunun enfeksiyon geçirmeyenler ile kıyaslandığında canlı ağırlık kazancı, yem alımı ve yem dönüşümü parametrelerinin hemen, hemen eşit olduğu salinomisin yem ve su tüketimini de arttırdığı görülmüştür. Bu; lasalosit ve salinomisin koksidiyoz tedavi ve korunmasında vazgeçilemez olduğunun en bariz örneğidir **(10)**.

Salinomisin için henüz MRL tesbit edilmemiş olup kullanımı etlik piliçler için yeme 50-70 mg/kg, hindiler için 90-125 mg/kg, domuzlar için ise 4. aya kadar 30–60, 6.aya kadar 15-30 mg/kg değerlerle yasal olarak sınırlandırılmıştır **(1,9,15,58,60)**. Ülkemizde lasalositin kabul edilebilir düzeyi sığır için et, karaciğer ve böbrekte sırasıyla 1,2, 4,8, 3,6 ppm, ve broilerlerde et, karaciğer ve deride sırasıyla 1,2, 7,2, 2,4 ppm, kesim öncesi bekleme süresinin 5 gün olması gerektiği bildirilmiş ancak bu veriler daha sonra yasal limitleri aynı olmak üzere revize edilmiştir **(4,7,16)**.

İyonoforlar genel itibarıyla hızlı ve parazitin bütün evrelerine etkin olmalarının yanı sıra özellikle salinomisin 20 dakika gibi kısa bir sürede ekstrasellüler merozoitleri tümüyle yıkımladığı bilinmektedir. İşte iyonofor antikoksidiyallerin parazitin bu invazyon safhasını etkilemeleri ile parazitlerin çok az bir kısmı olsun gelişimlerini tamamlayabildiği, bu durumun koksidiyoza karşı gelişen immunitenin uyarılması şeklinde açıklanabileceği de bildirilmiştir **(39,63)**.

İyonoforlar ruminantlarda yemden yararlanmanın artırılması başta olmak üzere yem verimliliğinin sağlanması, günlük ağırlık kazancı artışı, rumende propiyonik asit artışına paralel asetik asit oluşumunun azaltılması, düşük proteinli rasyonlarda protein tutumluluğu, metan gazı oluşumunun azaltılması, ruminal işlemler arası geçişin hızlandırılması, ruminal protein degradasyonunun bir ölçüde önlenmesi ile daha da önemlisi 30 gr/ton oranında yeme katılarak koksidiyozisin kontrolü veya frekansının düşürülmesi amacıyla kullanılırlar **(10,17,20)**.

Salinomisin 60 ppm düzeyinde domuz rasyonlarında kullanılan ilk verim artırıcı olduğu, 50ppm ile başlanarak 25ppm ile besinin sonlandırıldığı ancak tiamulinle beraber yeme 80ppm katıldığında kalp myotoksisitesine bağlı ölümler yaşandığını bunun da salinomisin iyonik geçirgenliği K⁺'dan yana bozduğu şeklinde yorumlanmıştır **(10,45)**. Artan iyonik konsantrasyonun dengelenmesi için çekilen su miktarıyla bozulan ozmotik basınç balansının bakteriyi öldürdüğü belirtilmiştir **(17,28)**.

2.4.Lasalosit ve Salinomisin Etkileşim ve Toksikiteleleri:

Endojen kateşolamin liberasyonuna ilişkin iyonoforların intrasellüler Ca⁺⁺ konsantrasyonunu ve koroner debiyi arttırmaları, kalpteki kan basıncında da artışa neden olur ki bu myokard kontraktilitesini değiştirir. Bu etki sonrası selektif koroner vazodilatatör aksiyona neden olurlar ki bu sadece iyon konsantrasyonu değişimiyle değil endojen kateşolamin serbestlemesiyle de ilgilidir **(17,32,54)**. Kalpte koroner debi artışına dolayısıyla dilatasyonuna önder oldukları deneysel olarak bildirilmişse de koroner

arteriyel problemi olanlarda büyük risk taşımalarına karşın dozaj, rezidü, birikim ve yıkımlanma seriliği olarak karboksilik iyonoforların gerçekte buna neden olmaları oldukça zordur **(20,31)**.

Yüksek dozlarda lasalositin çift değerli iyon metabolizmasına olan değiştirici etkisiyle hayvanlarda dışkı yumuşaması ve ishale önder olması lasalositin kullanımında daha dikkatli olma gereği doğurur **(35,60,61)**.

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 patesiler dikkati çeker **(8,35)**.

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 CPK ve AST değerleri değişir ki buna bağlı kalpte kas doku vakoulizasyonu da yüksek dozlarda meydana gelebilir **(5,17)**. Biyokimyasal olarak serum protein, üre ve bilirubin miktarı ile PLT, MCHC, MCH'da yükselme vardır. Buna karşın LDH ve ALT düzeyinde düşüş mevcuttur. Orta ve yüksek dozlarda sekal genişleme tipik olup parotidin asinar hücrelerinde hipertrofi belirgindir. CPK sitozolik bir enzim olup tüm zehirlenmelerde enzimatik bozulmaların ilk göstergesi gibidir. Daha ileri durumlarda 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. Lasalosit toksikasyonunda ise farklı olarak nekropside treha ve bronşlarda konjesyon, ödematöz bir akciğer ve dilate bir kalple karşılaşılır **(5,17,49)**.

Lipit 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 **(9,50)**. Eksperimental bir çalışmada 1mikrogram/kg dozda İV verilen lasalositin kalp üzerine (+) inotropik etkili olduğu, koroner ve renal arteriyel basıncı arttırdığı saptanmıştır. At, ördek, keçi ve köpek için hem salinomisin hemde lasalositin tehlikeli olduğu bilinmektedir **(30,34,54)**.

İyonoforlar genel olarak bazı antibiyotiklerin; oleandomisin, sulfakinoksalin, sulfamezatin, sulfadimetoksin, kloramfenikol ile aynı sağaltım küründe 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 **(37)**. Kloramfenikol lasalosit metabolizmasını azaltması ve bunun da P450'nin inhibisyonundan dolayı broylerlerde nörotoksisiteye neden olduğu söylenmiştir. Tek kullanım 10-25 mg/kg dozda klinik semptom 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 şekillendirdiği görülmüştür **(11,23,48)**.

Kalsiyum kanal blokerleri (verapamil, diltizem) kalmadulin antagonistleri (klorpromazin) adrenerjik reseptör blokerleri (yohimbin, tolazolin, propranolol) kalp glikozitleri (digoksin) bunların tamamı farelerde iyonofor zehirlenmelerinde (monensin, salinomisin) LD₅₀ dozunu dolayısıyla toksisiteyi önemli ölçüde (P<0,05) azaltırlar **(17,31)**. Şu ana kadar ulaşılabilen veriler lasalosit toksisitesinin kalp üzerinde, salinomisin toksisitesinin de daha ziyade fare ve ratta nörotoksisiteye at, domuz ve boğalarda ise karaciğer ve miyokarda ilişkin hasarlarla karakterize olduğu yönündedir **(9,11,32)**.

Yapılan çalışmalarda salinomisinin enrofloksasin, klortetrasiklin hidroklorür, sülfadimidin sodyum, kolistin ve eritromisin ile geçimsizliği görülmemiştir **(10)**.

İyonoforlardan monensin, salinomisin, lasalosit, narasin ve laidlomisin propionatın atlar için son derece toksik olduğu letal dozda evcil kedilerde miyelin dejenerasyonuna sebep olduğu bilinmekte fakat sığırlarda iyimser akciğer amfizemi ve laktik asidoz ile ketozisin oluşmaması için kullanılabilirdiği belirtilmektedir **(50)**. İyonoforların absorpsiyonları gastrointestinal yollarda seri olduğu, emildiği karaciğerde P₄₅₀ tarafından hızla metabolize edildiği ilk geçiş etkisiyle hızla safra yoluyla bağırsaklara aktarıldığı, P₄₅₀'nin örneğin makrolidlerce inhibe edilmesi durumunda hepatic detoksifikasyonun azaldığı ve zehirlenme belirtilerinin şiddetlendiği bu durumda bile kalp ve iskelet kaslarında birikme yapmadığı bildirilmiştir **(11,50)**

Lasalositin akut LD50'si tavuk, fare, ergin rat, tavşan ve atta sırasıyla 71,5, 146,0, 122,0, 40,0 ve 21.5 mg/kg olup türlere göre bilinen bir defada ağız yoluyla toksik dozu sığırdada 100-125 mg/kg, koyunda 12 mg/kg ya da 8mg/kg dozda 6 günlük periyotta, domuzda 58 mg/kg dozda bir günde, eşekte 57.5 mg/kg dozda bir günde ve köpekte 20-30 mg/kg dozda ve türler arasında da farklılıklar mevcuttur **(50)**.

Lasalosit transportta monovalan katyonları tercih etmekle beraber kalsiyuma magnezyumdan ve potasyuma sodyumdan daha fazla iyonik özgün transport sağlamanın yanı sıra kateşolaminlerin de liberasyonuna önder olur ki kalple ilgili hasarlar ile diğer iyonoforlardan daha az kullanılma sebebi de bu sorundur denilmektedir **(11,56)**

Atlarda 18 mg/kg dozda hareket kısıtlamasına, kısmi veya tamamen iştahsızlığa, ataksi ve felçlere neden olduğu ölümün 2-8 gün içinde şekillendiği, domuzda 35 mg/kg'ın üzerinde aşırı uyarılma ve kas seğirmesine, köpekte respiratuvar paralizle biten tablo öncesi kısmi felçten ötürü kuyruk hareket ettirememesi ve gözlerdeki hareket artışı dikkati çektiği bildirilmiştir **(11,48)**.

Klinik patoloji olarak sığırdada kan CPK, LDH değerlerinin yükselmesi, atta glukoz, fosfat ve total bilirubinde yükselme dışında anormallik yok gibidir. Lezyon olarak; atta epikardiumda patesiyal hemoraji, böbreklerde hiperemi ve akciğerlerde konjesyon, sığırdada miyokard da dâhil tüm kaslarda vakuolizasyon dikkat çekici olup nekrozlar koyunda çok daha belirgin ve ön plandadır **(20,50)**

Hem kendileri hem de kalıntıları gastrointestinal sistemde aktif olan salinomisin ve daha yüksek düzeyde olmak üzere lasalosit; lezyonların artışının azaltılması, rejenerasyona imkân tanınması yönünde altı güne kadar etkindirler denilmiştir (44). Salinomisinin sekal koksidiyozu aflatoksin B1'varlığına rağmen önemli ölçüde azalttığı da bilinmektedir (38). Lasalositin %15, %20, %33.1 oranlarında lasalosit sodyum içeren ticari yem katkılarının yine ticari olarak 500mg melengestrol asetat/Pound (1Pound≈453,6 g) içeren yem katkılarıyla ağırlık kazancı eldesi, yemden yararlanmanın artırılması ve östrüs baskılaması amacıyla besi sığırlarında kullanımı kabul edilmiş ve buna bekleme süresi gerekmediği bildirilmiştir (23)

Lasalosit ve Salinomisin'in de içinde bulunduğu iyonoforların kullanımını Avrupa birliği yasal kullanım kriteri olarak 1831/2003/EC, 96/23/EC ve 96/22/EC sayılı Konsey Direktifleri ile 98/179/EC sayılı Konsey Kararı düzenlemeleri ile sınırları belirlemiş, ülkemizde de buna paralel yasal düzenlemeler ulusal kalıntı kontrol planları yapılmış ve uyum sürecinde uyum ve paralellik sağlanmaya çalışılmıştır (1,2,3,5,7,9,15)

Ulusal otorite tarafından düzenlenen "Ulusal Kalıntı kontrol Planı 2007"de yapılan gruplandırmada antikoksidial iyonoforlar "B2b" grubunda değerlendirilmiş olup buna ilişkin laboratuvar alt yapısı, analiz yetkinliği ve referans olarak PVKAE gösterilmiştir. Salinomisin ve Lasalosit için kontrol limitinin izlenmesi amacıyla tespit seviyeleri için 10 µg/kg, doğrulama da 2 µg/kg düzeyleri ile yasal olarak sınırlandırılmıştır (2,3,4). Burada analizlerin LC-MS ve doğrulamanın da LC-MS/MS ile yapılması şart koşulmaktadır.

AB komisyonu Veteriner ilaçlarının tanımında "fizyolojik bir fonksiyon değişimi veya patolojik bir durumun önüne geçilmesi" şeklinde (2001/82/EC) tanımlarken EMEA biyolojik maddeler, gelişim düzenleyiciler ile yeni ürünleri ayrı, diğer veteriner ilaçlarını ayrı değerlendirmektedir. Buna ilişkin bazı birlik ülkeleri VMD ve VPC diye iki komiteye ayırmakta ve lisanslandırma işlemini tamamen VMD' ye vermektedirler.

Maksimum kalıntı seviyesi tespiti (MRL) ise merkezi olarak EMEA'nın CVMP tarafından 2377/90/EEC'ye göre çalışan 96/23/EC'ye göre yapılmaktadır. Burada hormonal ve beta agonistler ile büyüme stimülanları yasaklanmıştır. Dolayısıyla rezidü düzeyinden (MRL) bahsedilemez. Çevresel kontaminantlar, (ağır metaller, pestisitler, mikotoksinler de dâhil olmak üzere) bu sınıftandır. AB ülkelerinde koksidiostatların kullanımı iyonoforlar da dâhil olmak üzere 1831/2003/EC/22 September 2003 no ve tarihli düzenlemeye göre yapılır (11,12,15).

AB'nin bu standardı ülkemizde lasalosit için hindi, sülün, keklük ve bildircında aynı olmak kaydıyla 90-120mg/kg olarak kabul edilmiş olup bunlar için de yumurta limiti kabul edilemez denilmiştir (5,11,45). Aynı amaçla tavşan yetiştiriciliğinde de koksidiyoz etkenlerine karşı koruyucu olarak kullanıldığı bilinmektedir (55).

Salinomisinin 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⁺⁺ konsantrasyon artışı dışında biyokimyasal parametrelerde önemli bir değişime sebep olmadığı bildirilmiştir (55).

Toplu yetiştiricilikte antibiyotikler hastalıktan koruyucu amaçla kullanımının yanı sıra verim arttırıcı olarak da kullanılırlar. Bu uygulama et tipi yetiştiricilikte daha fazla öneme sahiptir. Böylece et üretiminde aynı kesim ağırlığı için yemden %3–12 oranında kârlılık sağlanır (28,30,61). Bu; hayvanların gastro-intestinal sisteminin flora ve faunası üzerinde yapılan seçkin pozitif ve/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 fermantasyon 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 kirletici olarak libere olabilecek bir gazın üretim öncesi kendi yapı taşlarıyla enerji üretimine kanalize edilebileceği bilinmektedir (11,17 25).

Ülkemizde kullanımına ilişkin veri olmamakla beraber iyonoforların ruminantlarda rumen florası üzerine metanojenik ve sakkarolitik bakteriler üzerine etkileri nedeniyle azot retensiyonuna neden olmalarından dolayı yemden yararlanmayı arttırdıklarından belli süreler kullanıldıkları bilinmektedir (17,25). Büyük ruminantlar ve domuzda gelişme arttırıcı amaçla da kullanılırlar; sindirim kanalında laktat üreten (özellikle *S. bovis*) bakterileri inhibe ederrek laktatı propionata dönüştüren bakterileri etkilemezler (56). Salinomisin domuzda kullanılan ilk iyonofor olup 50ppm'den başlayarak 25ppm ile sonlandırılan rasyonlardan %7–12 arası ağırlık kazancı elde edilmiştir.

Lasalosit ve salinomisin bunlara ilaveten domuzlarda sarkosporidiyoza, ruminantlarda kriptosporidiyozise karşı kullanımı da bildirilmiştir (17,24, 45). Lasalosit; sandviç gibi dimerik yapıda ve divalen katyonik (Ca⁺⁺,Mg⁺⁺)bir bileşik olup liposolübl iyonları pozitif şarjla taşınması ruminantlarda süksinat üreten *Bacteroides*'e ve süksinatı propiyanata çeviren *Selenomonas*'a selektif etkinliğinin iyonofor etkinliğe ilave edilebileceği de bildirilmiştir (14).

İyonoforların Gram pozitif bakterilere etkinliği, *Streptococcus bovis*'in azalması ile laktat üreticisi mikroorganizmaların azaltılmış olmaları ve ruminal metan gazının yanı sıra oluşan H⁺ miktarının da azaltılması asidoz için önem taşır. ABD'de yaz otlak ve meralarından maksimum yararlanmak ve 150 gün kalıcılığını sağlamak amacıyla kontrollü salınımlı kapsülleri üzerinde de çalışılmış ve salinomisin süt sığırları ketozisinde de kullanılmıştır. Ruminal sıvıdaki propiyonik asit miktarının arttırılması, asetik ve bütirik asitlerin oluşumunun azaltılmasının yanı sıra selüloz katabolizmasının da azaltılması anlamına gelir. Bu aslında doğrudan mikrobiyel proteinlerin sindirim verimliliğinin arttırılması demektir. Tüm bu

işlemler besi danalarında %11, besiye alınan koçlarda %12-13'lere varan bir verim sağlamıştır denilmektedir (17)

Salinomisin ruminantlardaki kullanım genişliğine paralel hem ABD'de hem de AB'de rezidüel olarak herhangi bir limit mevcut olmayıp son tüketiciler için risk oluşturmadığı bildirilmektedir (10,17)

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 serpinti şeklinde etkin olabileceği ve bunun bir çok ciddi sağlık problemini de beraberinde getirebileceği de bir gerçektir (12,20,33,50).

AB eksperler komitesi 1998 yılında avilamisin, flavomisin, lasalosit, monensin ve salinomisini yem katkıları olarak önerirken avoparsin, basitrasin, karbadoks, olakindoks, spiramisin, tilozin ve virjinamisini yasaklamıştır. İsveç 1986 yılında yem katkıları 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 (41,56).

İyonoforlar için Avrupa otoritesi 75-125mg lasalosit/kg olarak broyler ve hindilerde kullanımını ve kesime beş gün kala ilaçlı yemin kesilmesini öngörmektedir. Yumurta tavuklarında da 16 haftaya kadar kullanılabilirliğini bundan fazlasının mümkün olmadığını deklere etmelerine rağmen Kuzey İrlanda'da 161 yumurta örneğinde yapılan bir çalışmada %66 oranında 0,3µg/kg düzeyinde lasalosite rastlanmıştır (41).

Salinomisin için beklemenin gerekli olmadığı, (61) bir gün, (10) üç gün, (49) beş gün (5,30,56) bekletilmesi gerektiği vurgulanmışsa da sonuncu kararın hem AB hemde ulusal yasal kriterlerle uyumluluğu bilinmektedir. Ayrıca Şener ve Kaya yumurtacı tavuklarda da ilk 16 haftalığa kadar kullanılabilirliğini yazmışlardır ki bunlar yasal yürürlüğe de paraleldir (4,5,10,11). Sonuç itibariyle kesim öncesi bekletmeye ilişkin olarak çoğu literatür de yasal mevzuatı doğrular nitelikte olup 5 gün kesim öncesi bekletme zorunluluğu mevcuttur (4,9,10,33,58).

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 (45).

Lynas satışı yapılan 161 adet yem numunesinin herhangi bir katkı maddesi içermediği beyan edilen 71 adedinden (%44,1) 42 adedinin (%26,1) değişik konsantrasyonlarda antibakteriyel katkı içerdiğini saptamıştır (42). Yine bir çalışmada 247 adet koruyucu katılmış yem numunesinden 87 adedi (%35,2) deklere edilmemiş antibakteriyel ajanlarla kirlili bulunmuştur. Bunların da 59 adedi (%23,9)'u kabul edilebilir düzeylerin üzerinde meydana gelmiştir. Bunların en çok kantifiye edilebilenleri klortetrasiklin (CTC,%15,2) sulfonamidler (%6,9) penisilin grubu (%3,4) ve iyonofor grubu (%3,4) olarak sıralanmıştır (22,42). 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 örneğinde 69 (%16,23) adedi rezidüli bulunmuştur **(33)**. Yine paralel bir taramada İrlanda'da çiftliklerin %15,2'sinin antibakteriyel kalıntı yönünden ari olduklarını bunların dışında katkı kullananlardan ise bir kısmının koruyucu dozu aşarak terapötik dozda veya daha üzerinde kullandıkları tesbit edilmiştir. ABD'de de domuz çiftliklerinin %88'inin antimikrobiyal kullandıkları ifade edilmiştir **(42,45)**. İngiltere'de VMD'nin 1995–2005 yılları arasında tavuk yumurtası, yumurta bazlı bebek maması, tavuk eti, tavuk karaciğeri (broyler dâhil), hindi karaciğeri, bıldırcın yumurtası, eti ve tavşan etinin de içinde bulunduğu birçok ürün üzerinde yapmış olduğu araştırmada test edilen örnek/lasalosit içeren örnek sayısı sırasıyla 2885/138, 397/0, 759/1, 2186/26, 341/1, 70/31, 50/11, 112/0 olarak bildirilmiştir **(5)**.

İngiltere'de VMD'nin ortaya koyduğu bu farklı seviye "Differential Action Limit" (DAL) lasalosit için 10 ppb salinomisin için 20ppb olarak belirlenmiş ve bu toksikolojik olarak da bir temel teşkil etmiştir **(45)**.

İyonoforlar güvenlik alanı içinde kullanıldıklarında son derece etkin maddeler olup rezidü için sığırlarda bekletme süresine ihtiyaç olmadığı ve yapılan bir rezidü taramasında monensin ve salinomisin ile sırasıyla 6 ve 2 vakada karşılaşıldığı başka da rastlanmadığı belirtilmiştir **(23,29,45)**. Başka bir araştırmada monensin, lasalosit ve salinomisin için 520 farklı kümeste yapılan araştırmada kullanım oranının yüksek olduğu salinomisin ve lasalositin konsantrasyon olarak salinomisinin 0,9-13,9 mg/kg ve lasalositin 0,1-5 mg/kg oranlarında yemlerde bulunduğu, bunların yumurtadaki birikimlerinin ise 3,3 µg/kg salinomisin ve 6,3 µg/kg lasalosit olduğu tesbit edilmiştir **(48)**. Broylerlerde kullanım için lisanslandırılmış iyonoforların rezidüel olarak karaciğerde düzenli olmayan şekilde tespit edilebildiği ancak satışı yapılan piliç etlerinde bulunmadığı da iddia edilmiştir **(41,44)**.

Daha önce kanatlı dokularında kalıntı düzeylerinin ısı karşısındaki tepkisi 2001 yılında Baydan ve arkadaşları tarafından sülfadiazin yine aynı araştırmacılarca 2002'de sülfadimetoksin, sülfakinoksalin ve sülfadoksin kalıntıları üzerine yapılmış olup farklı pişirme işlemlerinin sülfadimetoksin, sülfakinoksalin ve sülfadoksin üzerine önemli bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir **(18,19)**. Kızartma ve dondurma işlemlerine ilişkin ise çok az sayıda çalışma olduğu görülmüştür **(19,51)**. Dehai ve ark (1996) kanatlı dokularında sülfadiazin kalıntılarının çeşitli pişirme, -20C'de dondurma ve bekletme ile azaldığını belirlemişlerdir **(27)**.

Kuzey İrlanda'da yumurtacı tavuklarda 6 ay boyunca kullanılan lasalositin rezidüel olarak 1994'te %66 den 1995'te %21'e inmesinin nedenlerinin başında granüler formun kullanımı gösterilmiş ve gerek kullanımı ve gerekse toz formun kullanımının azalması rezidüel olarak da bir azalmaya neden olmuştur. Buna karşılık İngiltere'de lasalosit yumurta tavuklarında daha az tesbit edilmiştir. 1994'te %10,7'sinde 40 µg/kg olarak yumurtada tesbit edilirken bu oran 1998'de %1,1 düzeyinde saptanmış fakat bu oran inandırıcı bulunamamıştır. Çünkü 2000 yılında %33'ünde ortalama 40 µg/kg oranında taşıdığı tesbit

edilmiştir. Yine Kuzey İrlanda'da Temmuz-Ekim 2001 tarihleri arasında yapılan başka bir çalışmada 148 adet yumurta numunesinden 3 adedinde (%2) sadece 40 µg/kg düzeyinde kalıntı taşıdığı bulunmuş ve düşük düzeyde kirlenme ise 20 adette, %13,5'inde, 2 ile 27 µg/kg olarak tespit edilmiştir. İngiltere'de bıldırcınlarda 20 kas doku ve 10 yumurta üzerinde yapılan bir çalışmada lasalosit rezidüsü 6 kas doku ve 10 yumurtada 120 ile 5400 µg/kg arasında tespit edilmiştir **(33,40,41)**.

İsveçte 1999 yılında Rosen ve arkadaşları yaptıkları bir taramada 100 adet broiler karaciğerinin beşerli bir araya getirilerek 20 örnek halinde analiz edildiğini bunlardan 11 adet örnekte narasinin rezidüel olarak 0,04–0,67 µg/kg arasında değiştiğini tespit etmişlerdir.(53) Kuzey İrlanda'da yapılan bir başka çalışmada 40 adet yem rasyonundan %22,5'inde monensinin prevantif dozun çok üstünde 5mg/kg düzeyinde bulunduğu en yüksek buluna örneğin ise 44mg/kg olduğu bildirilmiş sebepleri araştırıldığında ise yem fabrikalarındaki gerek normal gerekse pellet yapımı esnasında makine ve ekipmanların bulaşıklığı, personelin dikkatsizliğinin ana nedenler olduğu anlaşılmıştır **(12,45,53)**.

2.5. Lasalosit ve Salinomisin'in Eko-Toksisiteleri:

Lasalosit ve salinomisin her ne kadar iyon olarak değişmemiş şekilde çok az miktarda atılıyorsa da çevre koşullarında hızlı degrade olduğundan birikimi, karasal ve sucul yaşam alanları floralarını etkilemekten uzaktır. *In vitro* ve *in vivo* olarak salinomisin'in genotoksik olmadığına kanıtlanmış olup buna ilişkin % 41,8 oranında Salinomisin sodyum içeren yemle beslenen ratlar üzerinde her hangi bir genotoksik etki meydana getirmediği saptanmıştır **(10,11,45)**.

Polieter iyonoforlar memelilerde karaciğerde hidrosilasyon, o-demetilasyon ve karboksilasyon gibi oksidatif proseslerden geçtiği ve yapıları gereği katyon tutucu olduklarından gerek gübre ile gerekse hayvan atığı sularla taşınmaları ve bu yolla çevresel bir etkiye neden olmaları kullanım dozlarında mümkün değildir. Bu; %20 oranında ekskrate edilmiş varsayılan iyonoforik aktivitede bile PEC/PNEC (~metabolizma/biyodegradasyon) oranında etkin bir fark olmayacağı anlamı taşır. Lasalosit katyonlarla zwitteriyonik kompleks şeklinde membran transportu gerçekleştirdiğinden değişmemiş şekilde %3 oranında karaciğer ve dokularda tespiti mümkün iken, rezidüel aktivitesi Rb, Na, C ile işaretlemek suretiyle de tespit edilebilmektedir **(5,6,11,28,29)**. Bu ise iyonofor antikoksidiyallerden salinomisin ve lasalositin hem kullanım şekli, amacı, etkinliği ile geç direnç oluşumunu hemde salinomisin'in çok daha az olmak üzere hem lasalositin hemde salinomisin'in doğaya; yerüstü suları ile sucul kültüre dolaylı etkisinin oldukça sınırlı olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

2.6.Lasalosit ve Salinomisinin Tespit Yöntemleri

Geniş bir molekül aralığına sahip (613–940) iyonoforlar içerdiği iki uçtan biri karboksilik asit diğer uçta ise hidroksil grubu bulundurur ve katyonlarla siklik kompleks yaparlar. Bu yapılarından ötürü birçok yöntemle ortaya konabilirler. Kolorimetrik yöntemle renk değişimi esasına dayalı olarak, çeşitli kromatografik yöntemlerle (TLC, HPLC), Floresan detection ve immün assay olarak ayrıştırılabilirler. LC-MS ile hem iyonoforlar hemde robenidin, nikarbazin, HFG gibi polimerler de ayrıştırılabilirler (**10, 26, 28,29, 31,43,47**).

Tespit çalışmalarında günümüzde ince tabaka kromatografi, kolorimetrik yöntemler, floresan detection ve immün assay gibi yöntemlerin kullanımı HPLC, LC-MS, LC-MS/MS gibi gelişmiş teknolojilere kıyasla oldukça azdır. Geçmişte kullanılan yöntemlerin ölçüm hassasiyetleri ve doğrulanabilirlikleri sınırlı olup bugün için iyonofor antikoksidiyallerin analizlerinde gelişmiş yöntemler kullanıldığından eski yöntemler çok sınırlı kullanılmaktadırlar. Günümüzde LC-MS ile iyonofor antikoksidiyallerin 1 ppb'nin altında tespitleri ve LC-MS/MS ile de doğrulamaları çok daha büyük duyarlılık oranlarında imkân dâhilindedir (**26,28,43,47**).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma; İstanbul ilinden numune bazlı tarama testleri, yedirme sonrası doku ve karaciğer rezidüel seviyeleri ile yüksek düzeylerdeki kalıntının ısıtma işlemlere tepkisi olmak üzere toplam ardışık sıralı üç aşama halinde toparlandı.

3.1. Numune:

Çalışmamızda İstanbul'un Anadolu ve Avrupa yakalarında 15 ilçesinden (B.Evler, Bağcılar, Bakırköy, K.çekmece, Gaziosmanpaşa, Fatih, Eminönü, Beyoğlu, Şişli, Güngören, Tuzla, Maltepe, Pendik, Kadıköy, Beykoz) topladığımız 150 (yüzeli) adet yumurta ile 150 (yüzeli) adet broiler eti örneği alınarak "Pendik Veteriner Kontrol Ve Araştırma Enstitüsü" (PVKAE) kalıntı laboratuvarına etler soğuk zincirde yumurtalar satış koşullarında en fazla 3(üç) saat içerisinde taşındı. Numuneler alınırken yumurtalarda her viyolden 1(bir) adet yumurta alınmasına, aynı firma aynı adres ve aynı parti malı olması durumunda ikinci bir numunenin alınmamasına kararlı özen gösterildi.

Yumurta örneği alım tablosu ve piliç eti örneği alım tablosu aşağıdadır.

Numune No:	1-150 adet yumurta
Alınış Tarihi	15-Mayıs-13Haziran 2007
Cinsi	Yumurta
Ortalama ağırlığı	50-60gr/ad. Yumurta
Kesim/Pk. Tarihi*	12 Mayıs-10Haziran
Alındığı Yer	B.Evler,Bağcılar,Bakırköy,K.çekmece,Gaziosmanpaşa,Fatih,Emi nönü,Beyoğlu,Şişli,Güngören,Tuzla, Maltepe,Pendik,Kadıköy,Beykoz,
Özel İşareti	Yok
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 süreleri tarihleri aralığı	

Tablo 3.1. Yumurta örneği alım tablosu

Numune No:	1-150 ad.arası numaralandırılmış Piliç eti Numunesi
Alınış Tarihi	15-Mayıs-13 Haziran 2007
Cinsi	Piliç eti
Miktarı	Piliç eti: 230-350/ad. Numune
Hangi dokular	P.eti:deri+but+göğüs (yarım piliç)
Kesim/Pk. Tarihi	12 Mayıs-10 Haziran
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	Kendi yapı, kıvam, görünüş doku ve özelliklerinde
Satışa arz	Satışa arzedilmiş halde
Düşünceler	Halka satışa arz şeklinde reyon dolabından alınmasına dikkat edildi

Tablo 3. 2. Piliç eti örneği alım tablosu

Piliç eti numuneleri alınırken de yine farklı parti, farklı kesim ve/veya firma olmasına dikkat edildi. Böylece yumurta ve piliç eti numunelerinin imkânlar dâhilinde farklı seçimi öngörüldü.

Numune alınırken; tarihi, cinsi, miktarı, hangi dokular olduğu, nereden alındığı, firma adı, kesim tarihi, paketleme tarihi, varsa işaretleri, hakkındaki düşüncelerimiz olmak üzere örneği Tablo:2'deki gibi kaydedildi.

Tablo 3.1. ve 3.2.'deki gibi numuneler; yumurtada bir adet olmasına, 50-60 gr aralığında olmasına, kırık, çatlak, ve deformasyonlu olmamasına, ette ise özellikle satışa arz edilmesine ve organoleptik olarak kokusu, kıvamı, rengi ve morfolojik yapısının düzgün olmasına özenle dikkat edilerek alındı. PVKAE kalıntı laboratuvarında tek, tek kendi numaralarıyla adlandırılan beher ve tüpler ile karışmanın önlenmesi açısından etiketlenerek sırasıyla yan, yana konuldu.

Her defasında ortalama 33-35 numune alınmasına karşın gerek bireysel gerekse ortam ve ekipmanlardan kaynaklanan sebeplerle ancak 30 örnek çalışıldı. Bu durum; yumurtaların kırılması, broiler etinde ise solvent kullanım sırasına yanlışlıkla uyulmaması ile homojenizatör, vorteks ve blenderin zaman, zaman çalışmaması şeklindeydi.

Ekstraksiyon Yöntemi olarak PVKAE'nin de kullandığı **''Antikoksidiyal İlaç Kalıntılarını Tarama Analiz Talimatı''** diye adlandırılan EFSA'nın ve AB referans laboratuvarlarının da (Berlin) kullandığı aşağıdaki analiz yöntemi seçildi. AB tarafından bir anlamda çok uluslu ortak kriter belirleme organı olan Community Reference Laboratories (CRL veya CRLs)'in her ülkeye ait kriter uyumlulaştırma laboratuvarı olarak adlandırılan National Reference Laboratories (NRL) aralarında yapılan iş bölümünde antikoksidiyaller için Berlin Veteriner Laboratuvarı referans laboratuvar olarak kabul edilmiştir.

Community Reference Laboratories for residues (CRLs)

CRL Name and Groups	Address
BgVV-CRL Beta-agonists Anthelmintics Anticoccidials including Nitroimidazoles Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's)	CRL Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin Diedersdorfer Weg 1 D-12277 Berlin GERMANY Tel. +49 1888 412 2302 Fax: +49 1888 412 2955 http://www.bgvv.de Director: Dr. Petra Gowik

Tablo: 3.3. AB’de CRL referans laboratuvar bilgileri

Bu çalışmada tespit ve doğrulamada yöntem olarak ulusal otoritenin kullandığı ve AB’nin de resmi analiz yöntemi olarak bildirdiği Berlin Antikoksidiyal kalıntı analiz yöntemi kullanılmıştır. Tespitler LC-MS ile yapılmış olup doğrulamaları LC-MS/MS ile gerçekleştirilmiştir.

Yöntem; tarafımızdan başlangıcından itibaren her basamağı A’dan başlamak suretiyle harflerle numaralandırılarak basite indirildi. Koşullarımız itibariyle numuneler sıralı 24’erli gruplar halinde çalışıldı. Çalışma esnasında homojenizatör olarak ‘Heidolph® diax 900’, vorteks olarak ‘Heidolph® multi Reax 12’ ile Heidolph® reax control GB 10436-2 ve santrifüj olarak da Sigma® 2-16K G.B. 10439 kullanıldı. Ultrasonik banyo Bandelin Sonorex® marka cihazla, tartım işlemleri ise Shimadzu® Libror Aeu-210 Ve Mettler® Toledo Ag204 hassas terazi ile yapıldı. Kurutma işlemlerinde sıcaklık ve basınç ayarlanabilir ZYMARK® Turbo Vap azot evaporatörü kullanıldı.

3.1.1. Kullanılan Materyal, Standart ve Kimyasallar:

3.1.1.1. Materyal:

200ml’lik cam beher ve 15ml’lik deney tüpü,
 50 ve 75ml’lik silifli kaplı santrifüj tüpleri,
 Vorteks karıştırıcı,
 Ultrasonik su banyosu,
 Sıcaklığı ayarlanabilir santrifüj,
 N (azot) evaporatörü,
 Gold-Tandem MS/MS
 Thermo Finnigan® MSQ LC-MS/MS sistem,

3.1.1.2. Kimyasallar;

- 1-Metanol, HPLC grade, (Merck®),
- 2-Asetonitril, HPLC grade, (Merck®),
- 3-Amonyum Asetat, (J.T.Baker®)
- 4-NaOH, (J.T.Baker®)
- 5-n-Hekzan Reagend grade, (Riedel®)
- 6-Toluen Reagend grade, (Merck®)
- 7-Tetrahidrofur, (Riedel de Haen®)
- 8-Formik asit, (Merck®)

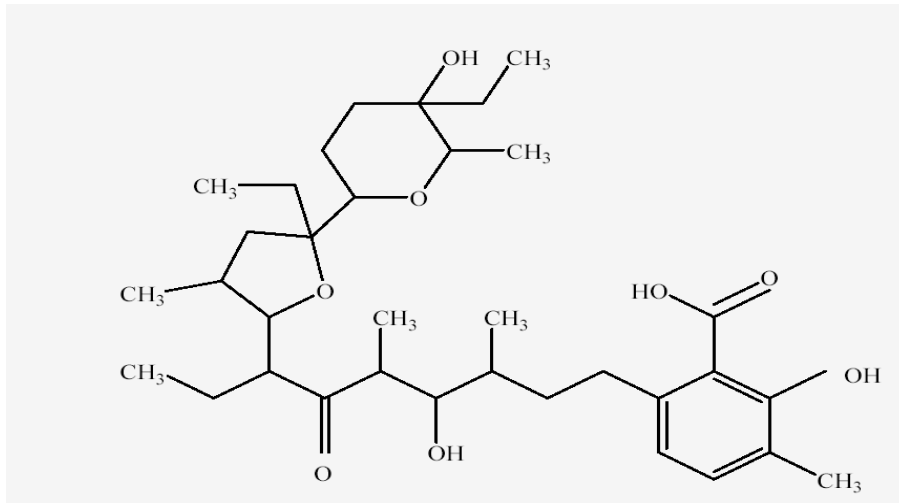
3.1.1.3. Karboksilik İyonoforlar İçin Cihaz koşulları

LC Kolon	Phenomenex Synergy Max RP 2.1x150mm 5µ						
Mobil Faz	%60ACN + %25 0.1M amonyum asetat + %10 MeOH + %5 THF + %0.2 Formik Asit						
Autosampler Sartlari							
İnjection volume	25µl						
Flush Volume	1000µl						
Wash Volume	500µl						
Tray Temperature	4°C						
Column Oven Temperature	40°C						
LC Pump Sartlari							
Program	0-35dk isokratik						
Flow	0.25ml/dk						
MS Sartlari							
İyonizasyon Modu	ESI (+)						
Tarama Tipi	SIM						
Prob Temperatur	400°C						
Aranacak İyonlar ve Diğer Ayarlar	İsim	Kütle	Span	Time Range	Dwell Time	Polarity	Cone voltage
	Salinomisin	773.6	2	17.50-21.00	0.50	+	110.00
	Lasolasid	613.5	2	5.00-12.00	1.00	+	95.00

Tablo: 3.4. Antikoksidial İlaçlar İçin Uygulanan Cihaz Ayarları

3.1.1.4. Standartlar:

1-Lasalosit, (Alpharma®)



Şekil: 3.1. Lasalosit kimyasal yapısı

ALPHARMA
Animal Health Division

Certificate of Analysis
Lasalocid Sodium Standard

Active Substance:	Lasalocid Sodium
Lot No.:	TC00-007-62/A
Reference No.:	TC4252
Date of Certification:	January 27, 2006
Date of Expiration:	January, 2012

Specifications:

Purity:	100.3% by GPC 100.1% by HPLC 99.36% Lasalocid-A 0.79% Homologs
Standard Type:	Secondary Standard
Storage Conditions:	Store in dark container, < 8°C
Drying Conditions:	Dry Standard at 60°C, < 5 mm Hg, 3 hours

January 27, 2006

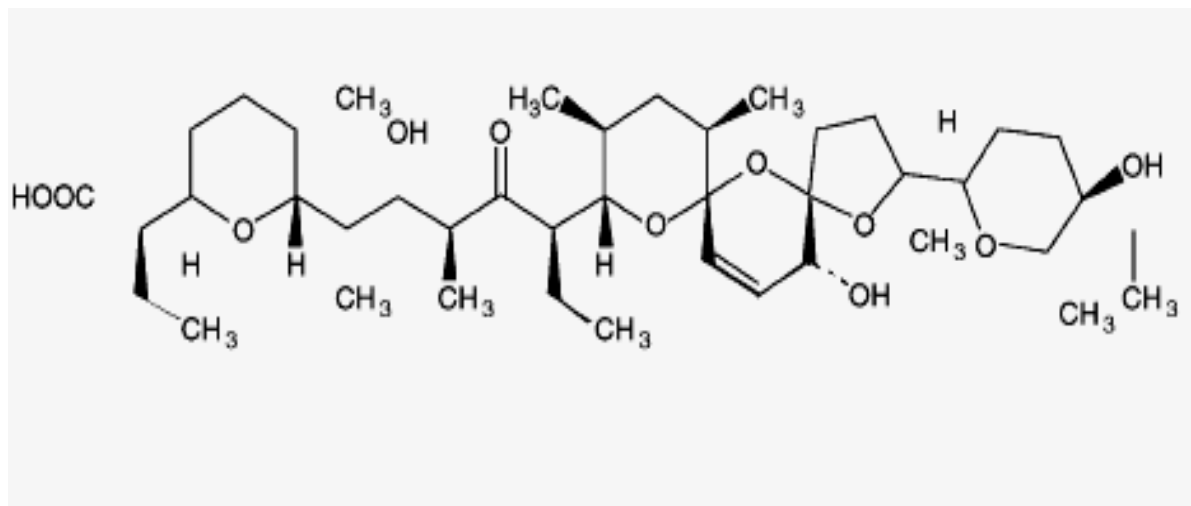
Joseph B. Henry
Joseph B. Henry
Manager, Analytical Development/QC
Technical Center, Willow Island

Alpharma, Inc. 1 Duggar Drive Willow Island, WV 26134-9711

Tel: (304) 665-4191
Fax: (304) 665-4187
TC 8003 Revision 2.0

Şekil: 3.2. Lasalosit standartı sertifikası

2-Salinomisin, (Sigma®)



Şekil: 3.3. Salinomisinin kimyasal yapısı

SIGMA-ALDRICH
 Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH D-10918 Berlin
 Telefon: +49 30 27 8234-158

Riedel-de Haën
 CERTIFICATE OF ANALYSIS /
 INSPECTION CERTIFICATE 3.1 acc. to DIN EN 10204

Deelno. 10.07.2006/760422
 Order-No.:
 Customer-No.:
 Order-Code:
 Quantity:
 Production date: 23.Sep.2005
 rec. Re-test date: 23.Mar.2008

Article/Product: 46729
 Batch : 5266X
 Salinomycin SV sodium salt pentahemihydrate VETRANAL

Reference Material (RM)
 1. General Information
 Formula: C₄₂H₆₉NaO₁₁·x2,5H₂O
 CAS-No.: [55721-31-8]
 Usage : Antibiotic
 Molar mass: 818.02 g/Mole
 Recomm. storage temp.: approx. 4 °C

The estimated relative error of a single measurement of the assay can be expected to be ± 1 %
 (confidence level 95 %, n=6).

2. Batch Analysis

Identity (NMR)	complying
Assay (HPLC)	94.4 area %
Melting range	191.0-191.5 °C
Water (Karl Fischer)	4.3 %
Date of Analysis	18.Nov.2005

3. Advice and Remarks

- The minimum shelf life is based on the current knowledge and holds only for proper storage conditions in the originally closed flasks/ packages.
- Whenever the container is opened for removal of aliquot portions of the substance, the person handling the substance must assure, that the integrity of the substance is maintained and proper records of all its handlings are kept. Special care has to be taken to avoid any contamination or adulteration of the substance.
- We herewith confirm that the delivery is effected according to the technical delivery conditions agreed.
- The batch from which we delivered, showed the above-mentioned values.
- Particular properties of the products or the suitability for a particular area of application are not assured.
- We guarantee a proper quality within our General Conditions of Sales.

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
 Quality Assurance

Dr. Gaudel
 Works Inspector

Şekil: 3.4. Salinomisin standardı sertifikası

3.2. A- Numunenin Hazırlanması

Analizi yapılacak yumurtanın tamamı, broiler etinin 200 g'ı bir mikser (blender) yardımıyla küçük parçalara ayrıldıktan sonra homojenizatör yardımıyla iyice parçalanıp numune kabına aktarıldı. Herhangi bir bulaşmayı engellemek için doğrayıcı ve parçalayıcının her defasında arınması için gerekli temizlikleri yapıldıktan sonra kimyasallarla (su, asetonitril, metanol) muamele ettirilerek temizlendiğinden emin olundu. Kullanım kolaylığı açısından tüp olarak plastik 50 ml hacimli tek kullanımlık tüpler seçildi. Kurutma için yine plastik 15ml'lik tüpler tercih edildi.

3.3. B-Ekstraksiyon

PVKAЕ'nin kalıntı laboratuvarında 50 ml'lik santrifüj tüplerine 10 g blenderle ufaltılmış doku örneği alınarak üzerine 15 ml asetonitril, 2 ml saf su eklenerek 30 sn vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra homojenizatörde tek örneklilik sağlayıncaya kadar homojenize edildi. Homojenize edilen örnek ultrasonic banyoya alındı. Ultrasonik banyoda 10-15 dk süresince en küçük parçalara kadar ayrılması ve tüm kalıntının homojenizata geçmesi için banyo edildi. Banyo zaman ayarlı olduğundan yumurta örneklerinde 10 doku örneklerinde ise 15 dk'ya ayarlandı. Ultrasonik banyodan alınan örnek ısı ayarlanabilir bir santrifüj ile 4°C'de 3 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst fazdan 2,5 ml ekstrakt 25 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve buna 4ml 0,5 M NaOH, ile 10 ml Hekzan : Toluен (1:1) çözeltileri eklendi. Karışım 30 sn vortekste dikkatle, merkezkaçtan dolayı dökülmemesine özen gösterilerek karıştırılıp 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst faz ayrılarak 15 ml'lik deney tüpüne aktarıldı.

3.4. C- II. Geri kazanım;

Alt faza 5 ml hekzan + toluен (1:1) çözeltileri eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı. Santrifüj sonunda oluşan üst faz ayrılarak birinci üst faz ile birleştirildi. Elde edilen bu fazlar azot gazı altında 60 °C'de kuruluğa kadar uçuruldu. Üst faz ölçü bakımından yumurta da en fazla ve kızartılmış dokuda en az oldu.

Kurutma işlemi sonrasında her tüpün ağzı sıkıca kapatılarak numaralandırmanın silinip silinmediği kontrol edilerek analiz için kendi grubuna dahil edildi. Her grup aynı işlemlerle birleştirilerek analize kadar soğuk muhafazaya alındı.

3.5. D-Analiz (LC-MS);

Solvent uçurulduktan sonra tüpteki kalıntı 500µl asetonitril+su (75:25) ile en az 30sn vorteks karıştırıcı yardımı ile çözündürülerek insort vialle aktarıldı ve bekletmeden analize verildi. Saha taramalarında bekletmeden analiz ettirmekle beraber deneysel çalışma ve ısıl işlemler arasındaki farkların gözlemlenebilmesi ve mukayese imkanı için soğuk zincire alınması uygun görüldü. Analitik cihazların kalibrasyon ve performans testlerinden sonra metot performans testleri yapıldı.

Ekstrakte edilmiş ve azot gazı ile kurutulmuş örnekler 500µl asetonitril+su (75:25) ile çözülerek cihaza enjekte edildi. Doğrulama testleri için yine yukarıdaki yöntem ile analitlerin tesbit limitleri kadar standart enjeksiyon yapılarak öncelikle şartlarımızda tesbiti mümkün miktar ile geri kazanım (recovery) saptaması yapıldı. Lasalosit ve salinomisin'in kas dokusundan ayrıştırılması, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirlilikten ayrıştırılması yapılarak LC-MS-MS sistemi ile doğrulamaya geçildi.

Analiz için thermo finnigan surveyor LC pump, otomatik enjektör (thermo finnigan surveyor autosampler), LC kolon (phenomenex synergy max RP 2,1X150 mm 5µ) 40 °C kolon fırın ısısı, 25 µl enjeksiyon hacmi, 0,3 ml/dk akış hızı, 0-25 dk diagonal akış programında ve %60 asetonitril + %25 0,1M Amonyum asetat + %10 metanol + %5 tetrahidrofuran + %0,2 formik asit olan mobil faz şartları oluşturularak çalışmaya başlandı.

3.6. E- LC-MS Koşulları:

MS dedektör :Thermo finnigan MSQ LC-MS

Bilgi İşlem Programı :Xcalibur 1,2 Software DELL

Azot Gazı Basınç (P) :60psi

Prob ısısı :400°C

İyonizasyon yöntemi :ESİ

İyon dedeksiyon modu :SIM

Taranabilir iyon değerleri: Polarite, zaman aralıkları, cone voltajı

İyonofor	Kütle	Polarite	T(süre aralığı)	V(uygulanan voltaj)
Lasalosit	613,6	+	5-9,30	90
Salinomisin	773,7	+	13,10-16,00	100

3.7. Materyal sağlanması, gruplandırma, yedirme ve ekstraksiyon:

Bursa'da ticari bir işletmeden alınan 150ad. Ross ırkı 16 günlük broyler pilici Bilecik ili İnhisar ilçesi Tarpak beldesine kafeslerde zayıtsız taşındı. 30 adet fazla broiler olası zayıt v.b. sorunların bertaraf edilmesi için fazladan alındı. Bu fazlalıkların çalışma süresince kullanımına gerek duyulmadı.

Daha önceden hazırlanmış, bölümlere ayrılmış, lasalosit için "L" salinomisin için "S" kontrol için de "C" yazılarak işaretlenmiş bölmelere yerleştirildi. Muhtemel aksaklıkların (ölüm, hastalık v.b.) tolere etmek amaçlı L, S ve C grubu dışında kalanlar ayrı bir bölmeye alındı. Beş gün boyunca kendi normal rasyonları, antikoksidiyal içermeyen rasyonları, ile beslenme sürdürülerek eliminasyona neden olabilecek olası risklerden kaçınıldı.

3.7.1. Yedirme, kesim ve ekstraksiyon:

Yem karışımı 20. günde Lasalosit ve salinomisin için ton üzerinden hesaplama yapılarak lasalositin 90 ppm, salinomisinin 60 ppm miktarına denk gelen ilaç kısmı bir ön karışıma tabi tutuldu. Bu ön karışım ikinci bir karışımla homojen dağılımın sağlanacağından emin olunduktan sonra 100'er kg'lık pellet olmayan yemlere karıştırıldı. Bir sonraki gün (21.gün) yedirme sabahdan başlatıldı ve müteakip dört gün boyunca kontrol grubu ilaçsız olmak üzere yem ve su ad-libitum verildi.

Yem tüketimi lasalosit grubunda başlangıçta hafif bir alınganlık yaptıysada bu 2. günden öteye gidemedi. Salinomisin grubunda ise ilk günden itibaren yem tüketiminde artış buna paralel su tüketiminde ise aşırı artış gözlemlendi. S grubunun çokça yem tükettiği, ağırlık artışının L grubundan fazla olduğu, daha hareketsiz hatta yatarak bile tüketime devam ettikleri görüldü. Beş gün sonunda total yem tüketiminde S grubu %20'lik farkla daha fazla yem tüketti ve gözlemlenebilir ağırlık artışı da buna paraleldi. Beş gün boyunca konuya ilişkin değerlendirmeleri değiştirebilecek herhangi bir olumsuzluk meydana gelmedi.

Beşinci gün kesime geçildi. Kesime; optimal koşullarda L grubundan başlayarak rastgele seçimle numaralandırılmak suretiyle başlandı. Salinomisin ve kontrol grubu da bunu izledi. Deri but ve göğüs hariç komple çıkarılarak zamandan tasarruf edildi. İç organlar usulüne uygun uzaklaştırıldıktan sonra gerekli temizliği yapıp soğumaya terkedildi. Uygun karkas sıcaklığına erişilince her karkas için ayrı sıralı, numaralı numune kaplarına konularak soğuk zincirde laboratuvara taşındı. Her kesim sonrası mutlaka ekstraksiyon işlemlerinin yapılmasına özen gösterildi. Doku ve ısıl işlem ekstraksiyonları bir arada ve uygun dinlendirme koşullarında 24 saat sonra başlatıldı. Birinci ve üçüncü gün kesimleri çokça önemli görülerek bu süre aşılmamaya çalışıldıysa da 1. grup numune ekstraksiyonlarının uzun sürmesi, laboratuvar alışkanlığı, el çabukluğu gibi nedenlerden dolayı 2. kesime planlanmış zamandan ancak 4

saat sonra başlanabilirdi. Bundan sonra sırasıyla sırasıyla 5. ve 7. gün kesimlerin zamanlarında her hangi bir kaymaya mahal vermeden başarılar ekstrasksiyon ve diğer işlemleri aynen yerine getirildi.

Ekstrasksiyon için yöntem aynen korunurken doku ayırımına gidilmeden but ve göğüsten ortak alınan numuneler ile karaciğerden 10'ar gr'lık numuneler eş zamanlı ve paralel çalışılıp 3/4 parça da ısı işlemler için ayrıldı. Bu ısı işlemlere saklanmış kısım göz kararı üç eşit parçaya bölünerek -20°C'de 10 gün tutulduktan sonra -20 °C'den alınarak 0 - +4 °C şartlarında 12–24 saat çözündürülerek ekstrasksiyona alındı. İkinci parça toplumsal yemek kültürümüzden örneklenerek alışkanlıklarımıza paralel olarak fakat ısı ve basınç ayarlanabilir bir kaptaki pişirmeye tabi tutulup pişmiş et ve et suyu ayrı, ayrı ekstrakte edilerek numaralandırılıp analizi yapıldı. Pişirme esnasında örnekle beraber pişirme kabına 250 g doku için 50 ml su ilave edilerek pişirme süresi 25 dakika ile sınırlandırıldı. Son 1/4parça ise yine beslenme alışkanlıklarımıza paralel olarak kızartılıp ekstrasksiyonu yapılarak analize alındı. Kızartma işlemi elektrikli kızartıcı kullanılarak ve tüketilebilir nitelikte kızarma kıvamına geldiğinde işleme son verilerek tamamlanıp, ekstrasksiyona gidildi. Hem pişirme hemde kızartma işleminde tüketim alışkanlıklarıyla birebir paralellik sağlanmasına azami riayet edildi.

Ekstrasksiyon sonrası numunelerden elde edilen kalıntı organik bir çözücü yardımıyla SPE ve LLE teknikleriyle ile dokulardan ayrıştırıldı. İlaç kalıntılarını çözen organik bir solvent içinde var olan eluatlar azot gazı (N₂) altında kuruluğa kadar uçuruldu.

Örnek zenginleştirme olarak ifade edilen sample concentratör sistemiyle ekstrasksiyon sonucu dokulardan ayrılarak organik çözücüye geçen ilaç kalıntıları cihaza verilmeye kadar vida kapaklı tüplerde 4 °C de muhafaza edildi. Ekstrasksiyon tüpleri de olası bir geriye dönüş için soğukta muhafazaya bırakıldı.

Kurutulmuş tüpler 0,5 ml organik çözücü (500 µl asetonitril + su: 75/25) ile çözündürülerek viallere aktarıldı. Vial ağzları kapatma makinasıyla kapatılarak numaralandırılıp işaretlendi. Daha önceden lasalosit ve salinomisin için kalibrasyonu yapılmış analiz parametreleri doğrulanmış cihazlara bu örnekler belli bir sıralamayla verilerek analiz edildi.

4. BULGULAR

Yapılan piyasa araştırması İstanbul ilinden 15 ilçeden (B.Evler, Bağcılar, Bakırköy, K.çekmece, Gaziosmanpaşa, Fatih, Eminönü, Beyoğlu, Şişli, Güngören, Tuzla, Maltepe, Pendik, Kadıköy, Beykoz) değişik noktalardan numuneler alındı. Yumurta ve doku numuneleri alınış şekil ve kriterleri olarak TKİB'nın numune alma formatı da göz önünde tutularak Tablo 3. 1. ve tablo 3 .2.'deki gibi tablo haline getirildi.

Yumurta örneği alım tablosunda da görüldüğü üzere ortalama tüketim kriterleri göz önünde tutularak 50–60 g ağırlıklarında, deformasyonu olmayan ve son kullanma tarihi uygun olan; yani süresi içerisinde alınarak analizleri yapıldı. Piliç etinde de kullanım süresi etiket bilgileri ve organoleptik özelliklere dikkat edildi.

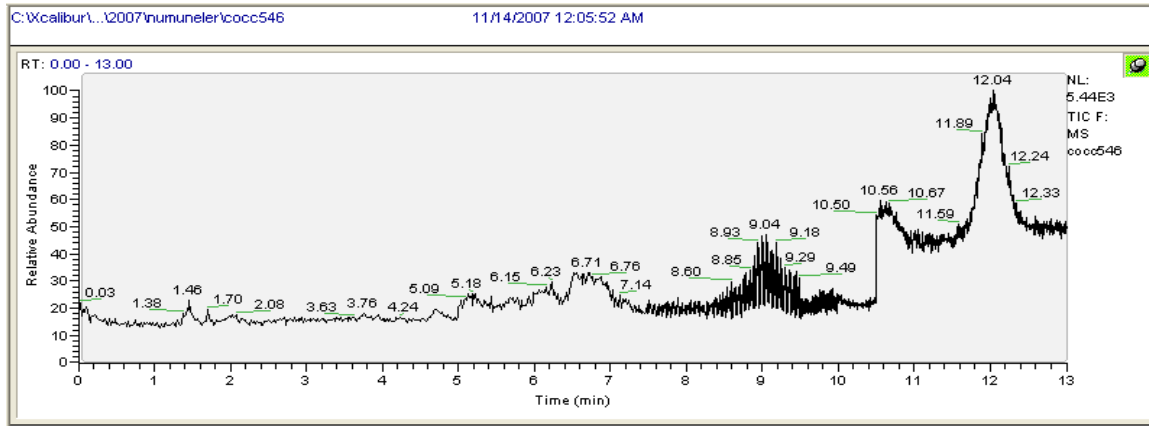
Numuneler İstanbul ilinden sadece onbeş ilçesinden toplanarak uygun koşullarda laboratuara taşındı. Taşınmada soğuk zincir ısı yalıtımı yapılmış kap içerisine buzlu aküler yerleştirilerek numuneler aralarına konularak yapıldı. Kısa süreli olan taşıma periyodundan numunelerin etkilenmemesine azami dikkat edildi.

Alınan numunelerin ekstraksiyon ve analizleri yöntem olarak AB'nin de Berlin'i (CRL, Berlin BgVV- BVL) referans göstererek kullandığı ve hâlihazırda PVKAE'de de kullanılmakta olan yöntem oturtulduktan sonra tarama çalışmaları başlatıldı.

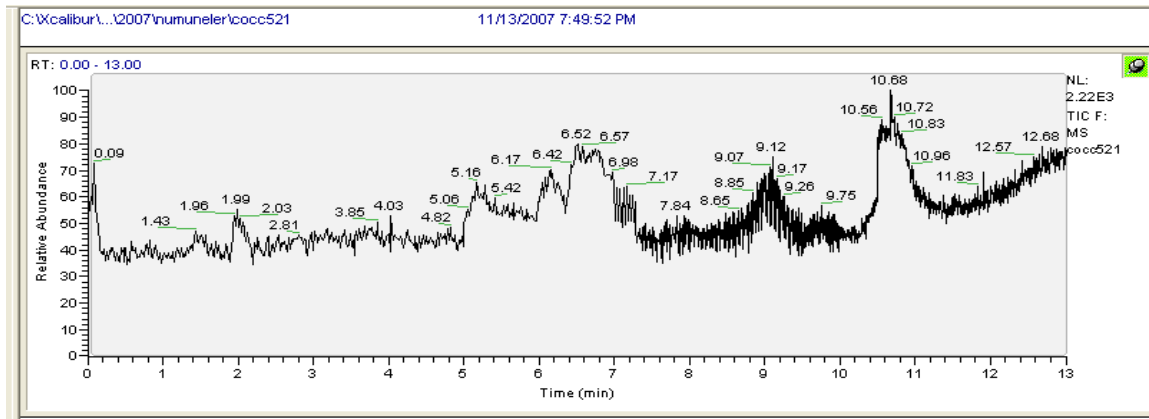
Yumurta analizlerinde ekstraksiyonda doku solvent oranlarında kirliliğin azaltılması amacıyla kullanılan Na_2SO_4 tüplere ilave edildiğinde özellikle yumurtanın jeloz kıvamda olması nedeniyle katılaşma meydana geldiğinden yumurta ekstraksiyonunda Na_2SO_4 kullanılmadan yerine organik çözücülerin oranları düzenlenerek likit-likit ekstraksiyona (LLE) gidildi. Bunda amaç kirliliklerin önlenmesi olduğundan yönteme negatif katkısı olmayacağı aynı viyolden alınan örneklerden bir kısmında sodyum sülfat kullanmamak şeklinde karşılaştırmalı analize alındığında daha iyi şart ve değerler elde edildiğinden kullanılmamasının uygun olacağına literatür ışığında karar verildi. Aksi halde aşırı katılaşmadan çalışma ekipmanlarından ayrıştırılması, santrifüjü gibi hem analiz proseslerini hemde numune miktarının fazla oluşu ve amaca uygun olmaması gibi yöntem/hedef aşamalarını ciddi anlamda sorunlu hale getirdiğinden bırakılmasında sakınca görülmedi.

Yukarıda belirtilen yöntem ile PVKAE'de analize aldığımız 150 (yüzelli) adet yumurtadan Salinomisin ve Lasalosit için hesaplanabilir ölçülerimiz içerisinde herhangi bir kalıntıya rastlanmadı.

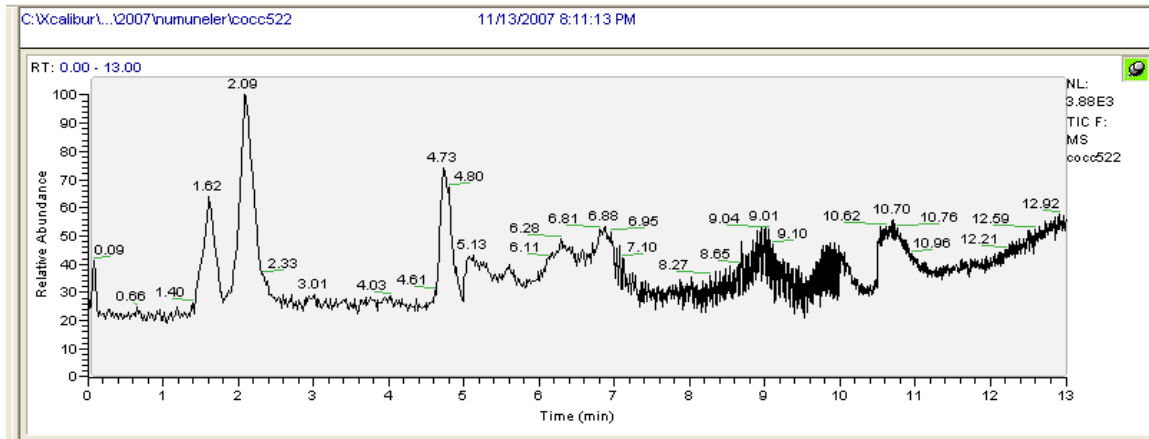
Yine broiler etinden mix olarak (but + göğüs) hazırlanan karışımlardan da kendi yöntem ve tarama şartlarımızda negatif sonuç alındı. Örnekleri şekil 4. 1, 4. 2, 4. 3.'te verildi.



Şekil: 4.1. Piyasa araştırması negatif bulgu (Örnek No: 18)



Şekil: 4.2. Piyasa araştırması negatif bulgu (Örnek No: 20)



Şekil: 4.3. Piyasa araştırması negatif bulgu (Örnek No: 21)

Bu; İyonoforların kullanımlarına getirilen yasal ölçütler ve uyulmaması durumunda uygulanacak yaptırımların kabulünden hemen sonraya denk geldiğinden ilgili resmi kurumların uyarısının yanı sıra verilmiş itibariyle lasalositin daha az kullanılması, salinomisinin ise fazla kullanılmasına rağmen arınma aralığına dikkat edildiği şeklinde yorumlandı. Salinomisin; molekül karakteri ve kinetiği gereği metabolizmasının ilk geçiş etkisinden daha fazla etkilenmesi ve degradasyon hızının yüksek oluşu da nedenler arasında addedildi.

Broilerlerde antikoksidiyaller metaflaktik kullanımlarının yanısıra zooteknik olarak da verim arttırıcı, yemden yararlanmayı yükseltici bir başka ifade ile yemin ete dönüşüm oranını pozitif yönde değiştiren olarak kullanılan lasalosit ve salinomisin için yedirme denemeleri süresince yem tüketiminde salinomisinde daha fazla olmak üzere her iki grupta da artış gözlemlendi. Bu; gözlem sonuçlarının kalitatif olması literatür olarak verilen ve amaç dışında olduğu için verilmemiş zooteknik ve parazitolojik araştırmalar ile paralel meydana geldi (10,11,41,58).

Kesimin 1., 3., 5., 7., günlerde yapılması hem ekstraksiyon periyodu hemde yapılagelen otoriter uygulamalarla paralellik arzemesi sağlanmış oldu (5,10). Negatif sıcaklık etkisi dışında diğer ısı işlemler için ayrıca bekletmeye gerek görülmedi.

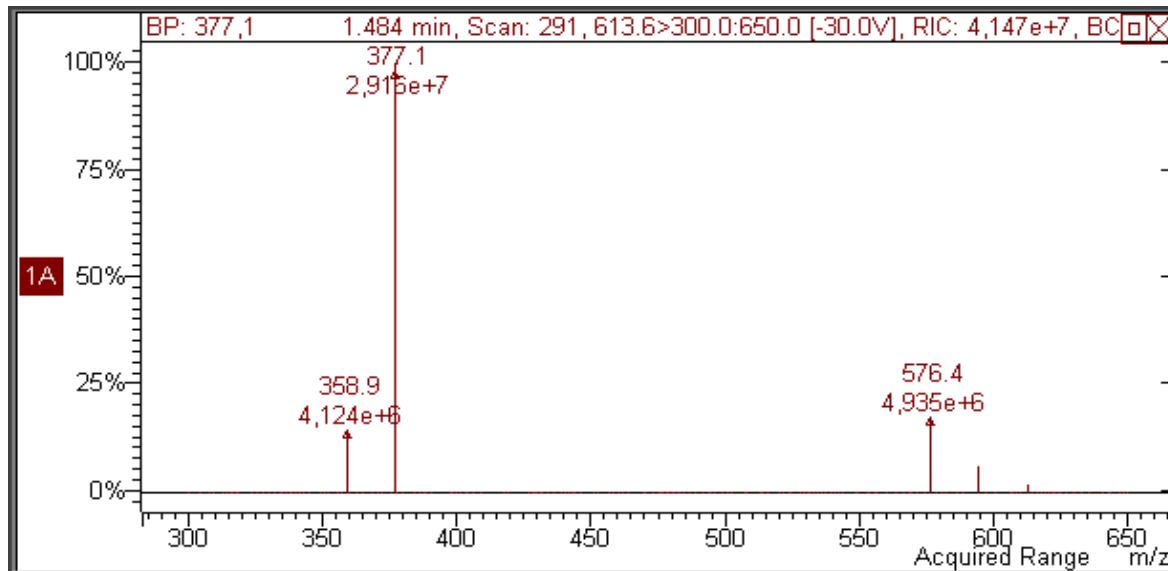
Lasalosit ve salinomisinin yapılan tespit düzeyi çalışmaları, geri kazanım ve validasyon işlemleri sonrasında 1ppb karar noktasına rahatlıkla inilebildiği bunun da EFSA, EMEA ve ulusal verilerle paralel olduğu görüldü. (5,9) Her ne kadar verilmiş örneklerdeki gibi ppt düzeyine yaklaşan tespitleri mümkünse de validasyon tespiti ve hesaplanabilirliği lasalosit ve salinomisin için eşit olmak üzere sırasıyla 1 ppb ve 2 ppb olarak ifade edilmesi uygun görüldü.

4.1. Lasalosit ve salinomisinin analiz ve doğrulama parametreleri

Lasalosit ve salinomisin için tarama analiz parametreleri				
İyonofor	Tespit Limiti (ppb) (LOD)	Hesaplanabilir Limit (ppb) (LOQ)	Dedektör	Cone Voltajı
Lasalosit	2	4	ESİ(+)	90
Salinomisin	2	5	ESİ(+)	100
Lasalosit ve salinomisin için doğrulama analiz parametreleri				
Lasalosit	1	2	ESİ(+)	30
Salinomisin	1	2	ESİ(+)	40

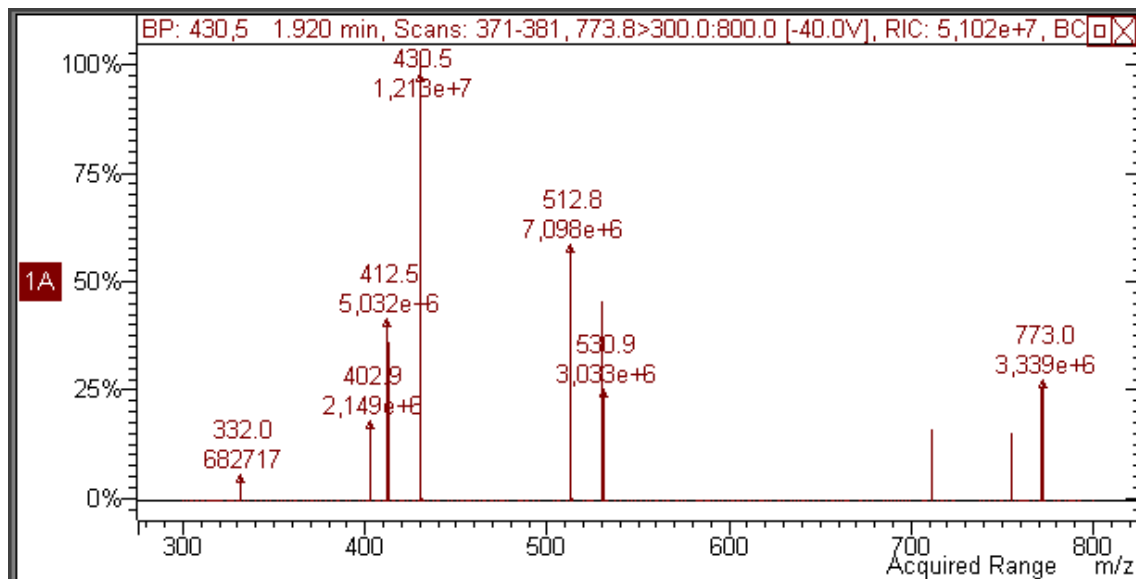
Tablo 4.1. Lasalosit ve salinomisinin analiz ve doğrulama parametreleri

Lasalosit LC-MS/MS Spektrumu:



Şekil 4.4. Lasalosit LC-MS/MS Spektrumu

Salinomisin LC-MS/MS Spektrumu:

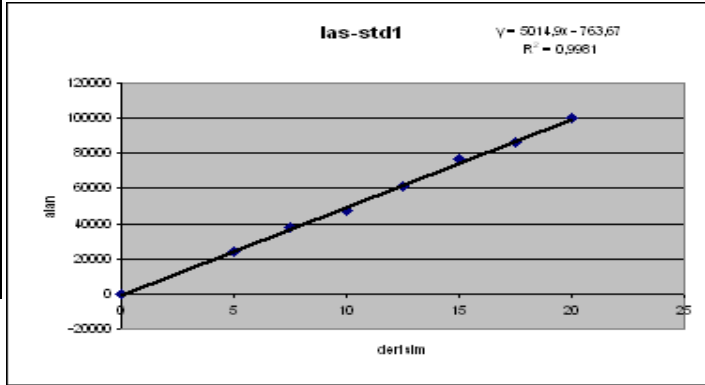


Şekil 4.5. Salinomisinin LC-MS/MS Spektrumu

4.2.Lasalosit ve salinomisin standart uygulamaları:

Lasalosit standart seri-1

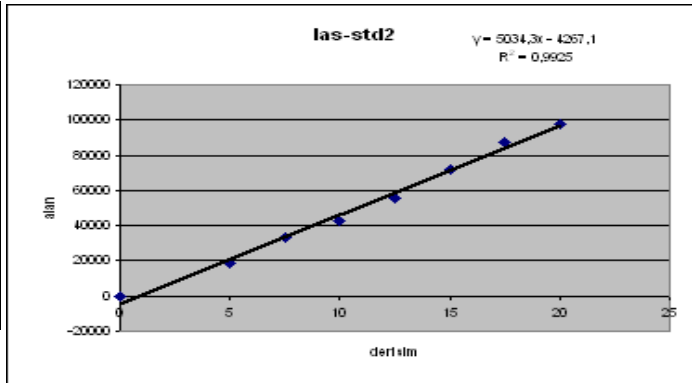
derisim	alan ort.
0	0
5	23876
7,5	37744
10	47023,5
12,5	60993
15	76924,5
17,5	86328,5
20	99807



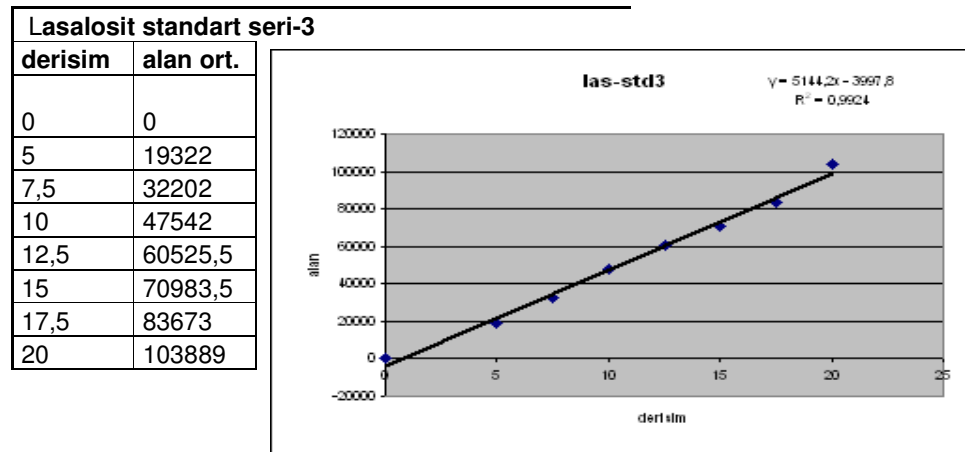
Tablo 4. 2. Lasalosit standart seri -1

Lasalosit standart seri-2

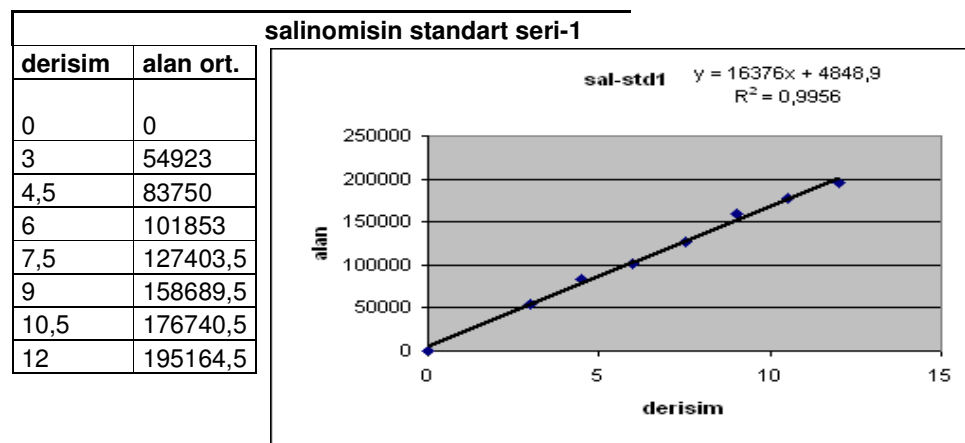
derisim	alan ort.
0	0
5	18563,5
7,5	33355,5
10	42598
12,5	55281
15	71912
17,5	87140
20	97515



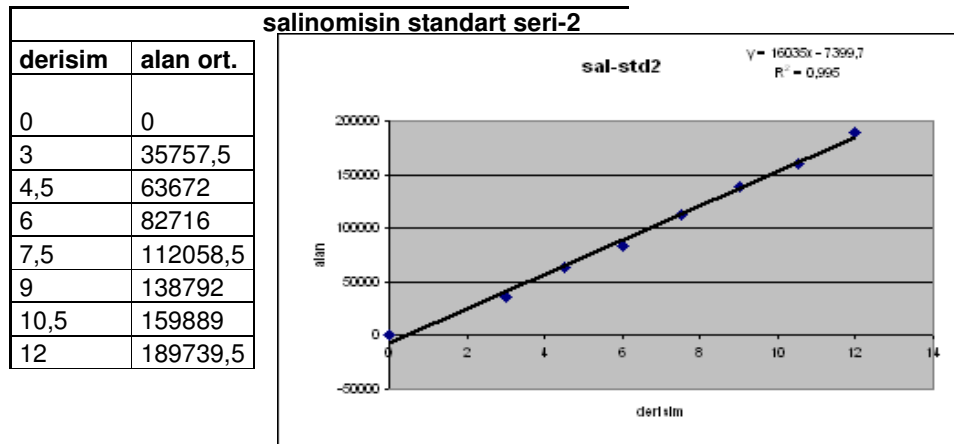
Tablo 4. 3.Lasalosit standart seri -2



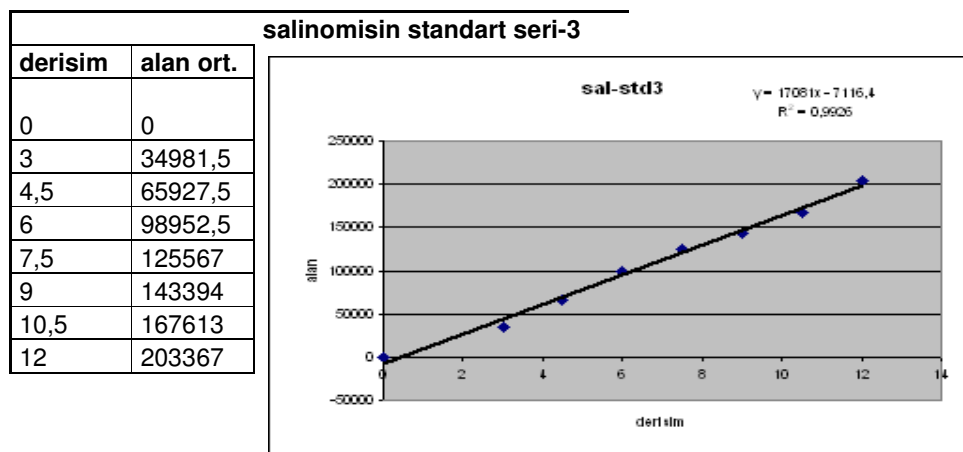
Tablo 4. 4. Lasalosit standart seri -3



Tablo 4. 5. Salinomisint standart seri -1



Tablo 4. 6. Salinomisint standart seri -2



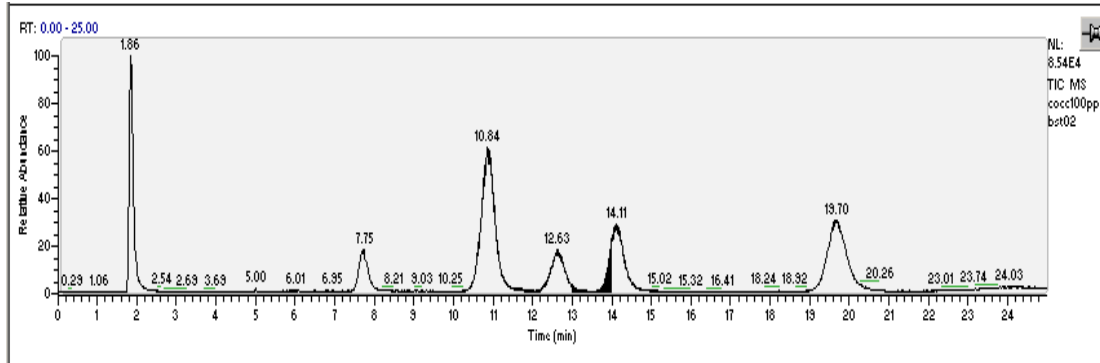
Tablo 4. 7. Salinomisint standart seri -3

		Alanlar						
Madde	Enjeksiyon	TL	1.5TL	2TL	2.5TL	3TL	3.5TL	4TL
Lasolasid	1	18532	34561	42694	52559	72323	89488	98937
	2	18595	32150	42502	58003	71501	84792	96093
Salinomisin	1	35253	66488	82559	113887	138054	159681	184683
	2	36262	60856	82873	110230	139530	160097	194796
		Alanlar						
Madde	Enjeksiyon	TL	1.5TL	2TL	2.5TL	3TL	3.5TL	4TL
Lasolasid	1	20110	32836	47414	59798	71198	80843	104235
	2	18534	31568	47670	61253	70769	86503	103543
Salinomisin	1	35767	67920	96502	125200	138706	165715	208388
	2	34196	63935	101403	125934	148082	169511	198346

Tablo 4. 8. Lasalosit ve salinomisin enjeksiyon/alan tablosu

4.3. Tespit Çalışmaları

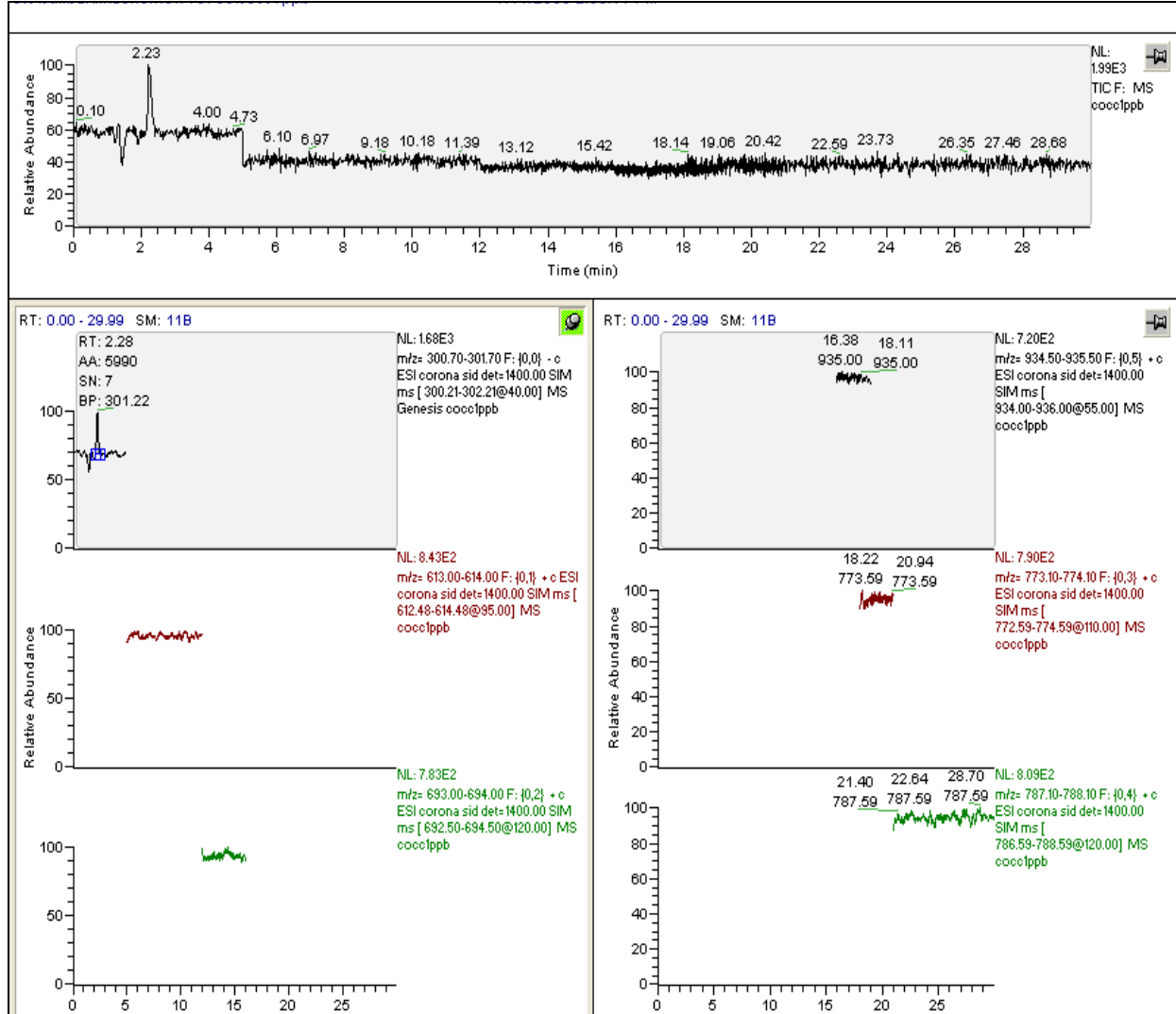
100ppb Mix Standart Kromatogramı



Şekil 4. 6. 100ppb Standart Kromatogram (mix)

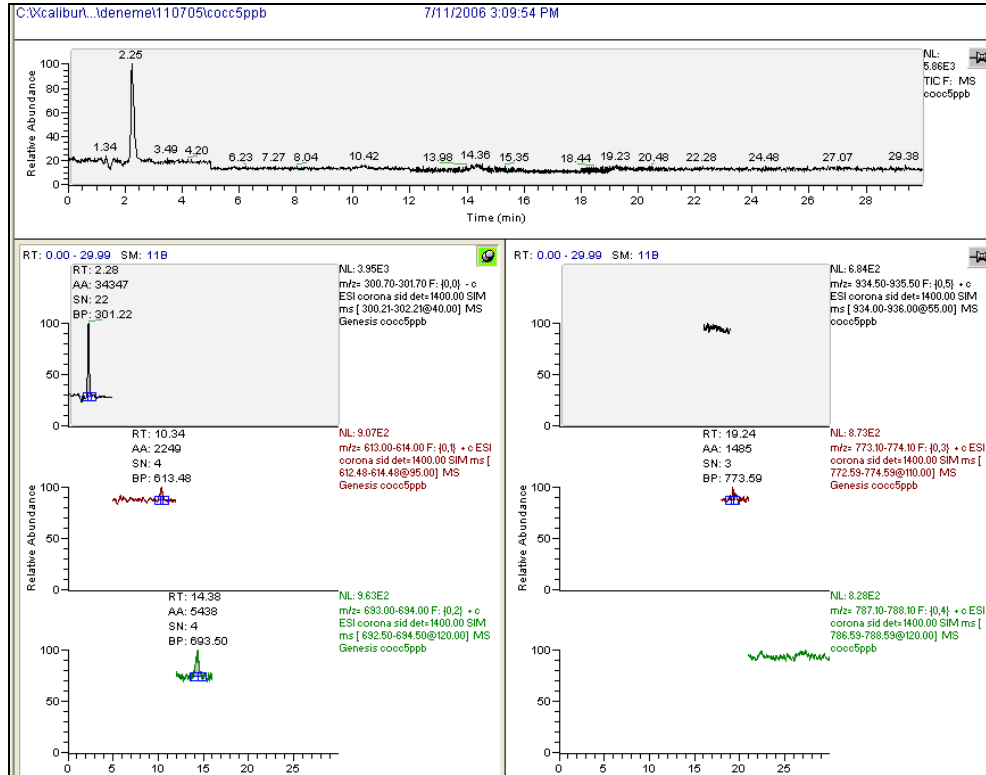
4.4. Antikoksidial İlaçlar İçin LS-MS Tespit Limiti Çalışması

1ng/ml Cocc. Mix. Std.



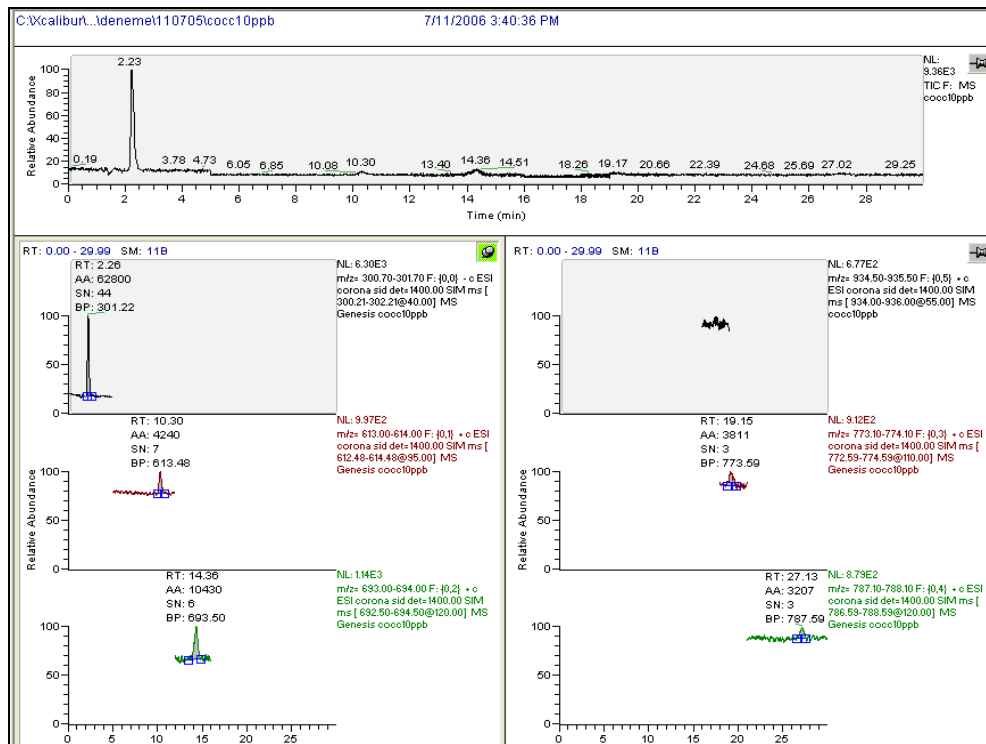
Şekil 4. 7. 1 ng/ml Standart Kromatogram (mix)

5 ng/ml Cocc Mix. Std.



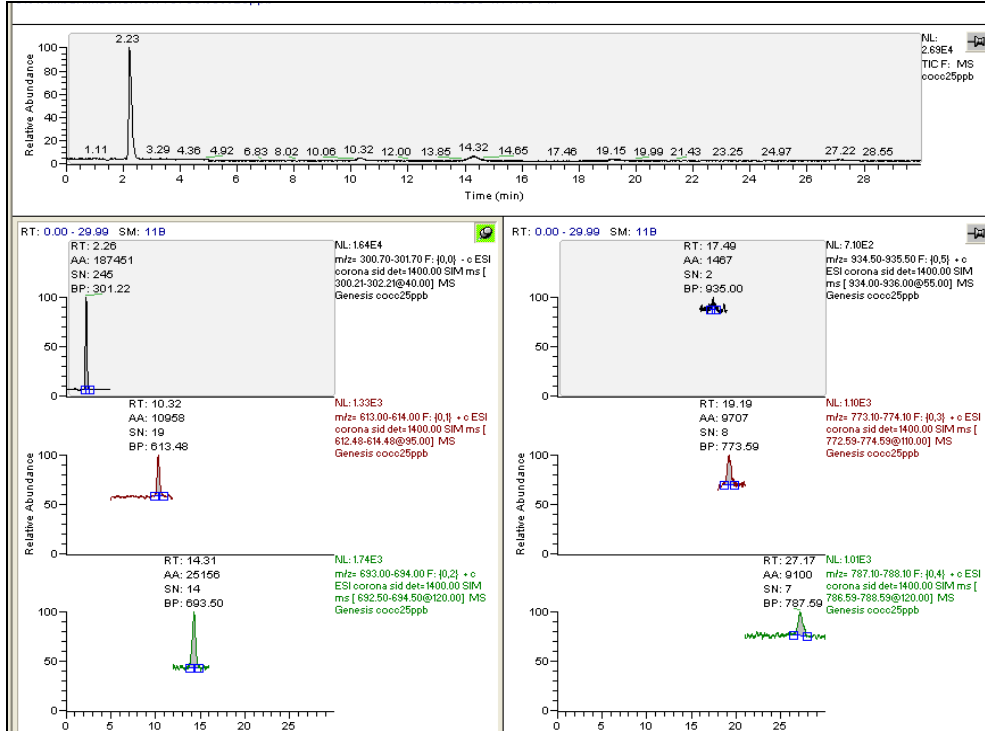
Şekil 4. 8. 5ng/ml Standart Kromatogram (mix)

10 ng/ml Cocc Mix. Std.



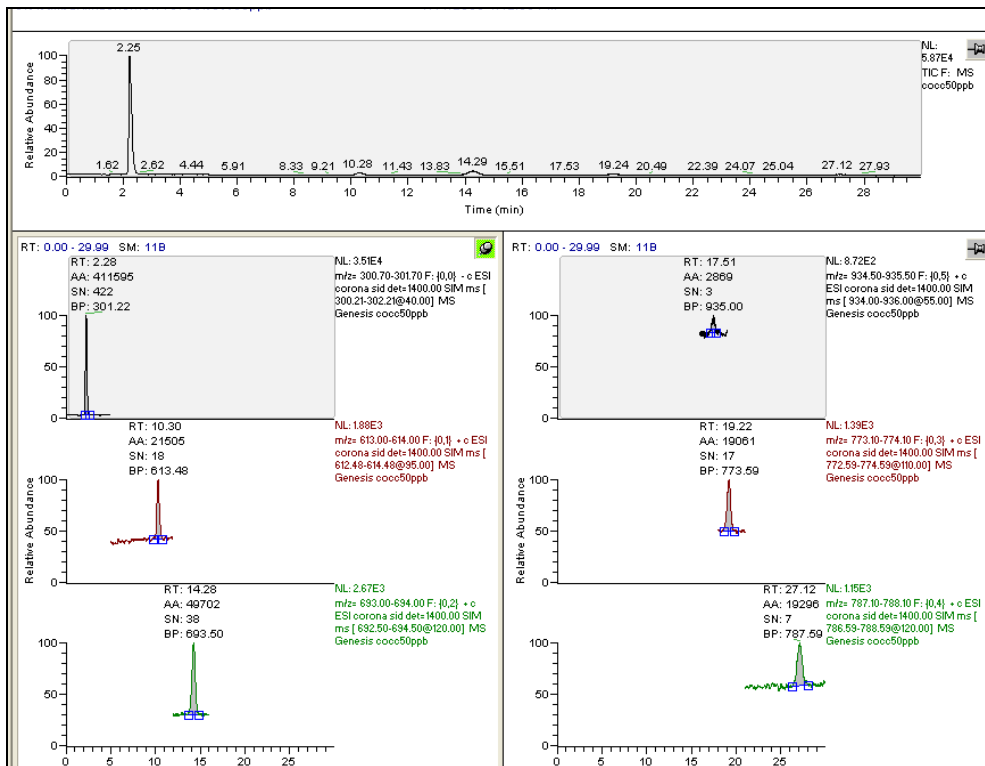
Şekil 4. 9. 10 ng/ml Standart Kromatogram (mix)

25 ng/ml Cocc. Std.



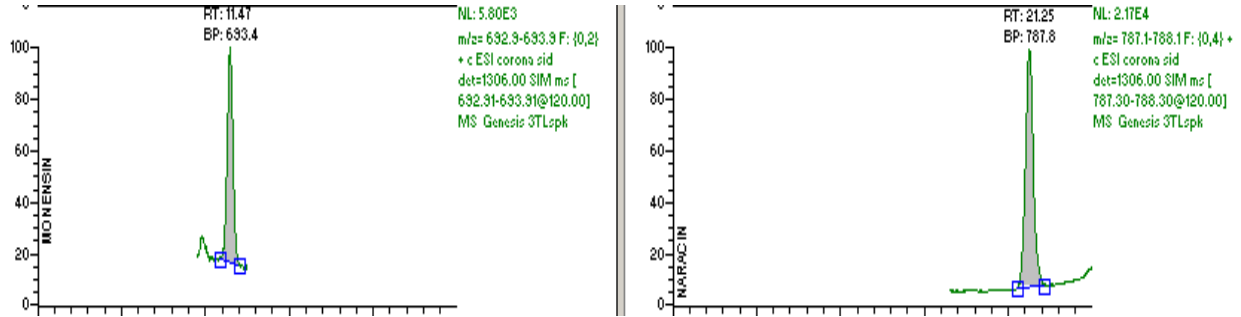
Şekil 4. 10. 25ng/ml Standart Kromatogram (mix)

50ng/ml Cocc Std



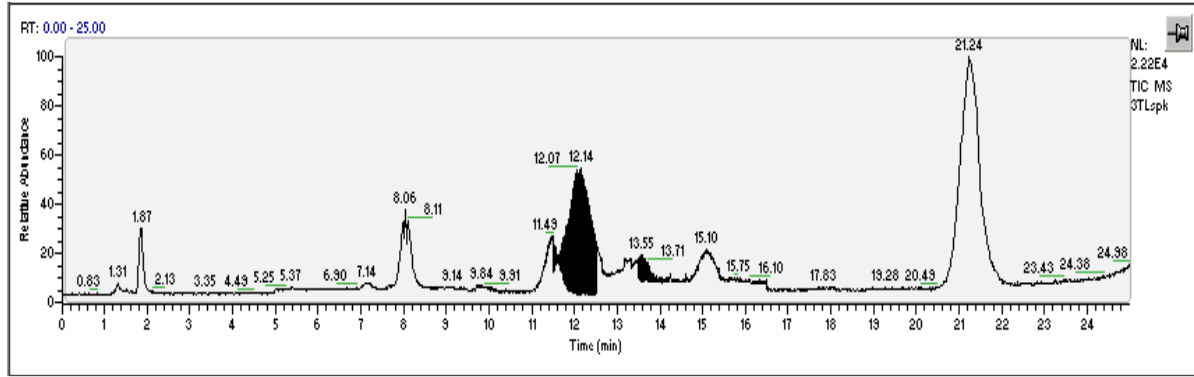
Şekil 4. 11. 50 ng/ml Standart Kromatogram (mix)

100ppb Mix Standart Kromatogramı



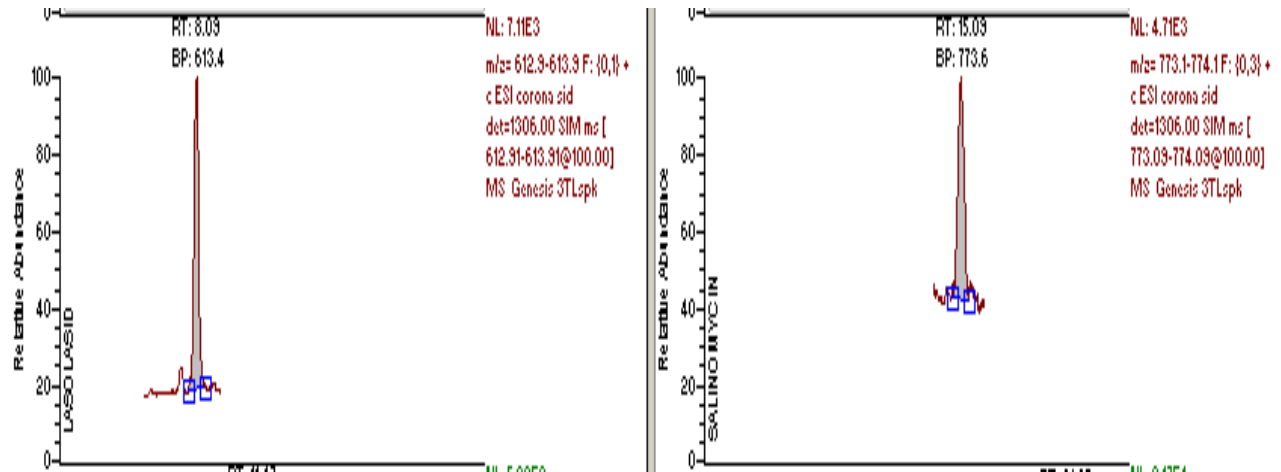
Şekil 4. 12. 100ppb Standart Kromotogram (mix)

Spike yapılmış doku kromatogramı tespit limiti



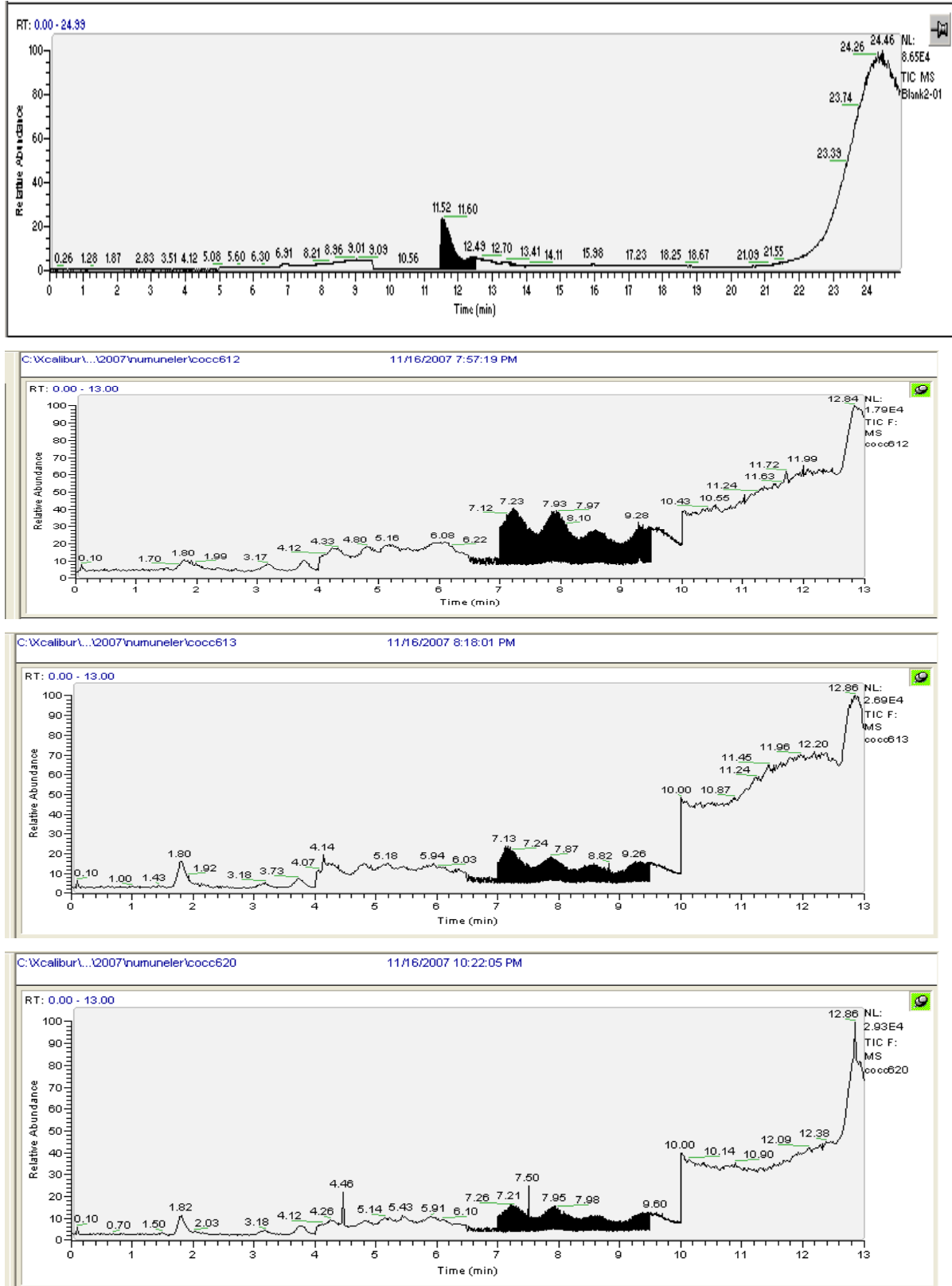
Şekil 4. 13. Doku kromatogramı tespit limiti

Lasalosit ve Salinomisin Kromatogramları



Şekil 4. 14. Lasalosit ve salinomisin doku kromatogramı

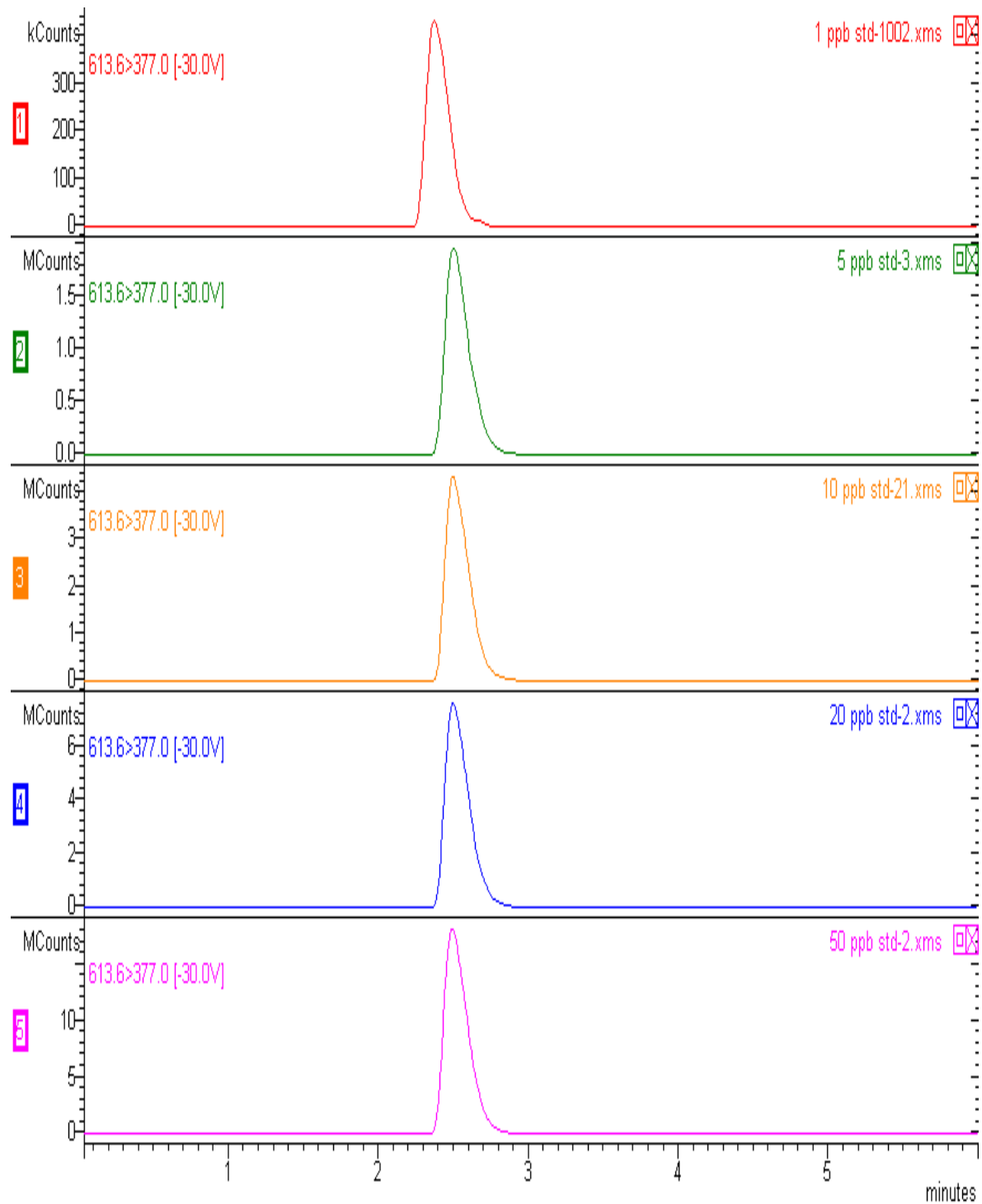
Blank Doku Kromatogramları



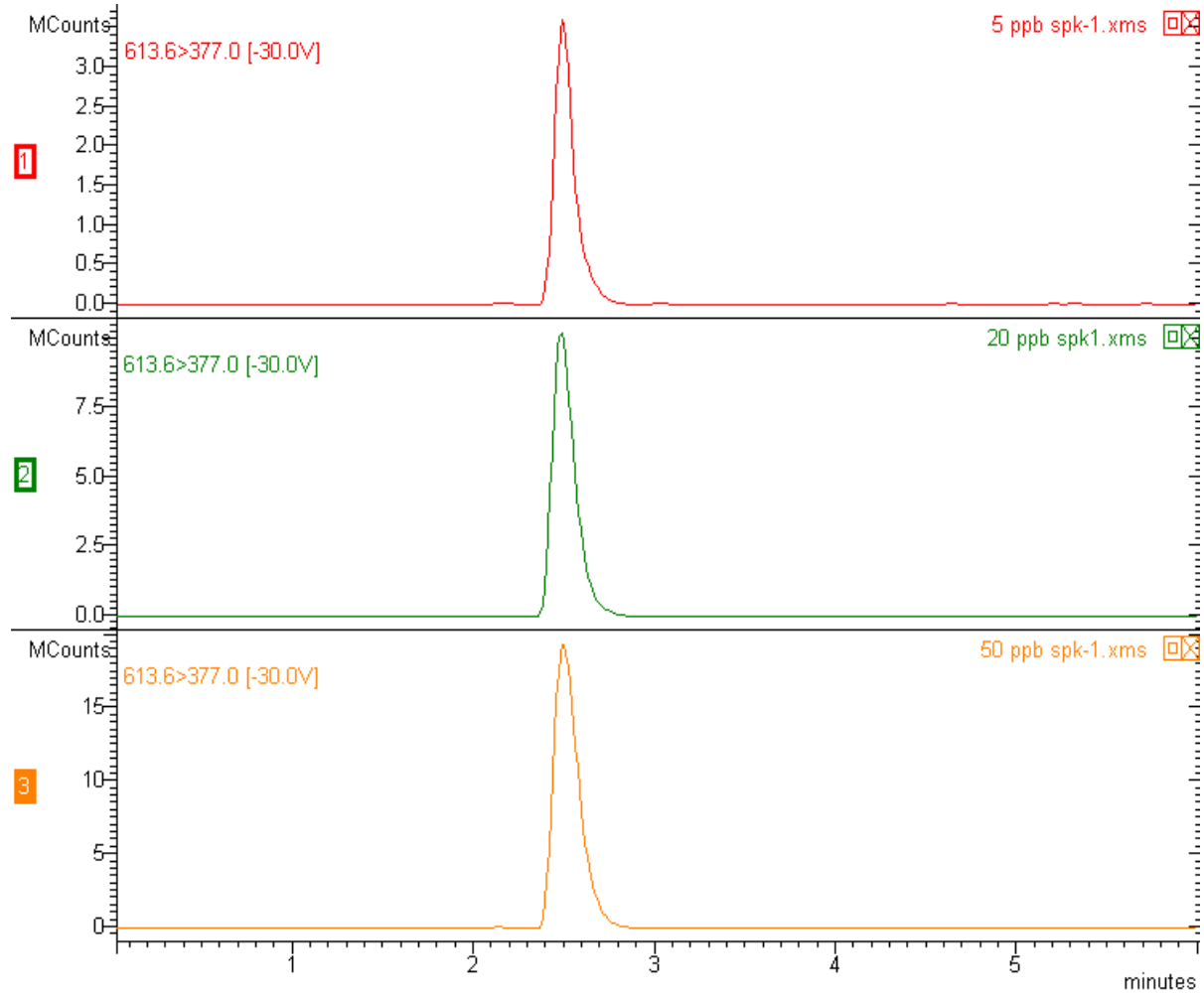
Şekil 4. 15. Blank doku kromatogramları (Sırasıyla control 1,2,3,5)

4.5.Linearite

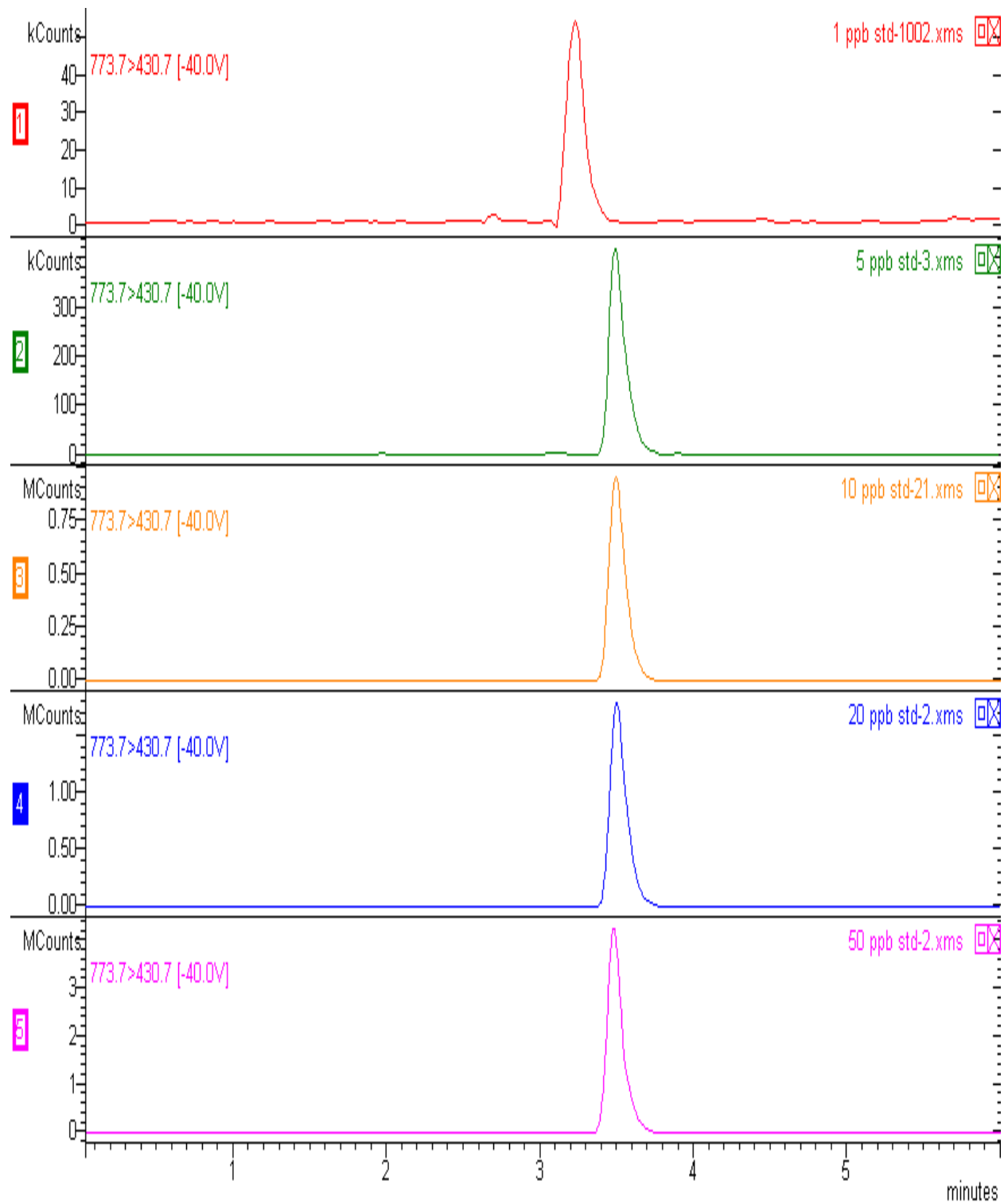
4.5.1.Lasalosit Linearitesi



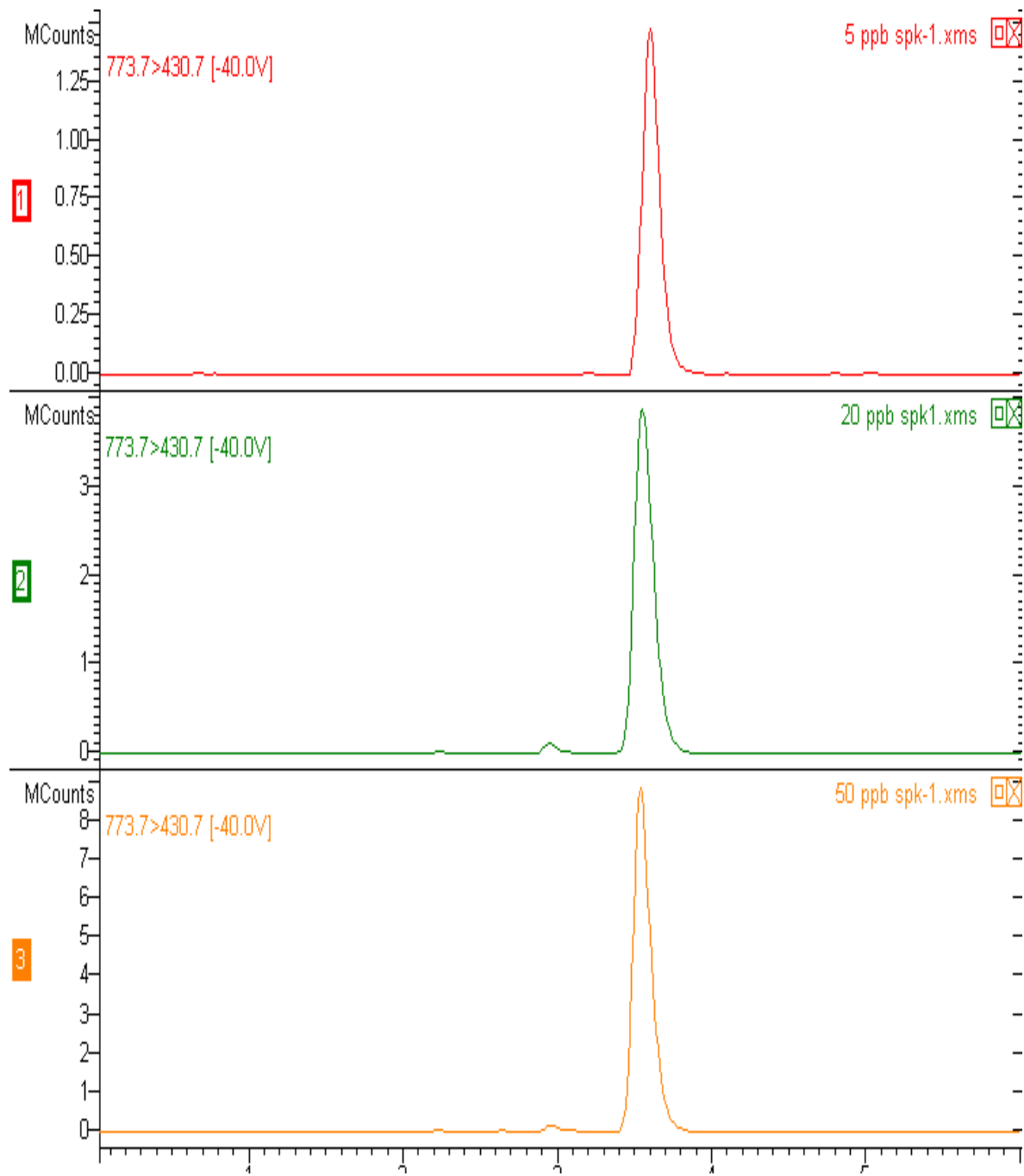
Şekil 4. 16. Lasalosit linearitesi (kCount ve MCount/dakika)

Spike yapılmış dokulardan elde edilen Lasalosit kromatogramı.**Şekil 4. 17. Lasalosit spike doku kromatogramı (kCount ve MCount/dakika)**

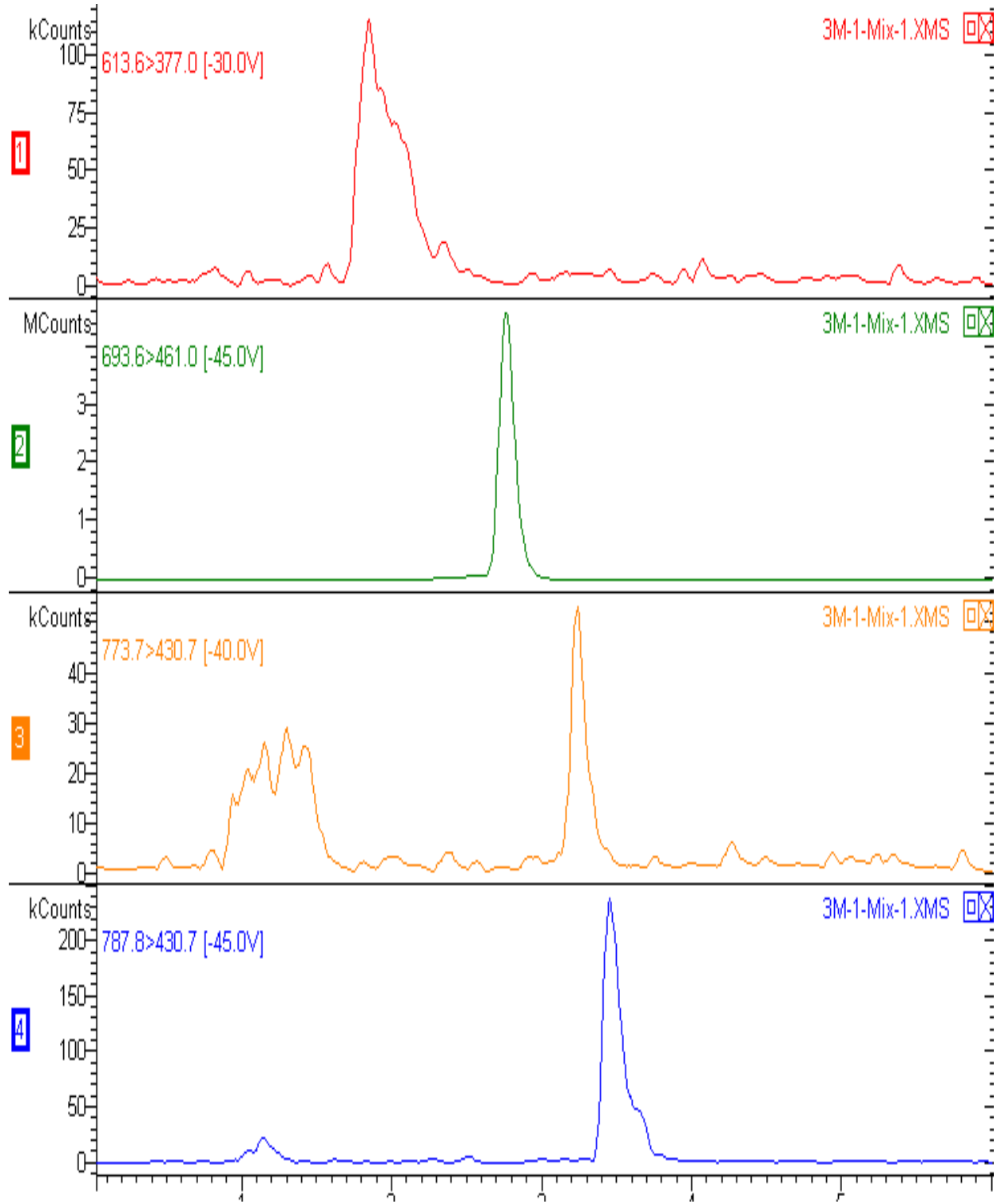
4.5.2. Salinomisin Linearitesi



Şekil 4. 18. Salinomisin linearitesi (kCount ve MCount/dakika)

Spike yapılmış dokulardan elde edilen Salinomisin kromatogramı.**Şekil 4. 19. Salinomisin spike doku kromatogramı (kCount ve MCount/dakika)**

4.5.3. Örnek Numune kromatogramları:



Şekil 4. 20. Örnek numune mix. Kromatogramı (kCount ve MCount/dakika)

Standart enjeksiyonlardan sonra elde edilen geri kazanım lasalosit ve salinomisinde sırasıyla %98, %90 oldu. Bu yüksek değerlere ulaşılma nedeni lasalosit için çift değerli iyonları bağlama kapasitesi, kaybın daha az şekillenmesi ile makinaların yüksek performansta çalışabilmeleri, salinomisin için ise; son kriterin yanısıra özgün yapısının metotla iyi sonuç vermesine bağlandı **(3,31,51)**. Bu; 2000 yılından sonra yapılmış EMEA ve EFSA'nın da referans aldığı çalışmalardaki aynı dikkat ve titizlikle tarafımızdan da taranarak uygulanması şeklinde sağlandı. Lasalosit için EMEA tarafından MRL kas, deri+yağ, karaciğer, böbrek ve yumurtada sırasıyla 20, 100, 100, 50, 150 µg/kg olarak verilmiş ve ulusal mevzuatımızda da aynı oranlar aynı dokular için aynen alınmış ve kabul edilmiştir.

Ulusal otorite PVKAE'nin yapacağı izlemeyi LC-MS ile doğrulamayı ise LC-MS-MS ile tesbit seviyesini ikisinde eşit olmak üzere 10 µg/kg ve doğrulama seviyesini ise her iki madde için eşit olmak üzere 2 µg/kg ile yasal olarak düzenlemiş ve karar limiti olarak salinomisin için varlığının te'yidini yeterli görürken lasalosit için >20 µg/kg olmasını kararlaştırmıştır **(3,4)** Bu ulusal ve AB yasal mevzuatının yanısıra kullanımı devam edegelen lasalosit ve salinomisinde dahil olduğu karboksilik iyonoforlar için kullanım ve arınma parametreleri hususunda ülkemizde herhangi bir saha taramasına rastlanmadı. Bu sayılanların ışığında lasalosit ve salinomisinde içinde bulunduğu karboksilik iyonoforların mevcut kullanımları, yapıları, direnç oluşturma periyotlarının uzunluğu, koksidi etkenlerine etkin ve özgün etkimelerinden ötürü kullanımlarının devam edeceği kanaati tarafımızdan da benimsendi **(31)**. Lasalosit ve salinomisinin yapılan LC-MS tespit ve LC-MS/MS doğrulama analizleri sonucunda alınan analiz örneklerinden birkaç adedi aşağıda verilmiştir. Verilen analiz raporları günlere bölünerek ortalama ideal olan, aynı grup örnekleri temsil edebilen, analizlerden sadece birer adedi konuldu. Bu örnek analizler 1., 3., 5. ve 7. günlerden birer adet olmak üzere alınarak karboksilik iyonoforun düzeyi, günlere göre azalma durumu ve düşüş trendi hakkında bilgi vermesi açısından son derece çarpıcı oldukları düşünüldü. Burada lasalosit çok daha yüksek seviyelerde bulunabilme eğilimine karşın salinomisinin daha düşük düzeyde bulunduğu tespit edildi. Analiz örnekleri 7. günü raporları tespit ve doğrulama limitlerimizin çok altında olup büyük çoğunluğu da tespit edilemez düzeyde gerçekleşti.

Lasalosit ve salinomisinin broyler mix dokusunda 1-7. günler arasında bulunma örneklerinden aşağıya çıkarılmıştır. Örneklerde 1., 3., 5. ve 7. günler arasındaki rezidüel varlığın zamana bağlı azalma seyri ve tespit edilebilen çok küçük miktarları açısından önemli olduğu değerlendirildi.

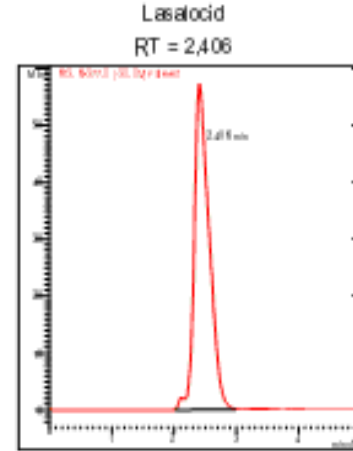
4.6.Lasalosit LC-MS Analiz örnekleri:

Örnek 1. 1. Gün kesimi örneği (İlk kesim sonrası örnek olmasından ötürü değerin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.)

Analiz Raporu

Sample Name: 1L1 Mix-1 Acquisition Date: 03.01.2008 02:25:25
 Operator Name: Analist Inst. Method: C:\TandemGold\method\sic\occtest.mth
 Data File Name: c:\tandemgold\data\occcs- Last Calibration: 02.01.2008 19:32:26

Compound Name	IS	RT	Quan Ions	Area	Amount	Units
Lasalocid	1	2,406	RIC	9,552E8	264,656	ppb



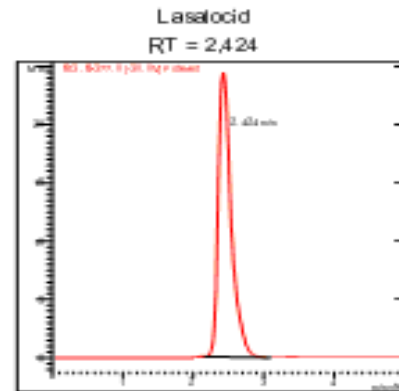
Şekil 4. 21. Lasalosit 1. kesim örneği

Örnek 2. 3.Gün kesimi örneği (Kalıntı miktarının 3. güne hızla azalarak düştüğü ve 1. güne karşılaştırılmasının önemli olduğu açık şekilde görülmektedir.)

Analiz Raporu

Sample Name: 2L2 Mix-1 Acquisition Date: 03.01.2008 04:35:47
 Operator Name: Analist Inst. Method: C:\TandemGold\method\sic\occtest.mth
 Data File Name: c:\tandemgold\data\occcs- Last Calibration: 02.01.2008 19:32:26

Compound Name	IS	RT	Quan Ions	Area	Amount	Units
Lasalocid	1	2,424	RIC	3,139E8	86,969	ppb



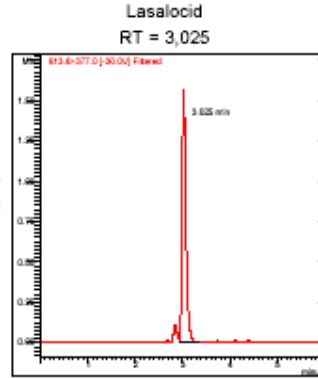
Şekil 4. 22. Lasalosit 3. kesim örneği

Örnek 3. 5.Gün kesimi örneği (Bu şekilde zorunlu bekleme süresi sonunda kalıntı miktarının kabul edilebilir düzeye indiği açıktır.)

Analiz Raporu

Sample Name: 6 L MIX 1 Acquisition Date: 04.01.2008 02:05:08
 Operator Name: Zivak Inst. Method: C:\TandemGold\methods\Coccidiostats ionophore.mth
 Data File Name: c:\tandemgold\data\coccid- Last Calibration: 03.01.2008 18:55:22

Compound Name	IS	RT	Quan Ions	Area	Amount	Units
Lasalocid	1	3,025	RIC	8,520E6	7,672	ppb



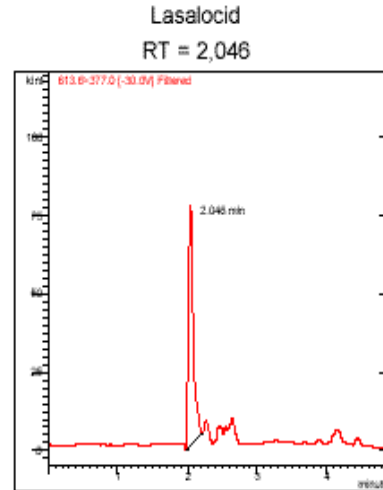
Şekil 4. 23. Lasalosit 5. kesim örneği

Örnek 4. 7.Gün kesimi örneği (Kalıntı düzeyi özenle sadece tespit edilebilir düzededir.)

Analiz Raporu

Sample Name: 7 L1 Mix2 Acquisition Date: 30.12.2007 18:34:23
 Operator Name: Analist Inst. Method: C:\TandemGold\methods\coccstest.mth
 Data File Name: c:\tandemgold\data\coccs- Last Calibration: 30.12.2007 17:50:48

Compound Name	IS	RT	Quan Ions	Area	Amount	Units
Lasalocid	1	2,046	RIC	372471	0,087	ppb



Şekil 4. 24. Lasalosit 7. kesim örneği

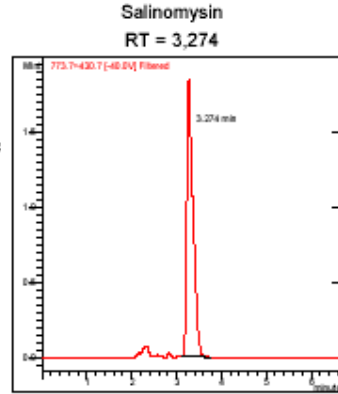
4.7. Salinomisin LC-MS Analiz örnekleri

Örnek 1. 1. Gün kesimi örneği (İlk kesim sonrası örneği değerin son derece yüksek olduğu görülmektedir.)

Analiz Raporu

Sample Name: 1 S1 Mix2 Acquisition Date: 30.12.2007 22:55:31
 Operator Name: Analist Inst. Method: C:\TandemGold\methods\coccstest.mth
 Data File Name: c:\tandemgold\data\coccs- Last Calibration: 30.12.2007
 17:50:48

Compound Name	IS	RT	Quan Ions	Area	Amount	Units
Salinomysin	3	3,274	RIC	1,743E7	38,234	ppb



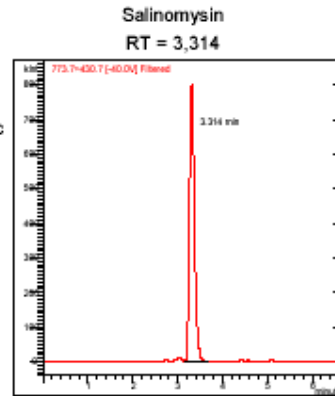
Şekil 4. 25. Salinomisin 1. kesim örneği

Örnek 2. 3. Gün kesimi örneği (Kalıntı miktarının 3. güne hızla azalarak düştüğü ve 1. günle karşılaştırılmasının önemli olduğu açık şekilde görülmektedir.)

Analiz Raporu

Sample Name: 3 S1 Mix2 Acquisition Date: 30.12.2007 20:45:07
 Operator Name: Analist Inst. Method: C:\TandemGold\methods\coccstest.mth
 Data File Name: c:\tandemgold\data\coccs- Last Calibration: 30.12.2007
 17:50:48

Compound Name	IS	RT	Quan Ions	Area	Amount	Units
Salinomysin	3	3,314	RIC	6,158E6	13,509	ppb



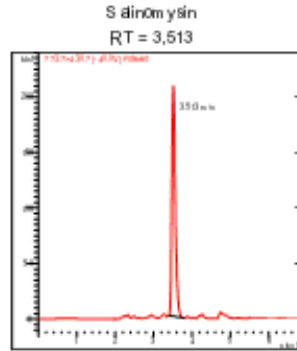
Şekil 4. 26. Salinomisin 3. kesim örneği

Örnek 3. 5. Gün kesimi örneği (Zorunlu bekleme süresi sonunda kalıntı miktarının son derece azalmış olduğu açıktır.)

Analiz Raporu

Sample Name: 2 S2 Mix-1 Acquisition Date: 03.01.2008 06:46:05
 Operator Name: Analist Inst. Method: C:\TandemGold\method\coccistat.mth
 Data File Name: c:\tandemgold\data\coccistat- Last Calibration: 02.01.2008 19:32:26

Compound Name	IS	RT	Quan Ions	Area	Amount	Units
Salinomycin	3	3,513	RIC	1,288E6	5,392	ppb



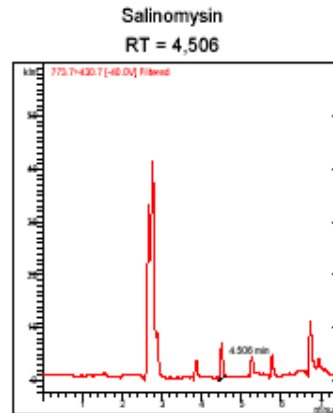
Şekil 4. 27. Salinomisin 5. kesim örneği

Örnek 4. 7. Gün kesimi örneği (Sadece hassasiyetle tespit edilebilir kalıntı mevcuttur.)

Analiz Raporu

Sample Name: 5 S MIX 2 Acquisition Date: 04.01.2008 04:24:50
 Operator Name: Zivak Inst. Method: C:\TandemGold\methods\Coccidostat\ionophore.mth
 Data File Name: c:\tandemgold\data\coccid- Last Calibration: 03.01.2008 18:55:22

Compound Name	IS	RT	Quan Ions	Area	Amount	Units
Salinomycin	3	4,506	RIC	29326	0,084	ppb



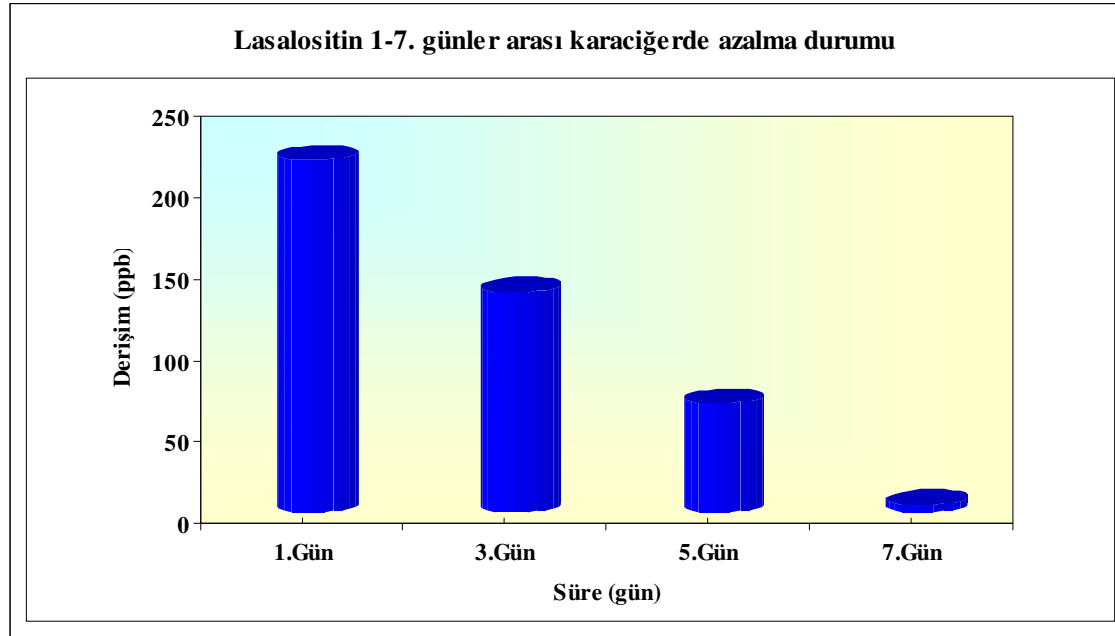
Şekil 4. 28. Salinomisin 7. kesim örneği

Yapılan kesimlerin 1.,3. ve ,5. günlerinde rezidüel miktarın inen doğrusal bir eğim göstermesi, aradaki farklılıkların yüksek oluşu, kinetiğinin; ilk geçiş etkisi ile büyük oranda atılımını sağladığı kalan miktarın ise yapılmış çalışmalara paralel olarak metabolizmada hızla degrade edildiği şeklinde yorumlandı. 7. günde her iki aktif için de tespit sınırlarımızın üzerinde herhangi bir kalıntıya rastlanmazken 5. gün verileri AB otoritesine paralel oldu (9,10,12). Yapılan ısıtma işlemlerinde sırasıyla kızartma, kaynatma ve dondurmada ısıtma her işlemde hem lasalositin hemde salinomisinin yıkımlandığı görüldü. Yıkımlanma lasalositte daha orantılı bir düşüş kaydederken salinomisin yıkımlanması 1-3 günler arası çok hızlı bir seyir izlediğine tanık olundu. Lasalositin atılım bakımından doku konsantrasyonunun salinomisinden daha geç degradasyonu, ısıtma işlemlerinde de kaynatmanın lasalosite oranla salinomisini daha fazla yıkımladığı aşağıda verilen grafiklerden de anlaşılacağı üzere lasalositin daha istikrarlı salinomisinin ise hızlı degrade olma eğilimine sahip olduğuna tanık olundu. Lasalosit ve salinomisinin karaciğer, doku konsantrasyonu ve ısıtma işlemler karşısındaki davranışları grafikler haline dönüştürülerek aşağıda verildi.

4.8.Lasalositin zamana ve ısıtma işlemlere bağlı doku yoğunluğu:

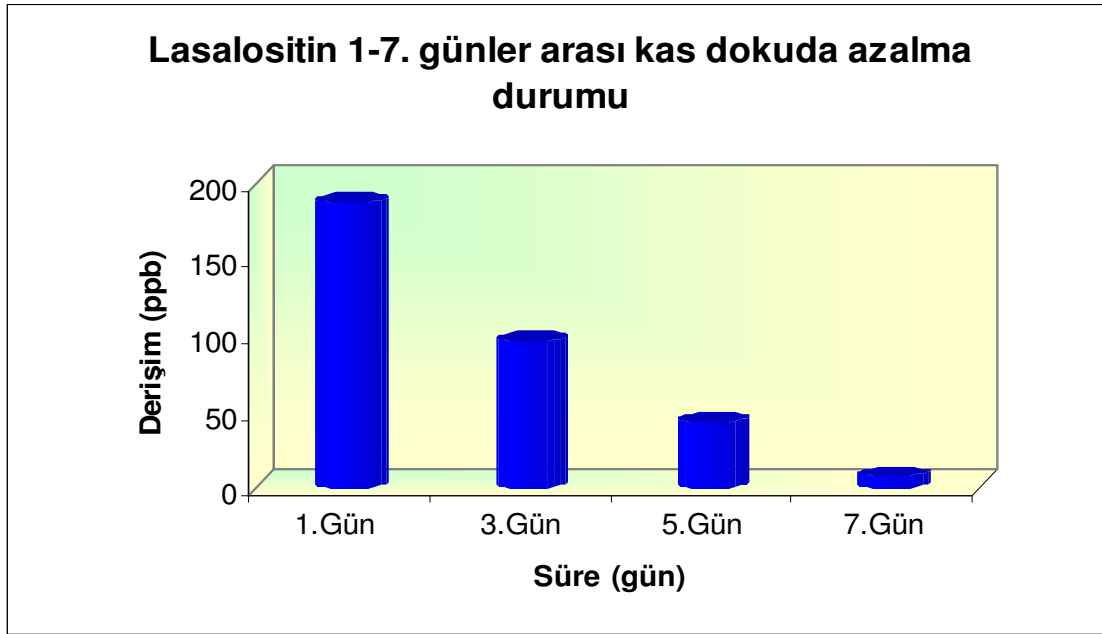
Lasalositin normal doku, karaciğer ve mix doku üzerine ısıtma işlemlerinin lasalosit konsantrasyonunda meydana getirdiği değişim grafiklerle aşağıya çıkarılmıştır.

Karaciğerde lasalositin zamana bağlı değişim konsantrasyonu:



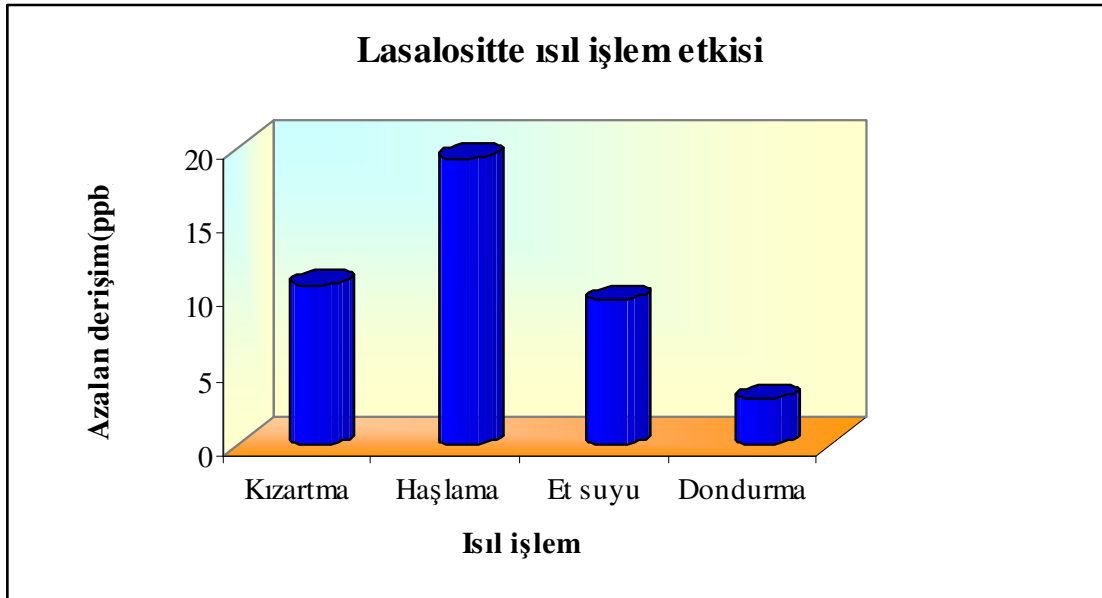
Şekil 4. 29. Karaciğerde lasalositin zamana bağlı değişimi

Mix dokuda lasalositin zamana bağlı değişim konsantrasyonu:



Şekil 4. 30. Doku lasalosit yoğunluğunun zamana bağlı değişimi

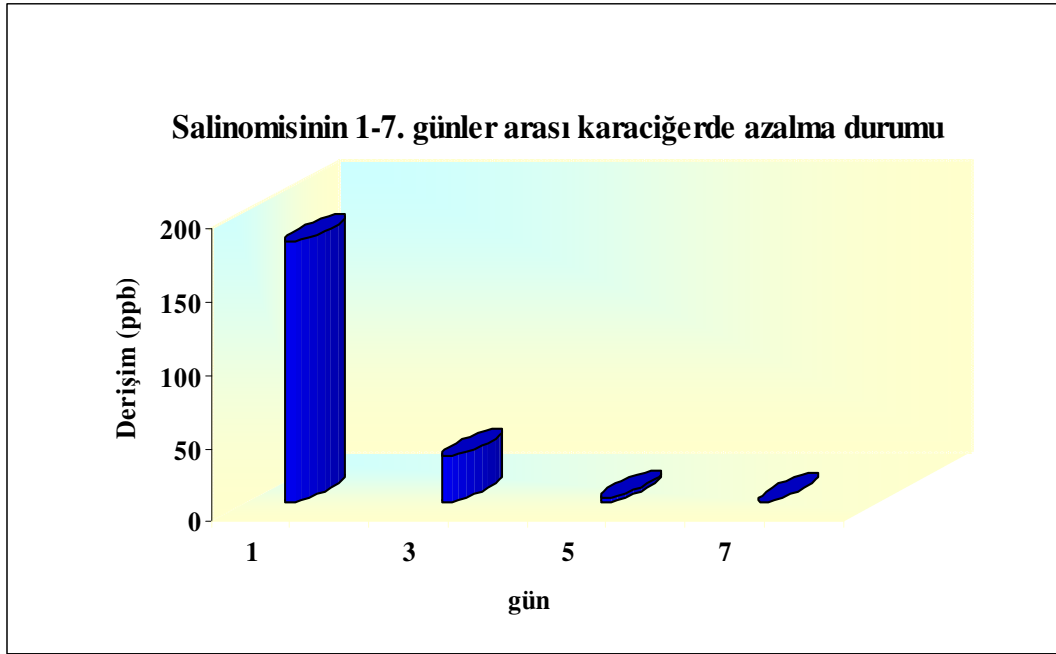
Lasalositte ısıl işlem (kızartma, haşlama ve dondurma) etkisi.



Şekil 4. 31.Lasalositte ısıl işlem etkisinin karşılaştırılması

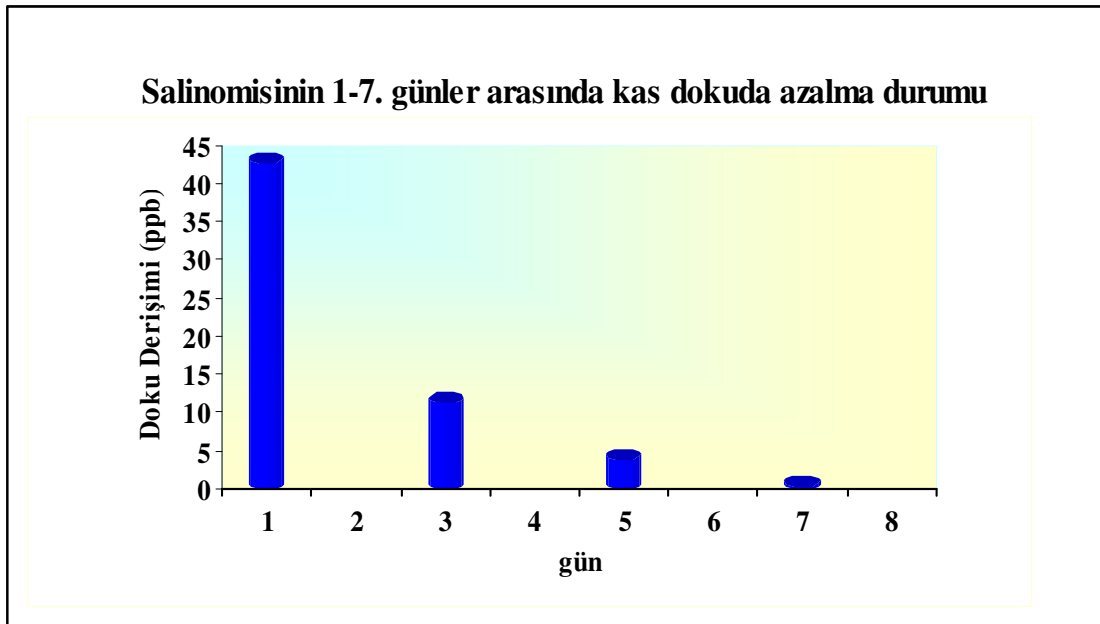
4.9. Salinomisinin zamana ve ısı işlemlere bağlı doku yoğunluğu:

Karaciğerde salinomisin zamana bağlı değişim grafiği



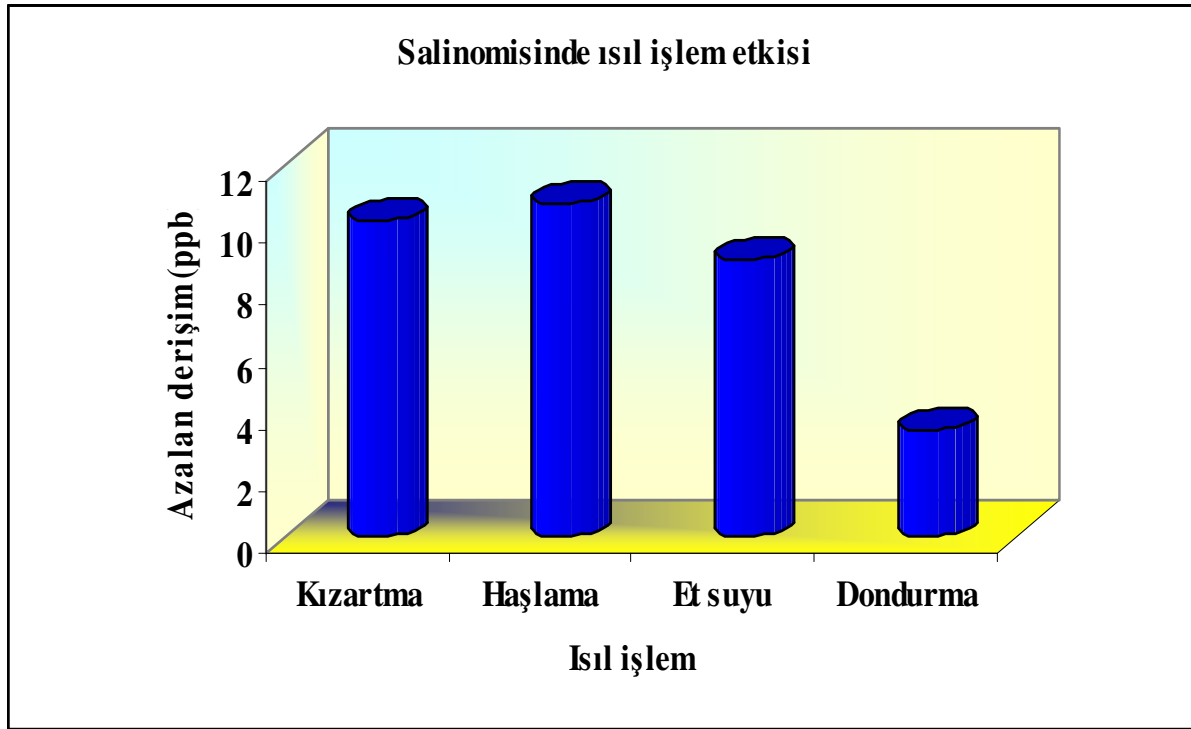
Şekil 4. 32. Karaciğer salinomisin yoğunluğunun zamana bağlı değişimi

Salinomisinin mix dokuda zamana bağlı değişimi



Şekil 4. 33. Doku salinomisin yoğunluğunun zamana bağlı değişimi

Salinomisinde ısıt işlem (kızartma, haşlama ve dondurma) etkisi



Şekil 4. 34. Salinomisinde ısıt işlem etkisi

Lasalosit ve salinomisin içeren doku üzerine ısıt işlem uygulanması şeklinde şu ana kadar her hangi bir literatüre rastlamamamıza karşın bir başka iyonofor olan narasin üzerine yapılan çalışma ile başkaca sülfadimetoksin, sülfakinoksalin, sülfadoksin ve sülfadiazin üzerine yapılan çalışmalarla da uyumlu olduğu, hassasiyet, tesbit limiti, özgünlük bakımından gözlem ve veriler çok daha anlamlı oldu (18,19,27,51).

İyonofor antikoksidiyallerden salinomisin ve lasalosit içeren doku üzerinde ısıt işlem uygulayarak ısı karşısındaki davranışlarına ilişkin Rokka'nın bir başka iyonofor olan narasin üzerinde yapmış olduğu çalışmaya paralellik arzetmekle beraber ısıt işlemlerin iyonofor antikoksidiyallerden salinomisinin daha fazla olmak üzere etkilendiği tespit edildi (51). Buna karşılık doku degradasyonuna ilişkin sonuçlar hem moleküllerin farklılığı hemde analiz metodunun farklılığına bağlı olarak değişim gösterdi. Metod farklılığı ile beraber benzer sonuçlar ısıt işlemlerin iyonoforları belli düzeylerde yıkımladığı ve termo-labil olan iyonoforların etkilenmelerinin düşük ısıdan ziyade yüksek ısıda daha fazla olduğuna tanık olundu.

4.10. Lasalosit spike edilen mix dokuların kızartma, haşlama ve dondurma sonrası kalıntı oranları:

Lasalosit spike dokuların kızartma testi		
No	Konsantrasyon (µg/kg)	Tespit(µg/kg)
1	100	73,487
2	100	106,89
3	100	89,798
4	100	86,696
5	100	81,752
6	100	78,663
7	100	90,504
8	100	93,251
9	100	83,545
10	100	90,41
	Ort. %	87,4996
	Ort. %	87,5
	Recovery %	98
	Reel kzt. Doku mikt.	89,2857
	Kayıp	10,7143

Tablo 4. 9. Lasalosit spike dokuda kızartma etkisi

Lasalosit spike dokuların haşlama testi			
No.	Konsantrasyon (µg/kg)	Tespit (µg/kg)	Et suyu (µg/kg)
1	100	85,42	8,456
2	100	73,25	12,083
3	100	77,7	9,592
4	100	79,87	8,884
5	100	81,04	8,065
6	100	78,66	10,24
7	100	80,69	9,298
8	100	81,36	7,063
9	100	77,25	11,107
10	100	76,42	10,255
	Ort.	79,166	9,5043
	Reel ort. Doku	80,78163	9,698265
	Ort. Haşl. et %	80,78	Et suyu % 9,7
	Recovery %	98	
	Reel haşl. et dokuda kayıp	19,22	
	Et suyuna geçen %	9,7	

Tablo 4. 10. Lasalosit spike dokuda haşlama etkisi

Lasalosit spike dokuların -20°C testi			
No	Konsantrasyon (µg/kg)	Tespit(µg/kg)	
1	100	95.212	
2	100	99.812	
3	100	93.693	
4	100	93.628	
5	100	92.928	
6	100	96.780	
7	100	97.743	
8	100	94.155	
9	100	87.644	
10	100	98.988	
	Ortalama %	95.058	
	Ort. %	95	
	Recovery %	98	
	Reel değer %	96,93877551	96,94
	Reel kayıp %	3,06122449	3,06
	Ortalama		5.0 %
	Dondurma testinde kayıp %		3.06 %
	Normal dokularda Recovery: %		98.0%

Tablo 4. 11. Lasalosit spike dokuda dondurma etkisi

4.11. Salinomisin spike edilen mix dokuların kızartma, haşlama ve dondurma sonrası kalıntı oranları:

Salinomisin spike dokuların kızartma testi		
No	Konsantrasyon (µg/kg)	Tespit (µg/kg)
1	100	87,96
2	100	81,32
3	100	80,27
4	100	79,38
5	100	86,8
6	100	80,25
7	100	82,68
8	100	74,89
9	100	76,1
10	100	77,95
	Ortalama	80,76
	Ort, %	80,76
	Recovery %	90
	Reel kzt. Doku mikt.	89,73
	Kayıp	10,26

Tablo 4. 12. Salinomisin spike dokuda kızartma etkisi

Salinomisin spike dokuların haşlama testi			
	Konsantrasyon($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Et doku($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Et suyu($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	100	85.969	7,47
2	100	69.132	10,13
3	100	85.725	5,31
4	100	75.945	9,24
5	100	71.561	8,28
6	100	83.477	9,25
7	100	75.801	8,32
8	100	80.510	8,78
9	100	79.446	7,93
10	100	76.975	8,16
	Ortalama	78.454	8,287
	Ortalama et doku %	78.45	
	Reel doku kalıntı ort. %	87.17	9.207
	Recovery %	90.00	
	Reel et dokuda kayıp %	12,83	

Tablo 4. 13. Salinomisin spike dokuda haşlama etkisi

Salinomisin spike dokuların - 20 de dondurma testi			
	Konsantrasyon $\mu\text{g}/\text{kg}$	Tespit ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	100	88.632	
2	100	90.140	
3	100	89.059	
4	100	90.121	
5	100	85.745	
6	100	87.056	
7	100	82.390	
8	100	86.048	
9	100	88.190	
10	100	81.203	
	Ortalama %	86.858	
	Ort. %	87	
	Recovery %	90	
	Reel değer %	96,5088	96,5
	Reel kayıp %	3,4911	3,49
	Ortalama		3.5%
	Dondurma testinde kayıp %		3.5 %
	Normal dokularda Recovery: %		90.0%

Tablo 4. 14. Salinomisin spike dokuda dondurma etkisi

Kayıp oranının lasalosit için kızartmada, kaynatmada ve -20°C 'de dondurmada sırasıyla 10.71, 19.26 ve 3.06 ppb miktarlarında ve aynı ölçüt ve sıralamayla yüzde olarak da yine aynı sıraya göre salinomisinde de 10.26, 12.83, 3.5 ppb olduğu görüldü. Bu; SPSS istatistik sisteminde ANOVA analiz ve Duncan hesaplama metoduyla yapılan istatistiklerde lasalosit ve salinomisinde ısıl işlem olarak sırasıyla kızartma, kaynatma ve dondurmadan (-20°C) her üç işlemin de etkisinin istatistiki olarak önemli olduğu görüldü. ($P<0,05$)

Bu veriler ile şu ana kadar karboksilik iyonoforlardan lasalosit ve salinomisinin ısıl işlem karşısındaki tepkilerinin miktar ve oranları ilk defa net ve ölçütlü ortaya konulmuş oldu. Kızartma işleminde dokudaki su kaybından dolayı ağırlık azalmasına bağlı olarak rezidüel değerin yüksek çıkması değerlendirme esnasında doku üzerinden işlem yapılarak olası bir karışıklığa neden olunmadığı gibi amacımız olan sosyal yemek kültürü şeklinde işleme esnasındaki kayıplar hedeflendiğinden amaç dışında da çıkılmadı. Kaynatma ile en yüksek oranda lasalosit ve salinomisin kaybı yaşanırken bunu kızartma ve dondurma işlemi izlemektedir. Dondurma etkisi kaynatma ve kızartmaya kıyasla oldukça azdır. Bu; ‘‘ veteriner halk sağlığı’’ ve sofraya taşınabilme ihtimali her zaman mevcut olan lasalosit ve salinomisin için son derece önemlidir. Bunun olumlu bir olgu olmasının yanısıra ısıl işlemlerle bariz reel kayıp halk sağlığı açısından da son derece önemlidir. İyonoforların bu iyimser yönleri tüketici sağlığı için de yeri doldurulamayacak olması bakımından önem taşır. Lasalosit ve salinomisinin hızlı degradasyonları ve ısıl işlemlerle azalan bir tablo sergilemeleri bu ajanların daha uzun yıllar kullanılabileceğinin de güvencesidir.

AB otoritesince rezidüel aktivite araştırmalarının karar noktalarının farklı, bağımsız ve ciddi anlamda belirleyici araştırmalar sonucu ortaya konulduğu bilinmektedir. Yapılan bu çalışmada elde edilen değerler itibariyle tutarlılık ve hassasiyet olarak daha iyi sonuçlara ulaşılmış olunmasının önemli bir gelişme olduğu düşünülmekte dahası bu durumun üzerinde çalışılan analitik cihazların yeni ve yüksek hassasiyet değerlerine ulaşabilmesi, stabilitesini muhafaza edebilmesi bir diğer ifadeyle sistematığın farklı tarihlerde ve farklı uygulayıcı kişilerce kullanılmasında birbirine yakın sonuçlar alınabilmesi olarak da değerlendirilebilir.

Farklı ısıl işlemlerin tamamında farklılaşmanın istatistiki olarak önemli olması ($P<0,05$) bir başka ifadeyle rezidünün ısıl işlemde özellikle pozitif ısıl işlemlerden etkilenmesi lasalosit ve salinomisin için farmakolojik olarak önemli olduğu kadar toksikolojik olarak da kayda değer olmasının yanısıra hem zootekni açısından hem de broiler orijinli beslenmede insan sağlığı açısından önemsenmesi gereğine bir temel teşkil ettiği şeklinde değerlendirilebilir.

5. TARTIŞMA

Karboksilik iyonoforların metaflaktik amaçla kullanılması gelecekte de kullanımının devam edeceği gerçeği göz önünde tutulduğunda ana molekül olarak degrade olmaları, ilk geçiş etkinliğiyle büyük ölçüde bertaraf edilebilmeleri, dozlarında hatta aşıldıklarında bile mutajen ve teratojen olmamaları ‘‘Veteriner Halk Sağlığı’’ açısından önem taşımaktadır. Isıl işlemlere verdikleri yanıt ile lasalosit ve salinomisin alışılagelen yemek kültüründe rezidüye bağlı ciddi sağlık sorunları yaşatmayacağı bilirse de bir çok farmakolojik aktif maddenin hayvan ve bitkilerde kullanılması noktasında ısı işlem sonrası akibetleri, bitki ve hayvan metabolizmasında uğradığı değişimin şekli, niteliği bugün için verileri çok az olan bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu termolabil aktifler için olduğu kadar özellikle termostabil ilaçlar için çok daha önemlidir (5,10,33,45) İyonoforların ise hem ısı duyarlı ($P<0,05$) hemde iyon olarak sürüklenebilmeleri, çok erken yıkımlanmaları ve ilk geçiş etkisine maruziyetlerinin oldukça fazla olmasından dolayı bu anlamda güvenilir ancak terapötik indeks olarak dar bir aralığa sahip olmalarından dolayı da daha dikkatli kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Yemlerde ısıl işlemin başta salinomisin olmak üzere lasalositte de kısmen kayba yol açtığı belirtilmişse de ısıl işlemin yemlere son zamanlarda uygulanmıyor olması, ekipman taşıyıcılığının etkisi ve bu işlemlerin etkinlik oranlarına ilişkin herhangi bir veriye rastlanılmamıştır. Ekipmandan ötürü olabilecek muhtemel bulaşmaların önerilen doz aralıklarında olabileme ihtimalinin kazalar dışında olmayacağı düşünülmektedir (45).

Lasalosit ve salinomisin ekstraksiyonları PVKAE’de aynı kurumca benimsenmiş yasal mevzuat dahilinde de AB direktifleri ile paralelliği deklere edilmiş Berlin BVL antikoksidial referans laboratuvarında uygulanan yöntem seçildi. Aynı yöntem; AB’nin de antikoksidial kalıntı analizi için referans olarak seçtiği laboratuvar olması ve ulusal mevzuatın da antikoksidialleri B2b grubunda değerlendirdiği şekliyle aynı AB laboratuvarına atıfla PVKAE’nin antikoksidial kalıntı için hem görevli hem de referans laboratuvar olması önemli olduğu değerlendirilmiştir (3,4,7,31,45,46). Yöntemin ülkemizde ve AB’de eş güdümlü kabul görmesi ve aynı ölçütlerin tekrarı, kontrol edilebilirliği ve doğrulanabilirliği açısından önemli olduğu yargısına varılmıştır.

Lasalosit ve salinomisin için bir çok tespit metodu mevcut olup kullanılan tarama yöntemlerinden biri de immun assay yöntemidir. İmmun assay yöntemiyle yapılan testler antikor üretim tekniğine bağlı olup, immunize edilmiş hayvanlardan elde edilen antikorların iyonoforlarla kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu; monoklonal ve polyclonal antikorların iyonoforlarca bağlanmak suretiyle yapılabilen bir tespit yöntemi olsa da karboksilik iyonoforlarda kısmen de olsa çapraz etkileşim sözkonusu olduğu için bunun çapraz bir reaksiyona neden olabileceği bildirilmiştir (28,31).

Kullanılan metotlardan bir diğeri olan TLC ile yapılan analizlerle karboksilik iyonoforların dolayısıyla lasalosit ve salinomisin de kısmen tespit edilebildiği bilinmekle beraber analiz süresinin uzunluğu ve solvent bazlı ekstraksiyon volumlerinin yüksek olmasından dolayı etkinlik, güvenilirlik, geri kazanım ve doğrulama için yeterli görülmemektedir.

HPLC yönteminde tüm karboksilik iyonoforlar için çoklu rezidü çalışması mümkün olmamakla beraber HPLC tekniği ile yapılan analitik çalışmalarda lasalosit floresan kromatografik karakter göstermekte, diğer iyonofor kalıntıları ise derivatizasyon ile ayrıştırılabilmektedir. Monensin, narasin ve salinomisin UV/VIS dedektör yöntemiyle kombine edilebilirken lasalosit tek başına ayrı bir ekstraksiyon tekniği olarak floresan dedektörle analiz edilebilmektedir **(9,45)**

Başka bir yöntem ise LC-MS sistemidir. Kalibre edilmiş MS'ler ile iyonofor ve kalıntılarının doğrulamalarının en hasas ve en düşük limitlere kadar yapılabilmesi olanaklıdır. Electrospray LC-MS sistemi oldukça iyi bir düzey sunarken iyi bir ekstraksiyon yöntemiyle, iyi bir arıtma işlemi gerektirmektedir. Bugün için metotlardan kütle spektrometreye dayalı ve Tandem MS (Triple quadrapol) tarama sistemleriyle 0.5 ppb düzeylerinde hatta daha da ileri düzeyde hesaplama olanağı mevcuttur.

İyonofor antikoksidiyallerden lasalosit ve salinomisin rezidüel olarak otoriteler ve literatür ışığında tespiti, yasal ve önerilen arınma süreleri iyi bilinmekle beraber salinomisin degradasyon fazlalığının yapısal mı yoksa molekül kinetiği ile çevresel koşullardan mı kaynaklandığının henüz izlenebilir veri olarak açık olmadığı düşünülmektedir. Yapılan tespit işlemlerinin zamana bağlı degradasyon periyodu EFSA'nın ve ulusal otoritenin de belirttiği gibi lasalosit ve salinomisin için arınma süresinin 5 gün olduğu gerçeğinin verilerle paralel olduğu görüldü. Bu; Şener, Kaya, ve Mc Evoy'un da bildirdikleriyle aynıdır. Nitekim 5. gün verileri EFSA'nın bildirdiği MRL'nin altında olup 7.gün kesimlerinde yapılan analizlerde değerler 1ppb'nin yüzdelerik dilimleri düzeyindedir **(5,10,11, 34,45,58)**

Analiz ve doğrulama yöntemi farklı olmasına karşın Jestoi'nin **(32)** analitik değer olarak belirtmiş olduğu 1ppb nin altında karar ve stabil aynı parametreleri yakalama çalışmalarımız olmasına rağmen 1 ppb'nin altında gerek taramada LC-MS gerekse doğrulamada LC-MS/MS'de yaptığımız taramalarda tüm hassasiyetlerimize rağmen moleküllerin karakterinden kaynaklanan iyonizasyondan dolayı aynılık yakalanamadığından karar noktası araştırmacının belirttiği düzeyin üzerinde fakat otoritelerin altında alındı **(4,5,9,10,32)**. Analitik amaçlı bir çalışma olmamasına rağmen bununla oldukça iyi bir düzey yakalandığı kanısına varıldı. Bu durumda lasalosit için MRL tespit limitimizden çok daha yüksek olduğundan lasalosit ve salinomisin için hesaplanabilir ve tespit edilebilir limitler sırasıyla tarama testlerinde lasalosit için 4 ppb, 2 ppb salinomisin için 5 ppb, 2 ppb doğrulama testlerinde ise her ikisinde eşit olmak üzere aynı sıralamaya göre 2 ppb, 1 ppb olarak bulundu. Bunun; MRL verilen

lasalosit ve henüz limit açıklanmamış salinomisin için çok iyi birer ölçüt olduğu kanısına varıldı. Ancak yem kontaminasyonu başta olmak üzere herhangi bir sebeple iyonofor antikoksidiyallerden lasalosit ve salinomisin verilmiş kanatlıların ilk üç günde lasalosit ve salinomisin düzeylerinin çoğunlukla günlük alınabilir limitin altına indiği ve ısıtıl işlemlerden de ortalama %10 civarında etkilendikleri göz önünde bulundurulduğunda kontrollü kullanımı halinde kanatlı endüstrisinde kullanımının metaflaktik amaçlar dışında hem güven verici hemde halk sağlığı açısından daha az riskli olduğu düşünülmektedir.

Karboksilik iyonoforlar için Ulusal Referans Laboratuvar olan PVKAE de değerler bazında oturtulmuş analiz yöntemleriyle elde edilen değerler ve kalibrasyon verileri metod verimlilik ölçütlerine göre tespit sınırları (LOD) ve hesaplanabilir ölçüm sınırları (LOQ) içinde olduğu gözlemlendi. Bunun Elliott'ın yapmış olduğu çalışmayla paralel olduğu görüldü. (31).

Burada analitik çalışmalar in vitro yapılmış olup farklı tarama testleriyle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalardan biri olan ELISA yönteminde böbrek hücre kültüründe üretilen *E.tenella* antijenlerinin bulunabilirliği esasına dayanmakta ve tespit edilebilir limit 0.5 ppb (LOD) olduğu bildirilmektedir. Bu yöntemde hem inkübasyon süresinin uzunluğu, hemde farklı büyütme faktörlerinin etkilerinin rutin taramalar için sorun olabileceği belirtilmektedir. Bu; özgün araştırmalara iyi bir kaynak olabilmekle beraber rutin taramalarda bağışık yanıt oluşması halinde diğer büyütme faktörlerinin etkilerinin kestirilememesinin yanıltıcı olabileceğini düşündürmektedir (31).

Bu çalışmada kullanılan hem tarama hem de doğrulama metodları PVKAE' de rutin olarak uygulanmakta olan ulusal referans metod olup AB'nin referans laboratuvarlarından BVL tarafından kullanılan ve laboratuvarlar arası işbirliği neticesinde doğrulanmış bir analiz yöntemidir. Test, yapısı gereği genel tarama (SIM) modunda karboksilik iyonofor molekülü ve benzer olan tüm olasılıkları tarama özelliğindedir. Şüpheli veriler içerisinde aranan molekülün verilmiş kütle değerleri sınırlarına uygun olanları kromatografik olarak uygun yada şüpheli olarak değerlendirir. Araştırma ve özellikle rutin çalışma amaçlı bir çok numune için uzun sürebilecek analiz süresi ve çok hassas analitik şartlar oluşturmaktansa daha kolay ve seri bir tarama ile bir analizi çok daha hızlı ve güvenli yapmak bununla olasıdır. Burada metod validasyon kriterlerine göre tarama testleriyle elde edilen pozitif veya şüpheli örnekler kantitatif değer ve hassasiyet için MS/MS tekniği ile doğrulanır. Böylece negatif sonuçlardan da uygun örnekleme yaparak doğrulama gerekliliği mümkündür. Bu sistem tek, tek her aşaması kontrol esasına dayanan uygulayıcı ve analitik sistemlerden doğabilecek olumsuzlukları en aza indirebilecek bir dizi prosedürü içermektedir.

Rokka ve ark. yumurta numunelerinde lasalosit için LOD'u 2 ppb olarak elde etmiş ve yumurtacı tavuk yemlerine lasalosit ilave edilmesinin, kontrol grubuna göre yumurta veriminde herhangi bir değişiklik gözlemlenmediğini bildirmişlerdir. Yedirme sonrası bir haftalık periyottan narasin kalıntılarının 0.9 ile 1.7 ppb düzeylerinde tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada lasalositin hızla degrade

olduğu 3 gün içinde kalıntılarının tespit edilebildiği, salinomisin'in ise 10 günlük süre sonunda kalıntısına rastlanılmadığını bildirmişlerdir. Bu, yaptığımız çalışmaya da paraleldir. **(49)** Bir başka çalışma olan Cheneau ve ark. kısmi farklılıkları olan benzer bir metotla LC-MS ve LC-MS/MS sistemleriyle yaptıkları çalışmada kanatlıların yenilebilir dokularında ve plazmada monensin kalıntılarını, 0.5 ppb gibi oldukça düşük seviyelerde tespit ederek metodu doğrulamışlardır. Stabil ve güvenilir elde edilebilen miktarın 2.5 ppb (LOQ) olduğunu yazmışlardır **(26)**.

Tüm bu laboratuvar çalışmaları bir laboratuvar tarafından değil bir çok laboratuvar tarafından yapılarak ortak değerlendirmeler ışığında yöntem oturtularak bu sonuçlara varılmış böylece son derece hassas ve doğrulanabilir olarak benimsenmiştir **(5,9,10,64)**. Yöntemde hareketli fazda amonyum asetat ilave edilmesi iyonoforları ESI, pozitif iyonizasyon ve secici reaksiyon monitoring modu (SRM) için son derece önemli olduğu belirtilmektedir. Bundan dolayı hareketli fazda amonyum kullanımına gereksinim duyulmamaktadır. Hareketli fazda organik çözücü olarak asetonitril ve su (1 /1) oranında kullandığında süre uzamaktadır. Hareketli faz formik asitle asidifiye edildiğinde en düşük tespit seviyesinde geri kazanım %58.7'ye kadar düşebilmekte ancak diğer konsantrasyonlarda % 88 - % 102.2'ye kadar ulaşabilmektedir. Bu; analiz süresini 11-12 dakikaya kadar çıkarabilmektedir. Cheneau tarafından elde edilen performans değerlerinin çoğu bizim uyguladığımız çalışmada elde edilen değerlere paralel olduğu gözlenirken hareketli fazda organik çözücü olarak metanol kullanımı ve metanol/su oranının (3/1) organik çözücü lehine artırılması analiz süresini 3-4 dakikaya kadar indirmiştir. Kullanılan analitik kolon kısa boyutlu olduğundan kolonun her bir analiz için şartlanması sorun olmakta, ardışık verilen enjeksiyonlar performansı olumsuz etkilemektedir. Bu aşamada analiz süresini ve hareketli faz akış hızını değiştirerek standart çözelti piklerinde doğruluk, kesinlik, seçicilik ve tekrarlanabilirlik özelliklerinde stabil sonuçlar elde edilmesi için analiz süresi 6 dakikaya çıkartılarak kolonun daha iyi şartlanması sağlandı ve mobil faz isokratik akış programından gradien akış programına alındı. Bazı araştırmacılar **(26)** Analitik kolon olarak C-18 kolon kullanmışlarsa da bizim çalışmamızda daha polar karakterde olan synergi max - RP kolon ve 20x2.0 mm, 5µ kolon kullanılarak analiz süresinin kısalması ve elde edilen piklerin daha düzgün olması başarılıdır. Karboksilik iyonoforlardan salinomisin için henüz MRL verilmemiş olması ve lasalosit için MRL'nin bu değerlerle kıyaslanamayacak kadar yüksek olmasından ötürü analiz için daha alt stabil noktaların gerekmeyeceği kanaatine varıldı.

Kullanılan yöntem aynı gruptan birçok rezidünün analiz yöntemi olduğundan az sayıda çözelti kullanımı tercih edilirken standart çözelti hazırlanması sırasında stabiliteyi sağlamak için bir takım örneklemelelere başvuruldu. Josen ve Cheneau stok çözeltileri metanol ile hazırlarken, Kennedy ve Elliott analiz metotlarında asetonitril kullanmışlardır. Yada stok çözeltileri metanol ile hazırlarken çalışma çözeltilerinde asetonitril kullanmışlardır. Bu çalışmada hem asetonitril, hem de metanol ile yapılan örneklemelelerde metanol hem stok çözelti, hem de çalışma çözeltilerinin hazırlanmasında en

stabil sonuçları verdiği için tercih nedeni oldu. Karboksilik iyonoforlardan narasinin ve lasalositin asetonitrille hazırlanan standart çözeltileri yapısı gereği çok çabuk yıkılmakta, sırasıyla gün içi analiz performans değerleri %50- %70, lasalosit 1.gün % 20- % 40 ve 1-3 günler arası %60'a varan kayba uğradığı saptandığından ötürü metanolün daha stabil bir çözücü olduğu anlaşıldı ve örneklemeler metanol ile stabilize sağlanarak sürdürüldü. Bu, metanol ile çalışma, standart çözeltilerinin hazırlanması gün içerisinde stabil çalışma imkanı sağlamıştır. Böylece MRL verilmiş lasalositte MRL/2 düzeyinde LOD'a ulaşılması yeterli görülüp duyarlı ölçüm kriterlerinden biri olarak benimsendi. Burada santrifüjün 4000 rpm'e çıkarılması ultrasonik banyo ve santrifüj süresinin 15 dakikaya çıkarılması, santrifüj sıcaklığının 4 °C'ye çekilmesi diğer etkin faktörler oldu.

Karboksilik iyonoforlarla beslenme esnasında kontrol grubuna oranla lasalositte salinomisinden daha az olmak üzere kilo artışı, aşırı tüketme gereksiniminin oluşması iyonoforların mono ve/veya divalent iyon sürüklemelerine bağlı olarak yine aşırı su tüketimleri ve buna bağlı torako-abdominal yatış ve çokça defekasyona bağlı altını ıslatma sorunu diğer literatürle paralel oldu **(9,17,34,45,56)**

Metabolizma olarak kanatlılarda total degradasyon hızı iyonoforlar için de değişmeden ilk atılım etkisi özellikle lasalositte olmak üzere salinomisinde de belirgindir **(45,56)**

Lasalosit ve salinomisin üzerine yapılmış ısı işlem etkisini gösterir bir çalışma olmamakla beraber diğer bazı moleküllerin üzerine yapılan ısı işlemlerden etkilenme oranlarının tespiti çalışmalarında ısı işlemlerin genel olarak bir azalmaya neden olduğu bildirilmektedir **(18,27,52)**

Rokka ve ark. 2005 yılında yumurta tavuklarında narasin ilaveli yemle yaptıkları çalışmada pişirmenin rezidüel degradasyona önder olduğunu saptamışlardır **(51)** Bu çalışmada ise degradasyonun pişirme, kızartma ve dondurmada hem Rokka hem de diğer araştırmacılar tarafından farklı olarak bu üç parametrenin sonuncusu daha az olmak üzere tamamında aritmetik ortalama olarak yüksek ve istatistikî anlamda farkın anlamlı olduğu gözlemlendi ($P<0,05$).

Baydan ve ark., sulfonamidlerden sülfadiazinin kanatlı dokularında kalıntı düzeylerinin ısı karşısındaki tepkisini yine aynı araştırmacılar tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada da sülfadimetoksin, sülfakinoksalin ve sülfadoksin kalıntıları üzerine farklı pişirme işlemlerinin etkileri araştırılmıştır. Benzer şekilde Dehai ve ark kanatlı dokularında ormetoprim ve sülfadimetoksin kalıntılarının çeşitli pişirme, -20 C'de dondurma ve bekletme ile çok az miktarda da olsa azaldığını, ancak bunun istatistikî bir anlam ifade etmediğini belirlemişlerdir **(27)**. Bu çalışmaların verileriyle mukayese edildiğinde karboksilik iyonoforlardan lasalosit ve salinomisinde pozitif ve negatif ısı işlem etkisinin oldukça fazla olduğu aritmetik olarak yüksek bir ortalamaya sahip olduğu ve istatistikî olarak da önemli olduğu kanısına varılmıştır. ($P<0,05$) Benzer başkaca da çalışma mevcut olmamakla beraber sadece iyonoforlara da özel olmamak kaydıyla kullanılan kritik tüm moleküllerde ısı işlem etkilerinin dokudaki degradasyona neden olup olmadığı ve neden olması halinde düzeyinin ne olacağı bu

çalışmayla daha net bir şekilde yeni bir ufuk açılmıştır. Bu; farklı yemek kültürlerinde uygulanan farklı ısıtma işlemlerinde azalmanın olup olmayacağı ve oluş düzeyi noktasının “Veteriner Halk Sağlığı” açısından son derece önemli olup otoritelerin kararlarında da önemli bir etkinliğe sahip olması gerektiği kanısına varıldı. Böylece rezidüel azalma kriterlerinin “ısıtma işlemi”ne bağlı etkinliğinin de molekülün kullanım amacı perspektifinde değerlendirilme olanağını da sağlayacağı düşünülmektedir. Bunun farmakolojik bir aktifin ısıtma işlemi karşısındaki stabilitesinin düzeyinde olduğu kadar hem toksikolojik olarak hemde beslenme açısından son derece önemli olduğu ortadadır..

KAYNAKLAR

- 1- Anon** (2007) Safety of Kokcisan 120G as a feed additive for chickens for fattening. Updated scientific opinion of the panel on additives and products or substances used in animal feed. European Food Safety Authority. Adopted on 18 September 2007. The EFSA Journal (2007) 547, 1-10
- 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 lasalocid 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) 553, 1-46
- 6- Anon** (2006) Update of the opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on a request from the European Commission related to the safety and efficiency of "Kokcisan 120G" The EFSA Journal (2006) 378, 1-12
- 7- 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
- 8- Anon** (2005) Update of the opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on a new request from the commission related to the safety of "Bio-Cox®120G" based on Salinomycin sodium as a feed additive in accordance with Council Directive 70/524/EEC (Adopted 04/26 January 2005) The EFSA journal (2005) 170 1-4 2005
- 9- Anon** (2004) EMEA, Lasalocid Sodium. Summary Report of the Committee for Veterinary Medicinal Products. October 2004 Summary Report. EMEA/MRL/912/04-Final, Oct.2004.
- 10- Anon** (2004) Opinion of the scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the re-evaluation of coccidiostat Sacox120® micro Granulate in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC. The EFSA Journal (2004) 76, 1-49

- 11- Anon** (2004) Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the reevaluation of coccidiostat Avatec in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC. The EFSA Journal (2004) 53, 1-44
- 12- 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
- 13- Anon** (1999) Commission Directive 1997/76/EC. Annex. Determination of lasalocid sodium. 23 July 1999
- 14- Anon** (1997) Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği 16 Kasım 1997 tarih ve 23172 sayılı Resmi Gazete Başbakanlık Basımevi, Ankara
- 15- 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
- 16- Anon** (1994) Hayvansal ürünlerde kalıntı. Tübitak veterinerlik ve hayvancılık araştırma grubu özel ihtisas komisyonu raporu TÜBİTAK/Ankara.
- 17- 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
- 18- 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).
- 19- Baydan E, Özdemir M ve Kanbur M** (2001) Kanatlı dokularındaki sülfadiazin kalıntıları üzerine pişirme, dondurma ve benzeri işlemlerin etkileri, Çiftlik Dergisi. 203.81-90
- 20- Beasley, V** (1999), IVIS, Organic compounds that effect the heart Veterinary Toxicology. Department of Veterinary Biosciences, College of Veterinary Medicine, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA. <http://search.ivis.org/search?q=lasalocid>
- 21- 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 1990
- 22- 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
- 23- 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

- 24- Castro Hermida, J.A.** Freire Santos, F.Oteiza López,A.M. Vergara Castiblanco,C.A. Ares-Mazás, M.E. (2000) In vitro and in vivo efficacy of lasalocid for treatment of experimental cryptosporidiosis. *Veterinary Parasitology* 90 (2000) 265–270
- 25- Chen, Min.** Wolin M. J, (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
- 26- Cheneau, E.** at 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
- 27- 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
- 28- Dimenna, Gary**(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
- 29- Dubois, M. G.** Pierret and Ph. Delahaut (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
- 30- Ebrahimnezhad, Y.**(2005). Effects of ionophorous drugs, salinomycin and lasalocid, on the performance of broiler chicks and the relations ship of these drugs to suplementary methionin.*J.of Poultry science* 4 (11): 911-916
- 31- Elliot, Christopher** Tet.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)
- 32- 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
- 33- Jordan, F.T.W.** (1990) *Poultry disease.* Bailliere Tindal, İSBN 0-7020-1339-0 / 24-28. Oval road London/England 1990
- 34- Kaya, S. ve ark.**(2002) *Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji.* Medisan Yayınları, Ankara
- 35- Kaya, S. ark.** (2002) *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji,* Medisan yayınevi. Yayın no: 53 s: 628-629,696 Ankara
- 36- Keleş, O. Yıldırım, M. Gargılı, A. Arslan, M.Ö.** (1995) Salinomisinin aralıklı uygulanmasının antikoksidial etkisi. *İ. Ü. Vet. Fak. Derg.*2 (2)327-333,
- 37- Keleş, O. Yıldırım, M. Ozan, K. Şener, S.**(1995) İyonofor antikoksidial ve florokinolon antibiyotikler arasında etkileşim üzerine çalışmalar *İ. Ünv. Vet. Fak. Derg. C:21 Sayı:1* 1995
- 38- Keleş, O. Ve ark.** Aflatoksin B1'in salinomisininin antikoksidial etkinliği ve koksidiyoza karşı oluşan immunité üzerine etkisi. *Pendik Vet. Mikrobiol. Derg. C:26 Sayı:1 S:91–99* 1995

- 39- Keleş, O.** ve ark. (1995) Bazı terapötik ajanların koksidiyoza karşı oluşan immünite üzerine olan etkileri. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 26(1) 101–110
- 40- 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.
- 41- Kennedy, D.G.;** et al (1996); The incidens and cause of lasalocide residues in eggs in Northern Ireland *Food Add.Cont.,* 13-787-794
- 42- Lynas, L.** Currie, D. McCaughey, W.J. McEvoy, J.D.G. Kennedy, D.G. (1998) *Food Addit. Contam.* 15, p: 162. 1998
- 43- 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.
- 44- McDouglas, L.R,** et al (1998), Residuel activity of veteriner drugs in chickens after withdrwal of medicated feed, *Veterinary Parasitology* 74, 91-99
- 45- 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
- 46- 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.
- 47- 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 Ministry of the Flemish Community, Agricultural Research Centre Ghent (CLO), Department of Animal Product Quality and Transformation Technology (DVK), Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle , Belgium
- 48- Oehme, F.W.** Pickrell, J.A. (1999) An analysis of the chronic oral toxicity of polyether ionophore antibiotics in animals. *Vet Hum Toxicol.* Aug; 41(4):251-7. Review
- 49- Ozan, K.** Keleş, O. (1993) Veteriner Hekimlikte kullanılan antiparaziter ilaçlar. *İst. Üniv. Veteriner Fak. yay. Ders notu No:11 Avcılar/İstanbul*
- 50- Parelman, B.;** et all (1993) Effect on the accidental feeding lasalocide sodium to broiler breeder chickens. *Vet. Record* 13, 271-273
- 51- 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.
- 52- Rokka, M.** Peltonen, K. (2006) Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: validation of an LC-MS/MS method, *Food Addit. Contam;* 2006, 23, 470-478
- 53- 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

- 54- 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
- 55- Skrşivanova, V.** Marounekb, M. Kleina P. (1998) Effects of virginiamycin and salinomycin on performance, digestibility of nutrients and mortality of rabbits, *Animal Feed Science and Technology* 77 (1999) 139±147
- 56- şener, S.** (1993) Kanatlılarda Karboksilik İyonoforların Toksikolojisi. Uluslararası Tavukçuluk Kongresi. 13–14 Mayıs 1993, Tebliğ: 337,
- 57- şener, S.** (1990) Veteriner klinik farmakoloji ve formüller, Pethask Veteriner Hekimliği Yay. s:279,209,351,367 Gebze/Kocaeli
- 58- şener, S.** Özel Farmakoloji (2006) İstanbul Ün. Veteriner Fak. Yay. Yayın No: 4671, İSSN 975-404-770-7 s: 174-176 İstanbul
- 59- 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
- 60- şanlı, Y.** Veteriner farmakoloji ve ilaçla sağıtım seçenekleri. Medisan yayınları,1991 İSBN:975–7774-01-4 s:681-682 Ankara, 1991
- 61- şanlı, Y.** Akar, F. Bilgili, A. 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, 1993
- 62- Yadav, A,** et all. (2001). Study of resistance against some ionophores in eimeria tenella field isolates. *Veterinary Parasitology* 102, 69–75.
- 63- Williams R.B.** (2006) Relative virulances of a drug-rsistant and a drug sensitive strain of *Eimeria acervulina*, a coccidium of chickens. Elsevier, *Veterinary Parasitology* 135, 15–23
- 64- 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.0.06.00.00-5425
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. Süleyman ŞENER'in danışmanlığında doktora eğitimini sürdüren Veteriner Hekim Namık BİLİCİ'ye ait "İstanbul'da tüketime sunulan kanatlı et ve yumurtalarında Lasolosit, Salinomisin kalıntı düzeyleri ile farklı ısı işlemlerinin kalıntı düzeylerine etkisinin araştırılması" 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

Farm 2006/186

01.11.2006

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.Süleyman ŞENER'in danışmanlığı altında doktora eğitimini sürdüren Vet.Hek.Namık BİLİCİ'nin hazırlamış olduğu "*İstanbul'da Tüketime Sunulan Kanatlı Et ve Yumurtalarında Lasolosit, Salinomisin Kalıntı Düzeyleri İle Farklı Isı İşlemlerinin Kalıntı Düzeylerine Etkisinin Araştırılması*" 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

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

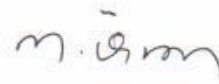
Fakültemiz Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Süleyman ŞENER'in danışmanlığı altında doktora eğitimini sürdüren Vet.Hek.Namık BİLİCİ'nin hazırlamış olduğu "*İstanbul'da Tüketime Sunulan Kanatlı Et ve Yumurtalarında Lasolosit, Salinomisin Kalıntı Düzeyleri İle Farklı Isı İşlemlerinin Kalıntı Düzeylerine Etkisinin Araştırılması*" 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

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK KURULU


İstanbul University Veterinary Faculty Ethic Committee

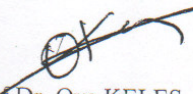
Karar No:2006/175

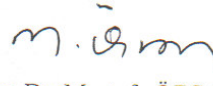
31.10.2006

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

Fakültemiz Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Süleyman ŞENER'in danışmanlığı altında doktora eğitimini sürdüren Vet.Hek.Namık BİLİCİ'nin hazırlamış olduğu "*İstanbul'da Tüketime Sunulan Kanatlı Et ve Yumurtalarında Lasolosit, Salinomisin Kalıntı Düzeyleri İle Farklı Isı İşlemlerinin Kalıntı Düzeylerine Etkisinin Araştırılması*" 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	Namık	Soyadı	BİLİCİ
Doğ.Yeri	Elazığ	Doğ.Tar.	05.08.1971
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	27184605272
Email	namikbilici@gmail.com	Tel	0 505 253 97 91/0505 23 966 23

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	2008
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	1994
Lisans	İstanbul Üniversitesi	1994
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Veteriner Hekim	Bahçelievler Belediyesi	2006-2008
2.	Veteriner Hekim	İst.Büyükşehir Belediyesi	1996-2005
3.	Veteriner Hekim		-

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

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Corel Draw, Flash	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):