

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**PROJE BAŞLIĞI: SÜLFONAMİD GRUBU BAZI
ANTİBAKTERİYALLERİN VE TRİMETOPRİM’İN KANATLI
DOKULARINDAKİ KALINTILARI ÜZERİNE ÇEŞİTLİ PİŞİRME VE
DONDURMA İŞLEMLERİNİN ETKİLERİ**

Proje No: VA-06-12

Proje Türü: NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof.Dr. Bilal Cem LİMAN

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Araştırmacılar:

Doç.Dr. Murat KANBUR

Doç.Dr. Gökhan ERASLAN

Prof.Dr. Emine BAYDAN

Prof.Dr. Erdal DİNÇ

MART 2013

KAYSERİ

Teşekkür

Bu projenin bütçelendirilmesini sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Başkanlığına ve proje süreçlerinde emeği geçen tüm BAP Birimi personeline; civciv ve yem teminini sağlayan KAYTAŞ Kayseri Tavukçuluk Sanayi ve Ticaret A.Ş'e, ilaçların teminini sağlayan Pfizer Veteriner İlaçları Birimine, projenin deneysel çalışmaları esnasında önemli katkıları bulunan Yrd.Doç.Dr. Mürsel Karabacak, Dr. Zeynep Soyer Sarıca ve Veteriner Hekim Mikail Sungur'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2. GENEL BİLGİLER	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
4. BULGULAR	16
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	21
6. KAYNAKLAR	27

ÖZET

SÜLFONAMİD GRUBU BAZI ANTİBAKTERİYALLERİN VE TRİMETOPRİM İN KANATLI DOKULARDAKİ KALITILARI ÜZERİNE ÇEŞİTLİ PİŞİRME VE DONDURMA İŞLEMLERİNİN ETKİLERİ

Bu araştırmayla kızartma, haşlama ve dondurma işlemlerinin civciv göğüs eti ve karaciğer dokularındaki sülfaklorpidazin (SCP), sülfamezatin (SMZ) ve trimetoprim (TMP) kalıntılarına yönelik etkilerinin ortaya konulması amaçlandı.

Araştırmada SCP+TMP ve SMZ+TMP olmak üzere 2 çalışma grubu oluşturuldu ve her grupta 10'ar adet erkek etlik civciv bulunduruldu. Beş adet etçi piliç ise kontrol grubu olarak tutuldu. Civcivler 30 gün boyunca herhangi bir sülfonamid ve trimetoprim kalıntısı içermeyen yemle beslendi. Otuzuncu günün sonunda ilk gruba SCP+TMP karışımı 30 mg/kg SCP ve 6 mg/kg TMP dozuyla; ikinci gruba ise SMZ+TMP karışımı 110 mg/kg sülfamezatin ve 22 mg/kg trimetoprim dozunda günde 1 kez ve 5 gün boyunca su içinde süspansiyon şeklinde sonda ile kursağa verildi. Son uygulamadan 24 saat sonra hayvanlar kesilerek sağ göğüs dokusu ve karaciğerleri alındı. Kontrol grubundaki etlik piliçler ise ilaç verilmeksizin kesildi; sağ göğüs dokuları ile karaciğerleri alındı. Dokuların bir kısmı plastik muhafaza kaplarına alınarak, soğukta depolamanın ilaç kalıntıları üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 30 ve 45 gün boyunca -20 C'lik derin dondurucuda saklandı. Kesim sonrası heman alınan çiğ dokular, kızartma ve haşlama yapılan dokular ile dondurma süresi sonunda alınan dokular homojenize edilerek SCP, SMZ ve TMP analizleri DAD dedektör ve ters faz kolon ile HPLC'de gerçekleştirildi.

Çalışma sonucunda haşlama ve ızgara işlemlerinin broyler dokularında SCP, SMZ ve TMP kalıntılarında değişik oranlarda azalmaya neden olduğu; derin dondurucuda bekletmenin ise dokularda bu ilaç kalıntıları yönünden önemli bir değişime yol açmadığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: Sülfaklorpidazin, sülfamezatin, trimetoprim, etçi piliç, göğüs eti, karaciğer, kalıntı

ABSTRACT

THE EFFECTS OF COOKING AND FREEZING PROCEDURES ON SOME SULFONAMIDES AND TRIMETHOPRIM OF BROILER TISSUES

This research was aimed to reveal the effect of frying, boiling and freezing processes on the residues of sulphachlorpyridazine (SCP), sulfamezathine (SMZ) and trimethoprim (TMP) residues in breast meat and liver tissues of chickens.

The study was conducted on two study groups, designed as SCP+TMP group and SMZ+TMP group which contain 10 male broiler chicks each. Five chicken were assigned as control group. Chickens were fed on with a commercial diet for 30 days. At the end of the 30th day of the study, the first study group was given SCP+TMP mixture of 30 mg / kg of SCP and 6 mg / kg of TMP and the second group was given a mixture of SMZ+TMP of 110 mg / kg sulfamezatin and 22 mg / kg TMP in the form of suspension once a day for 5 days orally directly into the crop using a thin plastic tube attached to a syringe in water. Twenty four hours after the last administration the animals were sacrificed and the right breast tissue and the liver of the chickens were taken out. The same procedure was applied to the broilers without administration of any drug in the control group. Some of the samples were taken into plastic containers and kept at -20 °C in a deep freeze in order to determine the effect of cold storage on drug residues. The raw samples just taken after the cutting, the roast and boiled tissues and the samples which were taken at the end of the freezing period were homojenized and were analyzed by HPLC with DAD detector and reverse phase column, in order to detect the level SCP, SMZ and TMP residues.

The results of the study showed that while the boiling and roasting processes of the samples caused a reduction in the residues of SCP, SMZ and TMP at different rates, the storage of the samples in deep freze caused no significant different in terms of the tissue drug residues.

Key words: Sulfachlorpyridazine, sulfamezathine, trimethoprim, broiler, meat, liver, residue.

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Sülfonamid içeren preparatlar genellikle trimetoprimle kombine olarak hazırlanmakta; böylece streptokoklar, stafilokoklar, nocardia, enterobakterler, bazı protozoonlar (koksidiler, pneumosistler, toxoplazma) başta olmak üzere, oldukça geniş bir etki spektrumu kazanmaktadır. Geniş spektrumlu ve ucuz maliyetli olmaları nedeniyle sulfonamid-trimetoprim kombinasyonları kanatlılarda diyare, koliseptisemi, CRD, hava kesesi enfeksiyonları, salpingitis, koriza, kolera, stafilokokkal enfeksiyonlarda ve koksidiyozda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Proje konusuyla ilgili yapılan yayınların incelenmesi sonucunda, sülfaklorpidazin'in hayvanlara kontrollü verilmesini takiben dokulardaki kalıntı durumu, bu kalıntılar üzerine pişirme ve dondurma işlemlerinin etkileriyle ilgili bir araştırmanın bulunmadığı; sülfametazin kalıntıları üzerine çeşitli pişirme işlemlerinin etkileri domuzlarda incelenmesine rağmen, kanatlılarda benzeri bir araştırmanın yapılmadığı, dondurarak saklamanın sülfametazin kalıntıları üzerine etkileriyle ilgili çalışmanın olmadığı gözlenmiştir. Sülfonamidler genellikle trimetoprimle hazırlanmış kombinasyonları şeklinde kullanılmasına rağmen, trimetoprim üzerine pişirme ve dondurma işlemlerinin etkisine yönelik bir araştırmaya rastlanmamıştır. Yapılan literatür incelemelerinde, diğer sülfonamid+trimetoprim karışımlarının kan ve dokularda birlikte analizleriyle ilgili araştırmaların bulunduğu, ancak sülfaklorpidazin+trimetoprim karışımı analizleriyle ilgili araştırmaların olmadığı görülmüştür.

Bu araştırmayla bazı pişirme ve dondurma işlemlerinin sülfaklorpidazin ve trimetoprim'e yönelik etkilerinin ortaya konması; kanatlı dokularındaki sülfametazin kalıntıları üzerine pişirme ve dondurma gibi işlemlerin etkilerinin belirlenmesi; değişik pişirme ve dondurma işlemlerinin, insanlar tarafından besinlerle kalıntı şeklinde alınabilecek sülfaklorpidazin ve trimetoprim'in alım riskini azaltıp azaltamayacağı yönünde bilgilerin sağlanması; sülfaklorpidazin ve trimetoprim karışımlarının dokulardan birlikte analizleri için kullanılabilir bir yöntemin geliştirilmesi amaçlandı.

Antibiyotik çağının başlamasından bu yana geçen yarım yüzyıllık süreçte kullanıma sunulan antibiyotikler, insan ve hayvanların bulaşıcı ve salgın hastalıklarında koruyucu ve sağaltıcı amaçla yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Ancak son çeyrek yüzyıllık süreçte antibiyotiklerin etkinliklerinde dikkat çekici azalmaların olduğu çok sayıdaki araştırmayla doğrulanmış bir gerçektir ki bu azalmada, gıdalarla uzun süreli alınan antibiyotik kalıntılarının önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Antibiyotiklerin çok yaygın olarak kullanılması, insanların ilaçlardan kaynaklanan kalıntılara maruziyet riskinin her zaman olabilmesi sebepleriyle, bugün için tüm yönleriyle açığa kavuşturulamasa da, özellikle hayvansal besinlerle uzun süreli alınan ilaç kalıntılarının tüketicilerde başlıca akut ve kronik toksik etkiler, teratojen-mutajen-kanserojen etki riski yaratabilecekleri kabul edilmektedir.

Besin maddelerinde ilaç kalıntılarına ilişkin mevcut tolerans düzeyleri çiğ doku veya organlardakileri gösterir. Bununla birlikte et, süt ve yumurta gibi hayvansal ürünler tüketilmeden önce genellikle pişirme veya konserveleme gibi herhangi bir işlemde geçirilmektedir. Ancak her ilacın, bu işlemler sonrası besinlerde yıkımlanıp yıkımlanmadığı ile ilgili bilgiler bulunmamaktadır.

Bu araştırma da, tavuklarda yaygın olarak kullanılan sülfaklorpidazin, sülfametazin ve trimetoprim'in dokulardaki kalıntıları üzerine pişirme ve dondurma işlemlerinin ne gibi etkileri olduğuna yönelik bilgileri ortaya koyacak olması; çiğ, dondurulmuş ve pişirilmiş dokulardaki ilaç kalıntılardaki olası değişimlerin tüketici sağlığı yönünden önemini belirleyebilecek olması açısından özgünlük taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sülfonamidler

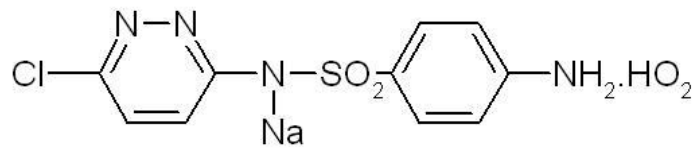
Sülfonamidler bakteri hücrelerinde folik asit sentezini PABA ile yarışarak engelleyen ilaçlardır (Chambers&Jawetz, 1998). Genellikle geniş spektrumlu olan sülfonamidler antibakteriyal ve antiprotozoal (özellikle de antikoksidyal) etkinlik gösterir (Prescott&Baggott, 1993; Appelgate, 1983).

Enterik sülfonamidler (sülfaklorpirazin) hariç pek çok sülfonamid oral yolla verildiğinde iyi absorbe edilir. Vücutta geniş bir dağılım gösterir. Metabolizmaları öncelikle KC'de olmakla birlikte diğer doku ve organlarda da metabolize olabilmektedir. Biyotransformasyonları türe göre değişmekle birlikte asetilasyon, glukuronid konjugasyonu ve aromatik hidroksilasyonla olur. Pek çok enterik olmayan sülfonamidin atılımı böbrek yolu ile olur. Glomerüler filtrasyonla ana sülfonamid bileşiği, tubuler ekstraksiyon ile ana bileşik ve metabolitleri atılır (Riviera ve ark, 1991; Prescott&Baggott, 1993). Genelde sülfonamid metabolitleri ana bileşiğe göre daha hızlı elimine edilir (Nouws ve ark, 1986; Paulson ve ark, 1994).

2.2. Sülfaklorpidazin

SCP hayvan sağlığında kullanılan bir sülfonamiddir. Bakteriyostatik ve geniş etki spektrumlu olan SCP ssindirim kanalından nispeten zayıf absorbe olur. Diğer sülfonamidlerde olduğu gibi pek çok gram pozitif ve negatif mikroorganizmaya ve koksidiyoz etkenlerine (E. necatrix, E.maxima, E.tenella, E.brunetti) karşı etkilidir (Prescott&Baggott, 1993; Sieiro ve Meier, 1973).

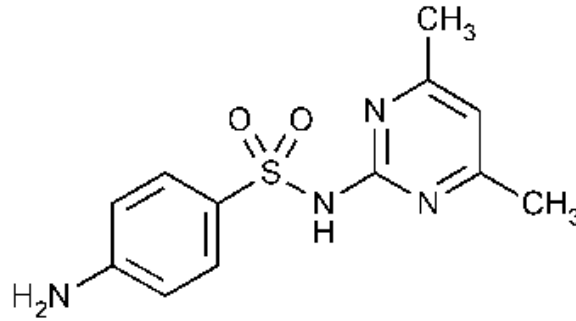
Oral yoldan kullanılan SCP hayvanlar tarafından iyi tolere edilir. Genellikle 30-50 mg/kg dozda, 3-6 gün süre ile suya katılarak kolibakteriyoz, kolera ve koksidiyoz sağaltımında kullanılır. Gerektiğinde günlük doz 400 mg/kg'a kadar verilebilir. İlacın 37.5-56 mg/kg ca dozunda yeme katılarak da etkili olabildiği belirtilmektedir (Rosselet ve ark, 1981; Romwary ve Horway, 1976).



Şekil 1. Sülfaklorpidazinin kimyasal yapısı

2.3. Sulfametazin

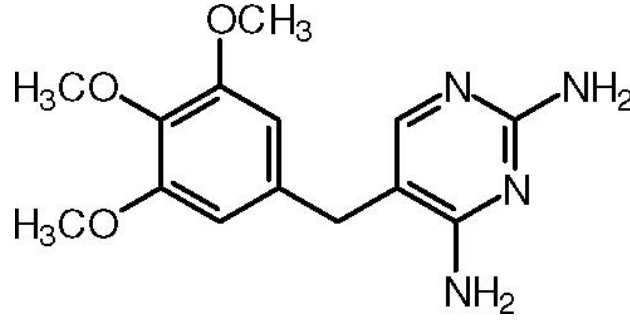
Sülfamezatin sığır, at, domuz, küçük ruminantlar, tavşan ve kanatlılar olmak üzere veteriner hekimliğinde geniş ölçekte kullanılan sülfonamid türevi bir ilaçtır. İlaç içme suyu, yem katkı, bolus ve parantral çözelti şeklinde hastalıkların tedavisi ve hastalıktan korunmada kullanılmaktadır. İlaç 100-110 mg/kg dozda verildikten sonra tüm hayvan türlerinde en az 24 saat süreyle 50 mikrogram/ml plazma ilaç yoğunluğu sağlar. İlacın hı ömrü uzundur. İlaç kanatlılarda koksidiyozda sağaltıcı olarak yeme 4400 ppm veya suya 2000 ppm yoğunlukta katılarak 3-5 gün süre ile verilir; koruyucu olarak ilaç yeme 2500-3750 ppm arasında değişen miktarlarda katılarak verilir (Kaya ve ark, 2000; Riviera ve Papich, 2009).



Şekil 2. Sülfamezatinin kimyasal yapısı

2.4. Trimetoprim

İnsanlar ve hayvanlarda bakteriyel hastalıkların sağaltımı ve önlenmesinde ilk kullanılan ilaçlar sülfonamidlerdir. Günümüzde bakteriyel ve paraziter hastalıklar için seçkin etkili birçok antibiyotiğin kullanım olanağı varsa da sülfonamidler, geniş spektrumlu olmaları, zehirliliklerinin az olması, uygulama yolu ve dozaj kolaylıkları ile ekonomik nedenlerden dolayı, özellikle trimetoprimle hazırlanan kombinasyonları şeklinde hala geniş ölçekte kullanılmaktadır. Sülfonamidlerin trimetoprimle hazırlanan formları, streptokoklar, stafilokoklar, nocardia, enterobakterler, bazı protozoonlar (koksidiler, pneumosistler, toxoplazma) başta olmak üzere, oldukça geniş etki spektrumuna sahip olup, kanatlılarda diyare, koliseptisemi, CRD, hava kesesi enfeksiyonları, salpingitis, koriza, kolera, stafilokokkal enfeksiyonlarda ve koksidiyozda kullanım alanı bulmaktadır (Kaya ve ark, 2000; Şanlı 1999).



Şekil 3. Trimetoprimin kimyasal yapısı

2.5. Besinlerde antibiyotik kalıntıları

Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi ile yemden yararlanmanın artırılması veya gelişmenin hızlandırılması amacıyla ilaç kullanımı günümüzde vazgeçilmez bir uygulama haline gelmiştir. Hastalıkların sağaltımında genellikle kısa süreli (en çok 2 hafta) ilaç kullanımı söz konusu olurken, hastalıklardan korunma, gelişmenin hızlandırılması ve yemden yararlanmanın artırılması amacıyla bazen hayvanın tüm yaşamı boyunca ilaç kullanılır. Son 40-45 yılda bu tür uygulamalarla bir çok hastalığın sağaltımı ve önlenmesi ile hayvanlarda yemden yararlanma ve böylece verimde artış sağlanmıştır. Ancak bu amaçla kullanılan ilaçlar faydanın yanı sıra, hayvansal ürünlerde bıraktıkları kalıntıları aracılığıyla insan sağlığı yönünden sakınca oluştururlar. Günümüze kadar yapılan çok sayıda araştırma bu ilaçların hayvanların eti, sütü, yumurtası gibi insan tüketimine sunulan ürünlerine kalıntı şeklinde yansıdığını göstermiştir. İnsanlarda besin zinciri yoluyla geçen bu ilaç kalıntılarının alerjiden, kanserojen, teratojen ve bakterilerde dirençliliğin gelişmesi ve antibiyotiklerin sağaltımda etkinliklerinin azalması gibi çeşitli istenmeyen etkilere sebep olduğu da bilinmektedir (Kaya ve ark, 2000; Baydan ve ark, 2001; Baydan ve ark, 2002; Şanlı, 1995).

FAO; WHO, FDA, AB gibi çeşitli uluslararası kuruluşlar ve ülkelerdeki ulusal kuruluşlar, bu sağlık sakıncalarını en aza indirebilmek için ilaç kullanımından sonra her ilaca özgü bekletme sürelerine uyulmasını zorunlu kılmaktadır. Aynı kuruluşlar, kalıntılar şeklinde yiyeceklerle uzun süre alındığında insanlarda kanserojen etkiler gibi ciddi toksik etkilere neden olan ilaçlar için de sıfır tolerans düzeyini kabul etmektedir. İlacın vucuttan tamamen atılması için gereken bekletme sürelerinin çoğunun ilaç için uzun olması ve bu süre boyunca süt, yumurta gibi ürünlerin başka bir değerlendirme alternatifi bulunmadığı için atılma zorunluluğu ekonomik olarak külfet oluşturmakta ve bekletme sürelerine uyulma olasılığını da zayıflatmaktadır (Kaya ve ark, 2000; Baydan ve ark, 2001; Baydan ve ark, 2002; Şanlı, 1995).

Besin maddelerinde ilaç kalıntılarına ilişkin mevcut tolerans düzeyleri çiğ doku veya organlardakileri gösterir. Bununla birlikte et, süt ve yumurta gibi hayvansal ürünler tüketilmeden önce genellikle pişirme veya konserveleme gibi herhangi bir işlemle geçirilmektedir. Böyle ürünlerde kalıntıların kalış veya kaybolma sürelerine etki edecek konulara ilişkin yeterli bilgiler yoktur. Pişirme esnasında proteinlerde yıkımlanma, ısıtmaya bağlı olarak su ve yağ kaybı ve pH'da değişimler olabilir. Bu faktörlerin bir veya birkaçında görülen değişikliklere bağlı olarak ilaç kalıntılarının çözünürlüğü veya miktarında da değişme söz konusudur. Dolayısıyla pişirme, kavurma, kızartma veya soğukta saklama işlemleriyle, başta antibiyotikler olmak üzere çeşitli ilaç kalıntılarının parçalanması ya da etkisiz metabolitlere çevrilerek zararsız hale getirilmesi beklenebilir. Bu konuya ilişkin olarak yapılan çalışmalar aminoglikozid, makrolid ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerin kesilmiş hayvan dokularında genellikle bozulmaksızın uzun süre kaldığını, ancak hayvansal ürünlere uygulanan bazı işlemlerin zayıf derecede de olsa, bu grup ilaçlarda değişkenliğe sebep olabildiğini göstermiştir. Buna karşılık kloramfenikolün etteki kalıntıları, kızartma ve kavurma ile % 30, konserveleme işlemlerinden sonra ise tamamen yakın oranda kayba uğramaktadır. Benzer şekilde karbadoks ve olakindoks'un kendileri ve metabolitleri ile, ampicilin, levamizol ve klenbuterol'ün dokulardaki kalıntıları çeşitli pişirme işlemleriyle tamamen yakın oranda yıkımlanmaktadır. Derin dondurucuda (-20 C) dokuların farklı sürelerde bekletilmesine yönelik yapılan araştırmalar, ilaç kalıntıları üzerine bu işlemin çok fazla etkili olmadığını göstermekle birlikte, böbreklerdeki ampicilin'in +4 C'de 1 haftada hızla parçalanması ve penisilin G'nin derin dondurucuda 10 gün süreyle tutulmasında gluteal kaslarda yaklaşık yarı yarıya kayba uğramasında olduğu gibi bazı ilaç kalıntıları yönünden etkili olmaktadır (Kaya ve ark, 2000; Baydan ve ark, 2001; Baydan ve ark, 2002; Şanlı, 1995).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Makine ve Teçhizat

HPLC-DAD (Agilent 1200)

Vorteks (Heidolph, Reax top)

Homojenizatör (Heidolph, Silent Crusher M)

Soğutmalı santrifüj (Nüve, NF 800R)

3.1.2. Sarflar ve kimyasallar

C18 ters faz kolon (ACE121-2546, 250x4.6 mm)

Sulfaklorpidazin sodyum teknik std (Novartis)

Sulfamezatin (sulfadimidin) sodyum teknik standardı (Ceva-DIF)

Trimetoprim teknik standart (Novartis)

Hidroklorik asit (Sigma, H 7020)

Sodyum asetat (Sigma, S2889)

Diklormetan (Sigma, 270997)

Ortofosforik asit (Merck, 100563)

3.2. Yöntem

3.2.1. Validasyon

SCP, SMZ ve TMP analizlerinin validasyonu doğrusallık, kesinlik, doğruluk, tespit sınırı ve tayin sınırı parametreleri ile değerlendirildi. Doğrusallığın belirlenmesinde kalibrasyon doğrusu kullanıldı. Kalibrasyon doğrusunun çizilmesinde 1-80 µg/ml aralığında hazırlanan 7 standart çözeltisi kullanıldı. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesinde LOD için 3.0, LOQ için 10 sinyal/gürültü oranı baz alındı. Yöntemin kesinliğinin belirlenmesinde tekrarlı ölçümlerde % RSD değerinden yararlanıldı. Bu amaçla 40, 60 ve 80 µg/ml'lik standart çözeltileri kullanıldı. Ölçümler 3 farklı günde yapıldı. Doğruluğun belirlenmesinde doku örneklerindeki geri kazanım değerleri kullanıldı. Bu amaçla 750 µg/ml'lik çözelti katılmış boş göğüs ve karaciğer dokuları (3 g) kullanıldı. Analizler belirtilen prosedüre göre yapıldı. Selektivitenin belirlenmesinde boş göğüs ve KC dokularının analizlerinden yararlanıldı.

3.2.2. Deneysel Uygulamalar

Araştırmada sülfaklorpridazin+trimetoprim ve sülfametazin+trimetoprim olmak üzere 2 çalışma grubu oluşturuldu ve her grupta 10'ar adet erkek etlik civciv (Kaytaş, Kayseri) bulunduruldu. Beş adet etçi piliç ise kontrol grubu olarak tutuldu. Civcivler 30 gün boyunca herhangi bir sülfonamid ve trimetoprim kalıntısı içermeyen yemle beslendi. Otuzuncu günün sonunda ilk gruba sülfaklorpridazin+trimetoprim karışımı 30 mg/kg sülfaklorpridazin ve 6 mg/kg trimetoprim (Kaya ve ark, 2000) dozuyla; ikinci gruba ise sülfametazin+trimetoprim karışımı 110 mg/kg sülfamezatin ve 22 mg/kg trimetoprim (Kaya ve ark, 2000) dozunda günde 1 kez ve 5 gün boyunca su içinde süspansiyon şeklinde sonda ile kursağa verildi. Son uygulamadan 24 saat sonra hayvanlar kesilerek sağ göğüs dokusu ve karaciğerleri alındı. . Kontrol grubundaki etlik piliçler ise ilaç verilmeksizin kesildi; sağ göğüs dokuları ile karaciğerleri, analizlerin validasyonunda kullanılmak üzere alındı. Göğüs dokuları ve karaciğerlerin her birinden, çiğ, haşlama, ızgara işlemleri için 10'ar gram numune alındı. Kalan dokular plastik muhafaza kaplarına alınarak, soğukta depolamanın ilaç kalıntıları üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla -20 C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2.3. Pişirme ve saklama işlemleri

Izgara işlemi bek üzerinde ve teflon tavada 5 dakika süreyle, haşlama işlemi ise dokular üzerine 50 ml tuzlu su (50 mg/50 ml) ilavesiyle 100 C'ye ayarlı ısıtıcılı tablada 20 dakika süreyle yapıldı. Haşlama işlemi sonucu doku ve haşlama suyu ayrıldı (Baydan ve ark, 2000). Derin dondurucudaki dokulardan da 15., 30. ve 60. günlerde 10'ar gram numune alındı. Çiğ, haşlama doku, haşlama su, ızgara edilen doku ve derin dondurucuda tutulan dokulardaki sülfonamid ve trimetoprim ekstraksiyonları ve analizleri Papapanagiotou ve ark (2002) tarafından belirtilen yöntemle göre yapıldı.

3.2.4. Örneklerin ekstraksiyonları

Dokuların ekstraksiyonu için 100 ml'lik plastik santrifüj tüpüne 3 gram doku alındı ve üzerine SCP+TMP analizi yapılacak numunelerde SMZ (SMZ stok çözeltisinden 80 mg SMZ hesabıyla), SMZ+TMP analizi yapılacak numunelerde ise SCP (SCP stok çözeltisinden 80 mg SCP hesabıyla) iç standart olarak katıldı. Tüplere 30 ml diklormetan ilave edilerek homojenizatörle 1 dakika homojenize edildi. Karışım Whatman 40 filtre kağıdından süzülerek toplandı. Süzüntünün 10 ml'si 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve üzerine 3 N HCL'den 1 ml ilave edilerek 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdan 250 µl sıvı 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 3.8 M sodyum asetat çözeltisinden 250 µl

eklenerek 15 saniye vortekslendi. Bu çözeltinin 20 µl'si HPLC'ye uygulandı (Papapanagiotou ve ark, 2002).

Standart çözeltilerin ekstraksiyonları için bir seri cam tüpe 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0 ve 80.0 mg miktarlarda sülfaklorpidazin+trimetoprim ve sülfamezatin+trimetoprim çözeltisi (diklormetanda hazırlanan 1.0 g/100 ml stok çözeltiden) katıldı ve üzeri 3 N HCL ile 1.0 ml'ye tamamlandı. Çözeltilerin üst kısımdan 250 µl'si 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 3.8 M sodyum asetat çözeltisinden 250 µl eklenerek 15 saniye vortekslendi ve HPLC'de analizler yapıldı (Papapanagiotou ve ark, 2002).

Standart ilaveli boş doku numunelerinin ekstraksiyonları için ise kontrol grubundan alınan numunelerin homojenizasyonu öncesinde tüplere 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0 ve 80.0 mg miktarlarda sülfaklorpidazin+trimetoprim ve sülfamezatin+trimetoprim çözeltisi (diklormetanda hazırlanan 1.0 g/100 ml stok çözeltiden) ilave edildi. Numunelere aynı ekstraksiyon prosedürü uygulandı ve HPLC'de analizleri yapıldı (Papapanagiotou ve ark, 2002).

3.2.5. HPLC analizleri

Sülfonamid ve trimetoprim analizleri photo diyote array dedektör ve C18 ters faz kolon (ACE 121-2546, 250x4.6 mm) donanımlı HPLC'de % 10'luk ortofosforik asitle pH'ı 3' ayarlanmış metanol:su taşıyıcı sistemi (60:40) kullanılarak (1.8 ml/dakika akış hızında) yapıldı (Papapanagiotou ve ark, 2002).

3.2.6. Verilerin analizi

Verilerin analizleri SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Veriler tek yönlü varyans analiziyle (ANOVA) değerlendirildi ($p < 0.05$). Gruplar arası farklılıklar ise DUNCAN's testiyle belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Analitik yöntem

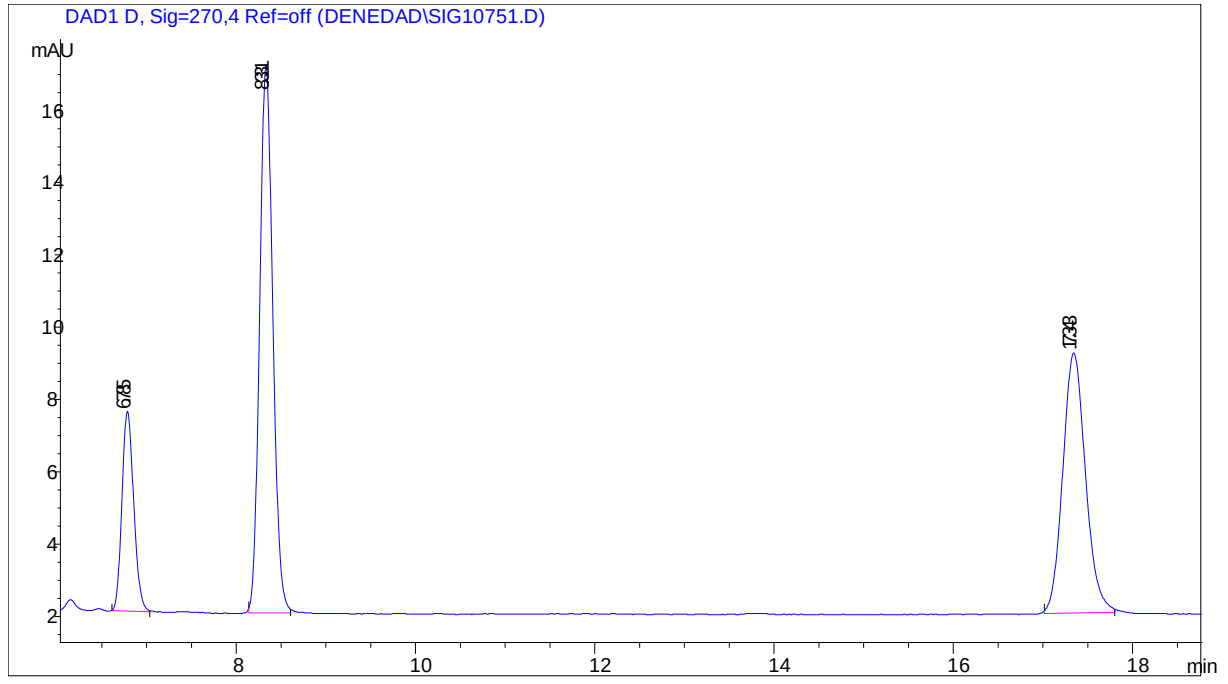
İlaçlara ait analitik değerler Tablo 1 ve Tablo 2’de verildi. İlaçlara ait kromatogramlar Şekil 4 ve Şekil 5’de verildi.

Tablo 1. SCP+TMP karışımlarına ait analitik değerler

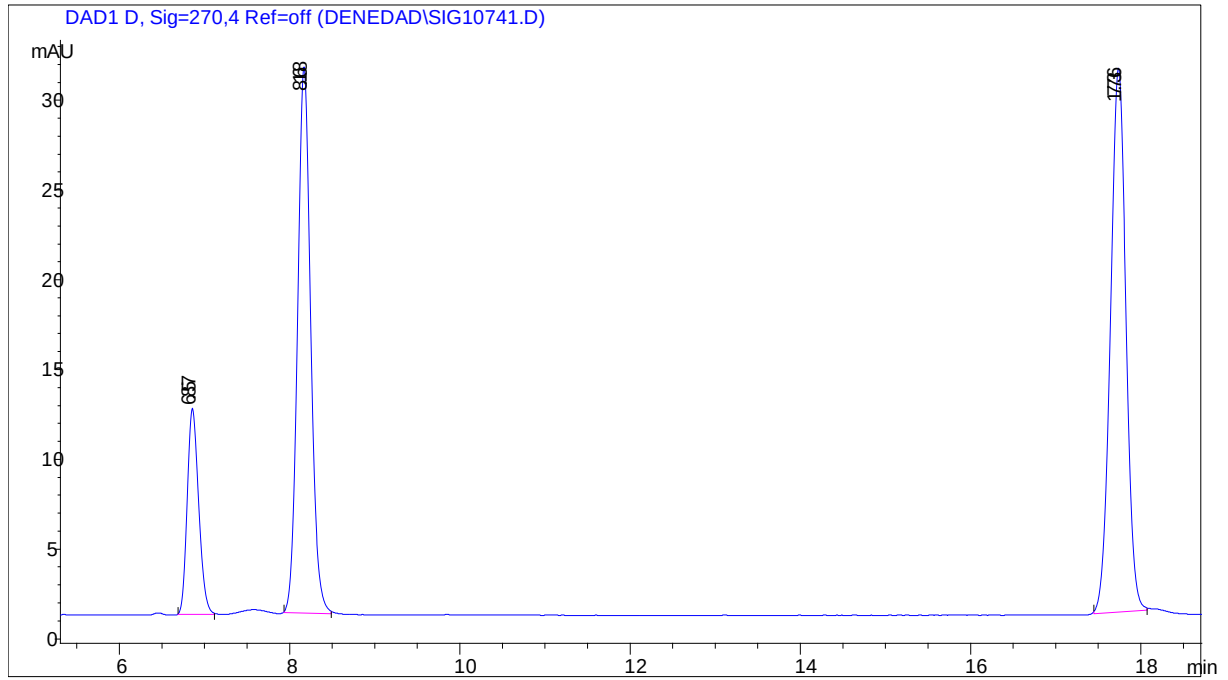
	Geri kazanım	Korelasyon katsayısı	Tespit sınırı (LOD) (µg/g)	Tayin sınırı (LOQ) (µg/g)
SCP GÖĞÜS	93.25±4.46	0.99922	0.857804	2.859347
SCP KARACİĞER	87.95±4.5	0.99926	0.739385	2.464616
TMP GÖĞÜS	97.55±3.58	0.99232	0.255378	0.851261
TMP KARACİĞER	95.38±6.15	0.99833	0.390938	1.303127
SCP HAŞLAMA SUYU	98.12±6.51	0.99933	0.512471	0.812571
TMP HAŞLAMA DOKUSU	98.87±7.49	0.99948	0.432747	0.502639

Tablo 2. SMZ+TMP karışımlarına ait analitik değerler

SMZ GÖĞÜS	90.13±4.85	0.99234	0.161996	0.539988
SMZ KARACİĞER	96.6±3.82	0.99889	0.120655	0.402183
TMP GÖĞÜS	92.5±4.39	0.99904	0.685197	2.28399
TMP KARACİĞER	98.08±4.28	0.99950	0.549465	1.83155
SMZ HAŞLAMA SUYU	98.91±5.12	0.99874	0.152171	0.362941
TMP HAŞLAMA DOKUSU	98.31±6.35	0.99883	0.331513	0.488521



Şekil 4. TMP, SMZ ve SCP ilaveli (50 µg/ml) göğüs dokusunun 270 nm'deki kromatogramları



Şekil 5. TMP, SMZ ve SCP ilaveli (50 µg/ml) karaciğer dokusunun 270 nm'deki kromatogramları

4.2. Deneyisel bulgular

4.2.1. SCP-TMP

SCP-TMP verilen grupta göğüs eti SCP düzeyleri çiğ dokuda 49.1 µg/g, 30 gün dondurulmuş çiğ dokuda 48.93 µg/g, 45. gün dondurulmuş çiğ dokuda 48.14 µg/g, ızgara edilmiş dokuda 25.33 µg/g ve haşlanmış dokuda 21.46 µg/g olarak bulundu; haşlama suyunda ise SCP kalıntısı tespit edilemedi.

Göğüs eti numuneleri TMP düzeylerinin ise çiğ dokuda 1.91 µg/g, 30 gün dondurulmuş çiğ dokuda 1.8 µg/g, 45. gün dondurulmuş çiğ dokuda 1.84 µg/g, ızgara edilmiş dokuda 1.48 µg/g, haşlanmış dokuda 1.15 µg/g ve haşlama suyunda 1.83 µg/ml olduğu belirlendi.

Göğüs dokularında gerek SCP gerekse TMP düzeyleri kıyaslandığında, çiğ dokuya göre değişimlerin ızgara, haşlama doku ve haşlama su değerlerinde istatistiksel olarak azalma yönünde seğrettiği gözlemlendi ($p<0.05$).

Karaciğer SCP düzeyleri çiğ dokuda 60.31 µg/g, 30 gün dondurulmuş çiğ dokuda 61.87 µg/g, 45. gün dondurulmuş çiğ dokuda 60.91 µg/g, ızgara edilmiş dokuda 20.97 µg/g ve haşlanmış dokuda 27.33 µg/g olarak bulundu; haşlama suyunda SCP kalıntısı tespit edilemedi. Çiğ karaciğer dokusuna göre SCP düzeylerinin ızgara, haşlama dokusu ve haşlama suyunda istatistiksel olarak azaldığı belirlendi ($p<0.05$).

Tablo 3. Farklı pişirme ve dondurma işlemleri sonrası doku SCP ve TMP düzeyleri (µg/g)

	GÖĞÜS		KARACİĞER	
	SCP	TMP	SCP	TMP
ÇİĞ	49.10±7.26 ^c	1.91±0.19 ^d	60.31±10.47 ^c	1.56±0.67 ^b
DON-30	44.93±10.63 ^c	1.8±0.21 ^{cd}	61.87±7.24 ^c	1.52±0.33 ^b
DON-45	48.14±10.03 ^c	1.84±0.24 ^{cd}	60.91±11.62 ^c	1.59±0.63 ^b
IZG	25.33±3.66 ^b	1.48±0.24 ^{bc}	20.97±8.53 ^b	1.34±0.41 ^b
HAŞL-DOK	21.46±3.68 ^b	1.15±0.57 ^b	27.33±5.84 ^b	0.97±0.07 ^{ab}
HAŞL-SU	00.00±00.00 ^a	0.68±0.04 ^a	00.00±00.00 ^a	0.57±0.05 ^a
HAŞ-DOK+SU	21.46±3.68 ^b	1.83±0.61 ^{cd}	27.33±5.84 ^b	1.54±0.12 ^b

Karaciğer dokusu TMP düzeylerinin çiğ dokuda 1.56 µg/g, 30 gün dondurulmuş çiğ dokuda 1.52 µg/g, 45. gün dondurulmuş çiğ dokuda 1.59 µg/g, ızgara edilmiş dokuda 1.34 µg/g, haşlanmış dokuda 0.97 µg/g ve haşlama suyunda 0.57 µg/ml olduğu gözlemlendi. Karaciğer TMP düzeyleri incelendiğinde çiğ dokuya göre sadece haşlama suyu değerinde istatistiksel olarak önemli azalmanın olduğu belirlendi ($p<0.05$).

4.2.2. SMZ-TMP

SMZ-TMP grubunda göğüs eti SMZ düzeyleri çiğ dokuda 49.21 µg/g, 30 gün dondurulmuş çiğ dokuda 48.93 µg/g, 45. gün dondurulmuş çiğ dokuda 48.64 µg/g, ızgara edilmiş dokuda 38.11 µg/g ve haşlanmış dokuda 24.84 µg/g ve haşlama suyunda 15.71 µg/ml olarak belirlendi. Çiğ dokuya göre ızgara, haşlama doku ve haşlama su SMZ düzeylerindeki azalmanın önemli olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

Göğüs eti numuneleri TMP düzeyleri çiğ dokuda 2.21 µg/g, 30 gün dondurulmuş çiğ dokuda 2.24 µg/g, 45. gün dondurulmuş çiğ dokuda 2.19 µg/g, ızgara edilmiş dokuda 1.83 µg/g, haşlanmış dokuda 1.25 µg/g ve haşlama suyunda 0.91 µg/ml olarak bulundu. Göğüs dokusu TMP düzeylerinin çiğ dokuya göre haşlama dokusu ve haşlama suyunda istatistiksel olarak azalma şeklinde seğrettiği belirlendi ($p<0.05$).

Karaciğer SMZ düzeyleri çiğ dokuda 47.75 µg/g, 30 gün dondurulmuş çiğ dokuda 44.33 µg/g, 45. gün dondurulmuş çiğ dokuda 41.97 µg/g, ızgara edilmiş dokuda 33.23 µg/g ve haşlanmış dokuda 26.23 µg/g olarak bulundu; haşlama suyunda ise 14.11 µg/ml SMZ kalıntısı tespit edildi. Çiğ dokuya göre SMZ düzeylerindeki değişimlerin haşlama doku ve haşlama suyunda azaldığı belirlendi ($p<0.05$).

Tablo 4. Farklı pişirme ve dondurma işlemleri sonrası doku SMZ ve TMP düzeyleri (µg/g)

	GÖĞÜS		KARACİĞER	
	SMZ	TMP	SMZ	TMP
ÇİĞ	49.21±6.2 ^c	2.21±0.32 ^c	47.75±8.44 ^c	6.72±0.91 ^c
DON-30	48.93±7.02 ^c	2.24±0.44 ^c	44.33±13.11 ^c	6.95±3.11 ^c
DON-45	48.64±4.78 ^{bc}	2.19±0.20 ^c	41.97±7.18 ^c	6.88±2.44 ^c
IZG	38.11±9.55 ^b	1.83±0.16 ^{bc}	33.23±3.30 ^{bc}	5.21±0.87 ^{ab}
HAŞL-DOK	24.84±4.26 ^a	1.25±0.16 ^{ab}	26.23±4.31 ^{ab}	3.37±0.98 ^{ab}
HAŞL-SU	15.71±1.65 ^a	0.91±0.34 ^a	14.11±3.89 ^a	2.48±0.74 ^a
HAŞ-DOK+SU	40.55±6.53 ^{bc}	2.16±0.50 ^c	40.34±8.20 ^c	5.85±1.72 ^{bc}

Karaciğer dokusu TMP düzeyleri çiğ dokuda 7.32 µg/g, 30 gün dondurulmuş çiğ dokuda 6.95 µg/g, 45. gün dondurulmuş çiğ dokuda 6.88 µg/g, ızgara edilmiş dokuda 5.21 µg/g, haşlanmış dokuda 3.37 µg/g ve haşlama suyunda 2.48 µg/ml olarak tespit edildi. Karaciğer TMP düzeyinin ise çiğ dokuya göre ızgara, haşlama doku ve haşlama suyunda azalma şeklinde olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Yöntem

Kowalski ve ark. (2004) hindi dokularında SCP analizi ile ilgili geliştirdiği metodunda numuneleri asetonitrille deproteinize etmiş, takiben asetonitrili hekzanla muamele etmiş; ardından diklormetan-fosfat tampon çözeltisi ile ikinci bir ekstraksiyon ve azot gazı altında uçurma yapılarak HPLC'ye uygulanabilecek temizlikte örnekler elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise dokular diklormetanla ekstraksiyona tabi tutulmuş, filtre kağıdı ile süzölmeyi takiben 3 N HCl ile muamele edilmiş ve 3.8 M sodyum asetat çözeltisi ile pH düzenlenmiş, sonuç olarak daha kolay bir ekstraksiyon prosedürü ile HPLC'ye uygulanabilecek saflıkta numuneler hazırlanmıştır. Yöntemin bu yönüyle kolay uygulanabilir ve kısa sürede sonuç alınabilir olduğu söylenebilir.

Sülfonamidlerin HPLC ile analiz yöntemlerinde dalga boyu 270 nm seçilmektedir (Kowalski ve ark, 2004; Perocelli ve ark, 2004; Agarwal, 1992). Trimetoprimin pik şiddetinin 229 ve 240 nm dalga boylarında 270 nm'ye göre daha iyi olduğu bildirilse de (Mengellers ve ark, 1993) sülfonamid ve trimetoprimin birlikte analizlerinde 270 nm dalga boyu tercih edilmektedir (Dagorn ve Delmas, 1994; Papapanagiotou ve ark, 2000; Agarwall, 1992). Bu çalışmada da SCP, SMZ ve TMP analizleri belirtilen dalga boyunda gerçekleştirildi (Şekil 1-4). Önceki çalışmalarda mobil faz olarak % 20'lik asetonitril, diklormetan-fosfat tampon gibi çözeltiler; C18, C4, C8 gibi kolonlar kullanılmış, yaklaşık 13 dakikalık alıkonulma zamanında pikler alınabilmiştir (Kowalski ve ark, 2004). Bu çalışmada ise % 10'luk ortofosforik asitle pH'ı 3' ayarlanmış metanol:su taşıyıcı sistemi (60:40) kullanılarak yaklaşık 6.7 dakikada TMP, 8.3 dakikada SMZ ve 17.7 dakikada SCP pikleri alınmıştır. SCP'nin alıkonulma zamanı diğer çalışmalara göre uzun olsa da, SMZ, SCP ve TMP piklerinin farklı zamanlarda alınması ve pik şiddetinin yeterli olması yöntemin avantajı olarak değerlendirilebilir.

Kowalski ve ark. (2004) çalışmalarında SCP için R^2 değerini 0.9997, geri kazanım oranını 72.8 olarak bildirmişlerdir. Papapanagiotou ve ark (2000) ise geri kazanım oranını dokulara göre sülfadiazin için % 77.8-87.4 arasında, TMP için % 66.7-83.1 arasında bulmuşlardır. Bu çalışmada ise hem SCP hem de SMZ için daha yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Kalıntı çalışmalarında kullanılan yöntemlerin kabul edilebilirliğinde, geri kazanımın % 70 ve üzerinde olması (Taydaş ve Aşkın 1995); analitik çalışmalarda korelasyon katsayısının (r^2) 1 değerine çok yakın olması istenir (Gündüz 1998). Bu çalışmada elde edilen geri kazanım ve korelasyon katsayıları seçilen yöntemin tavuk kas ve karaciğer dokularında SCP, SMZ ve TMP analizleri için kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır.

5.2. SCP-TMP

Hindilerde SCP uygulamasını takiben kas dokusunda SCP kalıntısının deri, karaciğer ve böbreğe göre daha hızlı elimine edildiği (sırasıyla 7, 12 ve 18. gün); 1 gün SCP uygulanan hindilerde en yüksek doku yoğunluğunun KC'de olduğu (32,3 µg/kg) bildirilmiştir (Kostadinovicet ve ark, 1999). Bu çalışmada da en yüksek SCP düzeyleri KC örneklerinde belirlenmiştir. Çalışma sonuçları SCP'nin KC dokusunda birikiminin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

Göğüs dokularında gerek SCP gerekse TMP düzeyleri kıyaslandığında, çiğ dokuya göre değişimlerin ızgara, haşlama doku ve haşlama su değerlerinde azalma yönünde seyrettiği; haşlama doku ve haşlama suyu toplam SCP düzeyinin de çiğ dokuya göre azalmış olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Haşlama suyunda ise SCP kalıntısı belirlenememiştir. Çalışma sonuçları ızgara ve haşlama işlemlerinin göğüs SCP, ızgara işleminin ise TMP kalıntısını azaltıcı etkileri olduğunu göstermektedir. SCP'nin haşlama suyunda bulunamaması, ilacın suya geçişinin zayıf olması, ilacın su ve ısı etkisinde yıkımlanması veya farklı metabolitlere dönüşmesi ile ilişkili olabilir.

Çalışmada çiğ karaciğer dokusuna göre SCP düzeylerinin ızgara ve haşlama dokusunda istatistiksel olarak azaldığı ($p<0.05$), haşlama suyunda ise ölçülebilir düzeylerde SCP kalıntısı bulunmadığı belirlendi. Çalışma sonuçları karaciğer SCP kalıntıları üzerine ızgara ve haşlamanın azaltıcı etkileri olduğunu göstermektedir.

Karaciğer TMP düzeyleri incelendiğinde çiğ dokuya göre sadece haşlama suyu değerinde istatistiksel olarak önemli azalmanın olduğu ($p<0.05$) görülmekle birlikte haşlama doku ve haşlama suyu toplam TMP düzeyi ile çiğ karaciğer dokusu TMP düzeyleri arasında önemli bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Bu sonuçlar karaciğer TMP düzeylerinin derin dondurucuda saklama, ızgara ve haşlama işlemlerinden önemli düzeyde etkilenmediğini göstermektedir.

5.3. SMZ-TMP

Çalışmada çiğ dokuya göre 30 ve 45 gün dondurulan göğüs dokulardaki SMZ düzeylerinde önemli bir değişimin olmadığı ($p>0.05$); ızgara, haşlama doku ve haşlama su SMZ düzeylerindeki azalmanın önemli olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Bu sonuçlar derin dondurucuda saklamanın göğüs SMZ kalıntıları üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını; ancak ısı işlemlerin (ızgara ve haşlama) gören göğüs dokularındaki SMZ düzeyini azaltıcı yönde etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Haşlama suyunda ise tespit edilebilir SMZ

kalıntısına rastlanamayışı, dokudan suya geçişin zayıf olması ve suya geçen SMZ kalıntılarının ısı etkisi ile yıkımlanması ile ilişkili olabilir.

Çalışmada göğüs dokusu TMP düzeylerinin çiğ dokuya göre haşlama dokusu ve haşlama suyunda istatistiksel olarak azalma şeklinde seyrettiği görülmektedir ($p<0.05$). Ancak haşlama dokusu ve haşlama suyundaki toplam TMP düzeyi ile çiğ doku TMP düzeyi arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Bu durum TMP kalıntıları üzerine dondurma ve pişirme işlemlerinin önemli bir etkisi olmadığını göstermektedir. Haşlama suyunda ölçülebilir SMZ kalıntısına rastlanmazken, TMP'nin haşlama suyuna geçtiği görülmektedir. Bu durum TMP'nin SMZ'ye göre ısı etkisine daha dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Çalışmada çiğ dokuya göre karaciğer haşlama doku ve haşlama suyu SMZ düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Her ne kadar haşlama dokusu ve suyundaki toplam SMZ düzeyleri çiğ dokuya göre azalsa da bu azalma istatistiksel açıdan önemli bulunamamıştır. Bu durum karaciğer dokusundaki SMZ kalıntıları üzerine derin dondurucuda saklama ve ızgara işlemleri gibi haşlamanın da önemli bir etkisinin bulunmadığını ortaya koymaktadır.

Karaciğer TMP düzeyinin çiğ dokuya göre ızgara, haşlama doku ve haşlama suyunda azaldığı ($p<0.05$), ancak haşlama dokusu ve haşlama suyu toplam TMP düzeyleri ile çiğ doku TMP düzeylerinde anlamlı bir değişimin olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). Bu sonuçlar ızgara işleminin karaciğerde TMP düzeyini azaltıcı etkili olduğunu, dondurarak saklama ve haşlama işleminin ise anlamlı bir değişime yol açmadığını göstermektedir.

Yapılan literatür araştırmalarında, pişirme, dondurma vb. işlemlerin yenilebilir dokulardaki sülfonamid kalıntıları üzerine etkilerine yönelik bazı çalışmaların bulunduğu gözlenmiştir:

Lawrence ve ark (1992) domuz dokularındaki sülfametazin kalıntıları üzerine pişirme işlemlerinin etkisini incelemişler, pişmiş ve çiğ dokulardaki sülfamezatin miktarlarının arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığını belirlemişlerdir. Rose ve ark (1995) da dışarıdan sülfametazin katılan domuz dokularını haşlama, kızartma, ızgara işlemlerine tabi tutmuşlar ve Lawrence ve ark. araştırmasıyla benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Dehai ve ark (1996) kedi balıklarının dokularındaki ormetoprim ve sülfadimetoksin kalıntıları üzerine pişirme işlemlerinin etkisini incelemişler ve çiğ dokulara göre, pişirme sonrası dokulardaki ormetoprim kalıntılarının % 54, sülfadimetoksin kalıntılarının ise % 46.1 oranında azaldığını belirlemişlerdir. Furusawa ve Hanabusa (2002) tavukları 3 hafta boyunca 100 mg/kg miktarda sülfadiazin, sülfametoksazol, sülfamonometoksin ve sülfakinoksalin içeren yemle beslemişler ve kesim sonrası elde edilen dokulardaki sülfonamid kalıntılarını çiğ dokulara göre kıyaslamışlardır. Çalışma sonucunda, kaynatma işlemi sonucu tüm sülfonamidlerde %

45-61; kızartma işlemiyle sülfametoksazol, sülfamonometoksin ve sülfakinoksalinde % 38-40; mikrodalga pişirmede % 35-41 oranında azalma olduğunu gözlenmiştir. Dehai ve ark (1996), Baydan ve ark (2001) kanatlı dokularındaki sülfadiazin kalıntıları üzerine pişirme, dondurma ve benzeri işlemlerin etkileri üzerine yaptıkları araştırmada, çeşitli pişirme ve -20 C'de farklı sürelerde bekletme işlemlerinin, dokulardaki sülfadiazin kalıntılarını değişik oranlarda azalttığını belirlemişlerdir. Baydan ve ark (2002) tarafından yapılan bir diğer araştırmada ise etlik piliç dokularında farklı pişirme işlemlerinin sulfadimetoksin, sülfakinoksalin ve sülfadoksin kalıntıları üzerinde belirgin bir azalmaya neden olduğunu; derin dondurucuda farklı sürelerde bekletmede ise sülfadoksin ve sülfakinoksalin kalıntılarında istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğu görülmüştür.

Pişirme ve dondurma işlemlerinin sülfaklorpidazine etkileriyle ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Thomas ve ark (1997) dışarıdan sülfaklorpidazin kattıkları domuz karaciğerini -20 C'de bekletmişler ve ilacın 312 gün stabilitesini koruduğunu belirlemişlerdir.

Pişirme metodlarının dokulardaki antibiyotik kalıntılarını azaltıcı etkileri, dokudan kaynama suyuna ilaç geçişi, ızgara gibi işlemler sonucu dokulardaki su kaybı ile ilgili olduğu gözlenmiştir (Rose ve ark, 1995). Pişirme işlemlerinde kullanılan dokuların büyüklüğü de kalıntı miktarını önemli ölçüde değiştirebilmektedir (Furusawa ve Hanabusa, 2002).

Çeşitli pişirme ve saklama işlemlerinin dokularda antibiyotik kalıntıları üzerine etkilerine yönelik yapılan çalışmalar, bu işlemlerin antibiyotik kalıntılarını tamamen yokemediğini, ancak belli bir kısmını azalttığını göstermektedir. Özellikle yüksek ısıda ve uzun süreli pişirme ile gıdalardaki antibiyotik kalıntıları insan sağlığı için güvenli limitlere inse de, pişirme sonrası oluşabilecek metabolitlerin insan sağlığı üzerindeki etkilerinin de incelenmesi yararlı olabilecektir (Javadi ve ark., 2009).

Evcil hayvanlarda hastalıkların sağaltımı, önlenmesi ve verim artırıcı amaçla pek çok ilaç ve kimyasal madde kullanılmaktadır. Bu maddelerin hatalı ilaç kullanımı, ette kesim öncesi bekletme sürelerine, yumurta ve sütte ise tüketilmeme sürelerine uyulmaması gibi nedenlerle tüketime sunulan hayvansal ürünlerde kalıntıların bulunabildiği bilinmektedir. Hayvansal ürünleri tüketen insan ve evcil hayvanlarda bu kalıntılar alerji, karsinojenite, teratojenite ve bakterilerde direnç gelişimi gibi çeşitli istenmeyen etkilere sebep olabilmektedir. Çeşitli uluslararası (FAO, WHO) ve ulusal kuruluşlar (Sağlık ve Tarım Bakanlıkları) hayvansal ürünlerdeki kalıntıların insan sağlığına yönelik istenmeyen etkilerini azaltmak için kesim öncesi bekletme süresi, süt ve yumurta gibi ürünler için tüketilmeme süresi, kabul edilebilir günlük alım, tolerans düzeyi, hatta karsinojen etkileri olabilecek ilaçlar için sıfır tolerans düzeyi gibi çeşitli düzenlemeler yapmışlardır. Ancak pek çok ilaç ve diğer kimyasal maddelerin bekletme sürelerinin uzun olması ve bu süre zarfında hayvansal ürünlerle sürekli

olarak atılması, ekonomik yönden de önemli olan bu ürünler için yapılan düzenlemelere sürelerine uyulmasını sınırlandırmaktadır. Bunlara ilaveten ilaç kalıntısı içeren hayvansal dokuların, süt ve yumurta gibi ürünlerin imhası konusunda devlet kurumları tarafından tazminat ödenmemesi, belirtilen resmi koruyucu önlemlere karşın piyasada tüketime sunulan ürünlerde kalıntı bulunma olasılığını artırmaktadır. Belirtilen sebeplerden ötürü hayvansal ürünlerde bulunan kalıntıların etkisizleştirilmesi için farklı yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan araştırmalar ve bu çalışma ile varılan sonuçlar hayvansal ürünlerde çeşitli haşlama ve ızgara gibi çeşitli pişirme işlemleriyle, farklı derecede ve sürede soğukta depolamanın ilaç kalıntılarında azalmaya sebep olabileceğini göstermektedir (Baydan ve ark, 2001; Baydan ve ark, 2002; Şanlı, 1995; Kaya ve ark, 2000). Konu ile ilgili yapılan çalışma sonuçları değerlendirildiğinde dokulardaki sülfonamid ve trimetoprim kalıntılarının farklılık gösterdiği; daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi sonuçlardaki farklılıkların hayvanların yaşı, ırkı, cinsiyeti, hastalık durumu, ilacın çözünürlüğü, stabilitesi, farmakokinetiğine, ilaç formülasyonlarına, ilaç uygulanma/verilme yollarına, ilacın verilme süresine, farklı pişirme ve saklama yöntemlerine, pişirme ve saklama süreleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Lawrence ve ark, 1992, Baydan ve ark, 2001, Baydan ve ark, 2002).

Hem ilaçların biyotransformasyonu hem de pişirme ve saklama esnasında, daha zararlı metabolitlerin de oluşabileceği, bu nedenle risk değerlendirmesinin ilaçların metabolitleri yanında pişirilen ve bekletilen ürünlerde oluşabilecek metabolitleriyle de yapılması gerekliliği belirtilmektedir (Lawrence ve ark, 1992). Bu nedenle benzeri çalışmaların farklı koşullara göre ve oluşan metabolitler de göz önüne alınarak daha detaylı bir şekilde yapılması gerekmektedir.

Hayvansal dokularda SCP'nin bulunmasına izin verilen limit 100 ng/g; SCP ve TMP içeren Cosumix Plus formülasyonu için tavuklarda kesim öncesi bekletme süresi 4 gün olarak olarak belirlenmiştir (Anonymus, 2000). Türk Gıda Kodeksinde (Anonim, sülfonamidler ve trimetoprimin dokularda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı limitleri bildirilmiştir. TKG tebliğine göre kas, deri+yağ, karaciğer ve böbrekte bu değer trimetoprim için 50 mikrogram/kg, sülfonamidler için ise 100 mikrogram/kg olarak verilmiştir (Anonymus, 2002). Bu çalışmada bulunan değerler belirtilen ilaçlar için verilen değerlerin üzerinde seyretmektedir. Bu durum, çalışmada ilaçların 5 gün boyunca tedavi edici dozlarda verilmesi, 5. günün sonunda kesim öncesi bekletme süresi gözetilmeksizin kesim yapılması ile ilişkilidir. Benzeri çalışmalarda sonuçlarının kalıntı riski yönünden değerlendirilebilmesi için, ilaç uygulamasının tamamlanmasını takiben kesim öncesi bekletme süresi sonrasında hayvanların kesilmesi ve analizlerin yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, haşlama ve ızgara işlemlerinin broyler dokularında sulfaklorpidazin, sulfamezatin ve trimetoprim kalıntılarında değişik oranlarda azalmaya neden olduğu; dokuları derin dondurucuda bekletmenin ise bu ilaçların kalıntılarında önemli bir değişime yol açmadığı belirlendi.

6. KAYNAKLAR

Agarwal, V. (1992) High-performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. *Journal of Chromatography*, 30, 411–423.

Anonymous. (2000) FDA Animal Drugs: NADA Nr. 031-553, Drug Information Laboratory, Virginia/Maryland, Regional College of Veterinary Medicine, Blacksburg, Virginia, USA, ISSN 1064-0258.

Anonymus (2002) Türk gıda kodeksi hayvansal gıdalarda bulunabilecek farmakolojik aktif maddelerin sınıflandırılması ve maksimum kalıntı limitleri yönetmeliği. Yetki Kanunu: 5996, Yayımlandığı R.Gazete: 04.05.2012-28282

Appelgate, J. (1983) Clinical pharmacology of sulfonamides. *Mod. Veterinary Practice*, 6, 153–156.

Baydan E ve ark (2002) Etlik piliçlerde kullanılan çeşitli veteriner ilaçlarının kalıntıları üzerine pişirme, dondurma ve benzeri işlemlerin etkilerinin araştırılması, *Etlik Vet Mikrob Derg*, 13(1): 56-65.

Baydan E, Özdemir M ve Kanbur M (2001) Kanatlı dokularındaki sülfadiazin kalıntıları üzerine pişirme, dondurma ve benzeri işlemlerin etkileri, *Çiftlik*, 203: 81-90

Chambers, H.F. & Jawetz, E. (1998) Sulfonamides, trimethoprim, and quinolones, In *Basic and Clinical Pharmacology*, Ed. Katzung, B.G., pp., 761–763. Appleton-Lange, Los Angeles.

Dagorn M ve Delmas JM (1994) Methods for assay of trimethoprim and sulfadiazine in broiler tissues using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 285:353-358.

Dehai X et al (1996) Effect of cooking on residues of ormetoprim and sulfadimethoxine in the muscle of channel catfish, *Food Res Int*, 29(3-4): 339-344.

Furusawa N and Hanabusa R (2002) Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle, *Food Res Int*, 35:37-42.

Gündüz S (1998) Kimyacılar için istatistik, Gazi Kitabevi, Ankara

Javadi A, Mirzaie H, Khatibi SA (2011) Effects of roasting, boiling and microwaving cooking method on sulfadiazine + trimethoprim residues in edible tissues of broiler by microbial inhibition method. *African Journal of Microbiology Research*, 5(1):16-19.

Kaya S ve ark (2000) Sülfonamidler, *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji*, 375-390, Medisan, Ankara

Kostadinovic, L., Pavkov, F., Gaál, F (1999) An improved method for the determination of sulphachloropyrazine in meat and liver of broilers during and after their treatment for coccidiosis. *Acta Alimentaria*, 28, 311–319.

Kowalski, C., Roliński, Z., Burmańczuk, A., Krasucka, D., Wrona, Z. & Krakowski, L (2004) Ustalenia biorównoważności preparatu sulfonamidowego potencjalizowanego trimetoprimem Ditrivet solutio w porównaniu z preparatem referencyjnym u kur brojlerów. *Medycyna Weterynaryjna*, 60, 1106–1109.

Lawrence, JF., Andrew, JT., Zabik, ME., Booren, AM., Poppenga, RH., Chapman, KJ (1992) Sulfamethazine and its metabolites in pork: Effects of cooking and gastrointestinal absorption of residues, *J Agric Food Chem*, 40, 1677-82.

Mengellers MJB, Polman AMM, Aerts MML, Kuiper HA, Van Miert ASJPAM (1993) Determination of sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, trimethoprim and their main metabolites in lung and edible tissues from pigs by multi-dimensional liquid chromatography. *J Liq Chromatography*, 16, 1, 257-278.

Moats WA (1988) Inactivation of antibiotics by heating in foods and other substrates-a review, *J Food Protec*, 51, 6, 491-97.

Nouws, J., Mevius, D., Vree, T., Baakman, M. & Degen, M. (1988) Pharmacokinetics, metabolism, and renal clearance of sulfadiazine, sulfamerazine, and sulfamethazine and of their N4-acetyl and hydroxyl metabolites in calves and cows. *American Journal of Veterinary Research*, 49, 1059–1065.

Papapanagiotou EP, Iossifidou EG, Psomas IE, Photis G (2000) Simultaneous HPLC determination of sulfadiazine and trimethoprim in cultured gilthead sea bream (*Sparus Aurata*, L.) tissues. *J Liq Chrom & Rel Technol*, 23, 18, 2839-2849.

Papapanagiotou EP, Batzias GC, Iossifidou EG and Psomas IE (2002) Sulfadimethoxine and Ormethoprim residue study in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.), *Revue Med Vet*, 153, 10, 669-674.

Paulson, G., Feil, V., Zaylskie, R., Giddings, J. & Slanger, W (1994) Depletion of residues from milk and blood of cows dosed orally and intravenously with sulfamethazine. *Journal – Association of Official Analytical Chemists*, 77, 895–900.

Pecorelli, R., Bibi, L., Fioroni, R. & Galarini, I (2004) Validation of confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, 1032, 23–29.

Plumb, D. (1991) *Veterinary Drug Handbook*. Pharma Vet Publishing, White Bear Lake, MN. pp. 520–529.

Posyniak, A., Żmudzki, J. & Mitrowska, K. (2005) Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscles by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1087, 259–264.

Prescott, J. & Baggott, J. (1993) *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 119–126.

Riviera JE ve Papich MG (2009) Sulfonamides and potentiated sulfonamides, in: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, p:835-863.

Riviere, J., Craigmill, A.L., Sundlof, SF (1991) *Handbook of Comparative Pharmacokinetics and Residues of Veterinary Antimicrobials*. RCR Press, Inc., Boca Raton, FL, pp. 339–407.

Romváry, A., Horvay, M.S. (1976) On the pharmacokinetics of sulphonamide + trimethoprim combination orally administered to geese. *Acta Veterinaria Academia Scientarum Hungaricae*, 26, 173–182.

Rose MD, Shearer G, Farrington WHH (1995) The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 1. Clenbuterol. *Food Addit Contam*, 12, 67-76.

Rose MD, Farrington WH, Shearer G (1995) The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 3. Sulphamethazine (sulphadimidine). Food Addit Contam, 12, 6, 739-50.

Rosselet, A., Basler, W., Schluep, J., Heim, H (1981) Chemotherapeutic activity of the combination of sulfachlorpyridazine and trimethoprim against experimental colibacillosis of chickens and piglets and demonstration of the trimethoprim-induced potentiation of sulfachlorpyridazine in vitro and in vivo. Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 123, 401–417.

Sieiro, F., Meier, F.A (1973) Activity of sulphachloropyridazine against experimentally induced E. coli infection in broiler chickens. Veterinary Record, 49, 303–310.

Şanlı Y (1995) Hayvansal üretimde antibakteriyel ilaç kullanımı ve çok yönlü sakıncaları, Türkiye’de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ankara

Şanlı Y (1999) Sülfonamidler, Veteriner Klinik Farmakoloji ve İlaçla Sağaltım Seçenekleri, 834-859, Ankara

Taydaş EE ve Aşkın O (1995) Kırmızı biberlerde aflatoxin oluşumu, Gıda, 20, 1, 3-8

Thomas GK et al (1997) Stability of sulfonamide antibiotics in spiked pig liver tissue during frozen storage, J AOAC Int, 80, 5, 988-95.

Wang, S., Zhang, H.Y., Wang, L., Duan, Z.J. & Kennedy, I (2006) Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review. Food Additives Contaminants, 23, 362–384.

Woodward, N (1991) Hypersensitivity in humans and exposure to veterinary drugs. Veterinary and Human Toxicology, 33, 168–172.