

Journal of Food and Health Science

E-ISSN 2149-0473

ORIGINAL ARTICLE/ORİJİNAL ÇALIŞMA

FULL PAPER

TAM MAKALE

DEĞİŞİK İŞLEME PROSELERİNİN BROİLERLERDE KULLANILAN LASALOSİT KALINTI DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Namık BİLİCİ

Karabük Üniversitesi, Sağlık Yüksek Okulu, Beslenme ve diyetetik Bölümü Balıklar Kayası Mevkii, Karabük, Türkiye

Received: 30.11.2014

Accepted: 16.12.2014

Published online: 20.12.2014

Corresponding author:

Namık BİLİCİ, Karabük Üniversitesi, Sağlık Yüksek Okulu, Beslenme ve diyetetik Bölümü Balıklar Kayası Mevkii, Karabük, Türkiye

E-mail: namikbilici@gmail.com**Öz:**

Kanatlı *Koksidiyozisi eimeria* türlerinin neden olduğu önemli bir protozon hastalığıdır. Kanatlı endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Koksidiyozisin kontrolünde nikarbazin, halofuginon, robenidin, diklazuril, monensin, salinomisin, narasin, lasalosit ve maduramisin gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Kullanılan ilaçların kalıntıları izlenmesi ve gerekli önlemlerin alınması insan sağlığı açısından büyük bir önem taşımaktadır. Bu çalışmada İstanbul'da tüketime sunulan tavuk eti ve yumurtalardan aldığımız 150'şer adet numune de lasalosit kalıntı ve düzey izlemesi yapılmıştır. Genel olarak broilerlerdeki (tavuk) yedirme koşullarında lasalosit 75–125 µg/g ile sınırlandırılmıştır. Bu şartlarda yapılan yedirme denemeleri sonrasında 1. 3. ve 5. ve 7. günlerde alınan dokularda analizler yapılmış, 1. 3. 5. gün dokularındaki lasalosit kalıntı düzeyi önemli bulunmuştur. Kalıntı miktarı yüksek olan 1. 3. ve 5. gün dokuları kızartma, haşlama, +4°C muhafaza ve dondurmaya işleme ve depolama proseslerine tabi tutulmuştur. Sonuç olarak lasalosit giderek hızla azalan bir rezidüye sahip olduğu ve dokudaki kalıntılarının ısı işlemlerden etkilendikleri tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler:

Lasalosit, İyonofor antikoksidiyal ilaç, Kalıntı düzeyi, Isıl işlem

Abstract:**Effect of the Lasalosit used in Broilers and Different Heat Treatment Process on its Residual Levels**

Avian coccidiosis is an important disease caused by protozoa of the genus *Eimeria*. It leads to significant economic losses in the poultry industry. For control of coccidiosis in avian, using pharmacological active substance such as nikarbazin, halofuginon, robenidin, diclazuril, monensin, salinomycin, naracin, lasalocit and maduramicin. Residues of used drugs are significant for human healthy. In this study, we have taken from the poultry meat and eggs available for consumption in Istanbul with 150 specimens were screened for lasalosit. In general, the optimal feeding conditions has been limited 75-125 µg/g for lasalosit. After the feeding under these circumstances 1st, 3rd, 5th, and 7th day the tissues was analyzed. 1st, 3rd, 5th days detected tissue residues were considered important. High residue including which 1st, 3rd and 5th day tissues treated fried, boiled, held on +4°C and freezed. Consequently it was confirmed that lasolocid residue have decreasing and affected by heat treatment of residues in tissues.

Keywords:

Famagusta, coastal fishery, gillnet, trammel net, longline

Giriş

Koksidiyozis birçok hayvan türünde çok ciddi sağlık problemleriyle seyreden ve kanatlı hayvanlarda ölümlere kadar varabilen protozoonlardan kaynaklanan bir hastalıktır. Kanatlılarda alimenter yollardaki bozunumlar ishalden kanlı ishale ardından da ölümlere hatta sürü ölümlerine yol açabilmektedir. Eimeria türleri tarafından meydana getirilen, proventrikülden başlayarak kolona kadar olan emilim yollarının harabiyeti ve şiddetli ishale karakterize olan bu hastalığın tedavi edilmediği takdirde ölümle sonuçlanması kaçınılmazdır. Tedavisinde değişik antibiyotiklerin yanı sıra genelde antikoksidial olarak karboksilik iyonoforlar kullanılmaktadır (Parelman, 1993; Rokka, 2005).

Ulusal kalıntı kontrol planı 2007'de yapılan gruplandırma antikoksidial iyonoforlar "B2b" grubunda değerlendirilmiş olup buna ilişkin laboratuvar alt yapısı, analiz yetkinliği ve referans olarak Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (PVKAE) gösterilmiştir. Lasalosit için kontrol limitini izleme; tespit seviyeleri için 10 µg/kg, analizleri LC-MS ile doğrulama da LC-MS/MS ile 2 µg/kg düzeyleri olarak deklere edilmiştir (Bories, 2007; Resmi Gazete, 2007; GKGM, 2007).

Lasalosit özelliklerinden ve halk sağlığında direk kullanılmıyor olmasından ötürü Dünya Sağlık Örgütü (WHO) eksperlerince kritik önemde değerlendirilmiş dolayısıyla Office International des Epizooties (OIE) tarafından Veteriner Hekimlik açısından koksidiyozun kontrolünde çok önemli bir antibiyotik olarak listelenmiştir (EFSA, 2007; EFSA, 2004; Bishop, 1996; Jordan, 1990; Dubois, 2004).

Daha önce kanatlı dokularında ilaç kalıntı düzeylerinin ısı karşısındaki tepkisi Baydan ve ark. tarafından 2001 yılında 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 (Baydan ve

ark., 1998; Baydan ve ark., 2001). Pişirme ve dondurma işlemlerine ilişkin ise çok az sayıda çalışma olduğu görülmüş (Baydan ve ark., 2001), Dehai ve ark. (1996) kanatlı dokularında sülfadiazin kalıntılarının çeşitli pişirme, -20C'de dondurma ve bekletme ile azaldığını bildirmişlerdir (Dehai, et al., 1996).

Günümüzde LC-MS ile iyonofor antikoksidiallerin 1ppb' nin altında bile tespitleri ve LC-MS/MS ile de doğrulamaları çok daha büyük duyarlılık oranlarında mümkün olmaktadır. Bu çalışma broilerlerde lasalositin kalıntı bırakma düzeylerinin belirlenmesi ve ısı stabilitesinin ortaya konması amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma; İstanbul ilinden numune bazlı tarama testleri, yedirme sonrası doku ve karaciğer rezidüe seviyeleri ile yüksek düzeylerdeki kalıntının ısı işlemlere tepkisinin belirlenmesini içermektedir.

Numune çalışması

İki aşamalı olan çalışmamızın birinci evresinde İstanbul'un Anadolu ve Avrupa yakalarında 15 ilçesinden (Bahçelievler, Bağcılar, Bakırköy, Küçükçekmece, Gaziosmanpaşa, Fatih, Eminönü, Beyoğlu, Şişli, Güngören, Tuzla, Maltepe, Pendik, Kadıköy, Beykoz) topladığımız 150 adet yumurta ile 150 adet broiler eti örneği alınarak "Pendik Veteriner Kontrol Ve Araştırma Enstitüsü" (PVKAE) kalıntı laboratuvarına etler soğuk zincirde, yumurtalar ise satış koşullarında en fazla 3 saat içerisinde taşındı. Numuneler alınırken yumurtalarda bir adet viyolden bir adet yumurta alınmasına, aynı firma aynı adres ve aynı parti malı olması durumunda ikinci bir numunenin alınmasına özen gösterilmiştir (**Tablo 1**).

Piliç eti numuneleri alınırken de olabildiğince farklı parti, farklı kesim ve/veya firma olmasına dikkat edildi. Böylece yumurta ve piliç eti numunelerinin imkânlar dâhilinde farklı seçimi öngörülmüştür (**Tablo 2**).

Tablo 1. Yumurta örneği alım tablosu**Table 1.** Egg samples reception table

Numune No:	1-150 adet yumurta
Cinsi	Yumurta
Ortalama ağırlığı	50-60gr/ad. yumurta
Alındığı Yer	B.Evler,Bağcılar,Bakırköy,K.çekmece,Gaziosmanpaşa,Fatih,Eminönü,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:2. Piliç eti örneği alım tablosu**Table 2.** Chicken meat sample table

Numune No:	1-150 ad.arası numaralandırılmış Piliç eti numunesi
Cinsi	Piliç eti
Miktarı	Piliç eti: 230-350gr/ad. numune
Hangi dokular	P.eti:deri+but+göğüs (yarım piliç)
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

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 uygulanarak kalıntı düzeyleri belirlenmiştir.

Kullanılan Materyal, Standart ve Kimyasallar:

Materyal:

200mL' lik cam beher ve 15mL' lik deney tüpü,
50 ve 75mL'lik silifli kaplı santrifüj tüpleri,
Vorteks karıştırıcı,
Ultrasonik su banyosu,
Soğutmalı santrifüj,

N (azot) evaporatörü,
Gold-Tandem MS/MS
Thermo Finnigan® MSQ LC-MS/MS sistem,

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 Reagent grade,(Riedel®)
- 6-Toluen Reagent grade, (Merck®)
- 7-Tetrahidrofur, (Riedel de Haen®)
- 8-Formik asit, (Merck®)

Standartlar;

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.

Tablo 3. Antikoksidiallerin Analizlerinde Cihaz Ayarları

Table 3. Device Settings in the anticoccidial Analysis

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

Numunenin Hazırlanması

Analizi yapılacak yumurtanın tamamı bir mikser ile broiler etinin 200g'ı homojenizatör yardımıyla iyice parçalanıp numune numuneler ayrılmış, herhangi bir bulaşmayı engellemek için tüm teçhizatın her işlem sonrası gerekli temizlikleri ileri düzeyde su, asetonitril, metanol ile yapılmıştır.

Ekstraksiyon

Elli veya 75 mL'lik santrifüj tüpüne 10g doku örneği, 15mL asetonitril ve 2mL saf su eklenerek 30sn vorteks karıştırıcı ile homojen hale getirildi. Homojenizatörde iyice parçalanan örneklerin olası parçacıkların yetersiz ayrışmasını önlemek amacıyla ortalama 10 dk ultrasonik banyoda ileri düzeyde parçalanmaları sağlanmış, sonraki aşamada ısı ayarlanabilir bir santrifüj ile 4°C'de 3000 rpm'de 10 dk askudaki partiküllerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası üst fazdan 2,5 mL'lik kısmı 25mL'lik santrifüj tüpüne alınarak buna 4mL 0,5M NaOH, ile 10mL Hekzan: Toluen (1:1) çözeltileri ilave edilmiştir. Otuz saniye vortekste karıştırılıp 3000rpm'de 10dk santrifüj sonrası üst fazın tamamı ayrılarak 15mL'lik deney tüpüne örnekler alınmıştır. Üst fazın yumurtada en fazla ve doku kızartma numunelerinde en az olduğu gözlemlenmiştir. Kalan alt faza 5mL Hekzan:Toluen (1:1) eklenerek santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz ayrılarak birinci üst faz ile birleştirilmiş, elde edilen bu faz azot gazı altında 60°C'de uçurularak elde edilen geri kazanım örnekleri 500µl asetonitril:su (75:25) ile insört vialer alınarak LC-MS te analize alınmıştır.

Doğrulama testleri için yine yukarıdaki yöntem ile analitlerin tesbit limitleri kadar standart enjeksiyon yapılarak geri kazanım (recovery) ları test edilmiştir. Lasalositin kas dokusundan ayrıştırılması, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirlilikten ayrıştırılması yapılarak LC-MS-MS sistemi ile doğrulaması aynı analiz prosedürleri içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Analiz için Thermo Finnigan Surveyor LC pump, otomatik enjektör (Thermo Finnigan Surveyor Autosampler), LC kolon (Phenomenex Synergy Max RP 2,1x150mmx5µ), 400°C Kolon Fırın Isısı, 25 µL Enjeksiyon Hacmi, 0.3 mL/dk Akış Hızı, 0-25dk Diagonal Akış programında ve %60 asetonitril + %25 0.1M Amonyum asetat + %10 Metanol + %5 Tetrahidrofuran + %0,2 Formik asit olan mobil faz şartları oluşturularak çalışma yapılmıştır.

Besleme sonrası elde edilen doku örneklerinde ekstraksiyonu

Çalışmanın ikinci evresi broyler temini, gruplandırma, yedirme, kesim ve ekstraksiyonundan oluşmuştur. Bursa'da ticari bir işletmeden alınan 150 adet Ross ırkı 16 günlük broyler pilici Bilecik ili İnhisar ilçesi Tarpak beldesine kafeslerde sorunsuz ve kayıp vermeden naklendilmiştir. Daha önceden hazırlanmış, ayrılmış, Lasalosit için "L" kontrol için de "C" yazılarak işaretlenmiş bölmelere yerleştirilerek besleme grupları oluşturulmuştur. Muhtemel aksaklıkların (ölüm, hastalık v.b.) tolere etmek amaçlı L ve C grubu dışında kalanlar ayrı bir bölme alınarak, beş gün boyunca kendi normal rasyonları, antikoksidiyal içermeyen rasyonları ile beslenme sürdürülmüş böylece eliminasyona neden olabilecek olası risklerden kaçınılmıştır.

Yem karışımı 20. günde Lasalosit için ton üzerinden hesaplama yapılarak lasalositin 90 µg/g miktarına denk gelen ilaç kısmı bir ön karışıma tabi tutulmuştur. Bu ön karışım ikinci bir karışımla homojen dağılımın sağlanacağından emin olunduktan sonra 100'er kg'lık pellet olmayan yemlere karıştırılmıştır. Bir sonraki gün (21.gün) yedirme sabahtan başlatılmış başlangıçtan itibaren kontrol grubunda belirgin olmakla birlikte tüm gruplarda yem alımında kesime kadar artarak devam etmiştir. Beşinci gün sonunda total yem tüketiminde artışa paralel olarak gözlemlenebilir ağırlık artışı da gözlemlenmiştir. Beş günlük besleme sonrası kesimlere başlanmış (1., 3., 5. ve 7. kesim günleri) yapılarak analiz prosedürleri tüm gruplara aynen uygulanmıştır. gün boyunca konuya ilişkin değerlendirmeleri değiştirebilecek herhangi bir olumsuzluk meydana gelmemiştir.

Ekstraksiyon işlemi kontrol ve ısı işlem uygulanmış broiler örneklerinde dinlendirme işlemi sonrası (24 saat) başlatılmıştır.

Doku ve ısı işlem ekstraksiyonları bir arada ve uygun dinlendirme koşullarında 24 saat sonra başlatılmıştır. Ekstraksiyon için yöntem aynen korunurken doku ayırımına gidilmeden but ve göğüs-ten ortak alınan numuneler ile karaciğerden 10'ar gr'lık numuneler eş zamanlı ve paralel çalışılıp 3/4 parça da ısı işlemler için ayrılmıştır. 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 ekstraksiyona alınmıştır. İkinci parça toplumsal yemek kültürümüzden örneklenecek alışkanlıklarımıza paralel olarak fakat

ısı ve basınç ayarlanabilir bir kapta pişirmeye tabi tutulup pişmiş et ve et suyu ayrı, ayrı ekstrakte edilerek numaralandırılıp analizi yapılmıştır. Pişirme esnasında örnekle beraber pişirme kabına 250 gram doku için 50 ml su ilave edilerek pişirme süresi 25 dakika ile sınırlandırılmıştır. Son 1/4parça ise yine beslenme alışkanlıklarımıza paralel olarak kızartılıp ekstraksiyonu yapılarak analize alınmıştır. Kızartma işlemi elektrikli kızartıcı kullanılarak ve tüketilebilir nitelikte kızarma kıvamına geldiğinde işleme son verilerek tamamlanıp, ekstraksiyona gidilmiştir. Hem pişirme hemde kızartma işleminde tüketim alışkanlıklarıyla birebir paralellik sağlanmasına azami riayet edilmiştir.

Ekstraksiyon sonrası numunelerden elde edilen kısım organik bir çözücü yardımıyla SPE ve LLE teknikleriyle ile dokulardan ayrıştırılmıştır. İlaç kalıntılarını çözen organik bir solvent içinde var olan eluatlar azot gazı (N₂) altında kuruluğa kadar uçurulmuştur.

Örnek zenginleştirme olarak ifade edilen Sample Concentratör sistemiyle ekstraksiyon sonucu dokulardan ayrılarak organik çözücüye geçen ilaç kalıntıları cihaza verilinceye kadar vida kapaklı tüplerde 4 °C de muhafaza edilmiştir.

Bu çalışmanın deneysel kısmı çalışmaları için 31.10.2006-2006/175 tarih ve sayı numarası ile İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu Başkanlığı'ndan kurumundan "Etik Kurul" izni alınmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Kuzey İrlanda'da yumurtacı tavuklarda 6ay boyunca kullanılan lasalositin kalıntı miktarı olarak 1994'te %66 den 1995'te %21'e inmesinin nedenlerinin başında granüler formun kullanımı gösterilmiş ve toz formun kullanımının azalması kalıntı olarak da bir azalmaya neden olmuştur. Buna karşılık İngiltere'de lasalosit yumurta tavuklarında daha az tesbit edilmiştir. 1994'te %10.7' sinde 40 µg/g 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/g 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/g düzeyinde kalıntı taşıdığı bulunmuş ve düşük düzeyde kirlenme ise 20 adette, %13.5' inde, 2 ile 27 µg/g olarak tespit edilmiştir. İngiltere'de bildircinlarda 20 kas doku

ve 10 yumurta üzerinde yapılan bir çalışmada lasalosit rezidüsü 6 kas doku ve 10 yumurtada 120 ile 5400 µg/g arasında tespit edilmiştir (Jordan ve ark., 1990; Kennedy ve ark., 1998; Kennedy ve ark., 1996).

İsveçte 1999 yılında Rosen (2001) tarafından yapılan bir taramada 100 adet broiler karaciğerinin beşerli olarak bir araya getirilmesi yoluyla yapılan 20 örnek analizinde 11 örneğin narasinin kalıntısının 0.04–0.67 µg/g arasında değiştiğini tespit etmiştir. Kuzey İrlanda'da yapılan bir başka çalışmada 40 adet yem rasyonundan %22.5' inde monensinin prevantif dozun çok üstünde 5 mg/kg düzeyinde bulunduğu en yüksek buluna örneğin ise 44 mg/kg olduğu bildirilmiş sebepleri araştırıldığına ise yem fabrikalarındaki gerek normal gerekse pellet yapımı esnasında makine ve ekipmanların bulaşıklığı, personelin dikkatsizliğinin ana nedenler olduğu anlaşılmıştır (EFSA, 2004; Mc Evoy, 2002).

Yapılan piyasa araştırması İstanbul ilinden 15 ilçeden (Bahçelievler, Bağcılar, Bakırköy, Küçükçekmece, Gaziosmanpaşa, Fatih, Eminönü, Beyoğlu, Şişli, Güngören, Tuzla, Maltepe, Pendik, Kadıköy, Beykoz) değişik noktalardan numuneler alınmıştır. Yumurta ve doku numuneleri alınıp şekil ve kriterleri olarak TGHB'nin numune alma formatı da göz önünde tutularak aşağıda tablolatırılmıştır.

Yukarıda belirtilen yöntem ile PVKAE'de analize aldığımız 150 adet yumurtadan Lasalosit tespit edilebilir limitler dahilinde herhangi bir kalıntıya rastlanmamıştır. Yine broiler etinden mix olarak (deri + but + göğüs) hazırlanan karışımlardan da aynı yöntem ve tarama şartlarında negatif sonuç alınmıştır.

Broilerlerde antikoksidiyal ve zooteknik olarak da verim arttırıcı, yemden yararlanmayı yükseltici bir başka ifade ile yemin ete dönüşüm oranını pozitif yönde değiştirici olarak kullanılan Lasalosit için yedirme denemeleri süresince yem tüketiminde artış gözlemlenmiştir. Bu; gözlem sonuçlarının kalitatif olması literatür olarak verilen ve amaç dışında olduğu için verilmemiş zooteknik ve parazitolojik araştırmalar ile paralel meydana gelmiştir (EFSA, 2004; Kennedy ve ark., 1996; Şanlı, ve ark.,1993; Mattabudul, 2002).

Kesimin 1., 3., 5., 7., günlerde yapılması hem ekstraksiyon periyodu hemde yapılagelen otoriter uygulamalarla paralellik arzemesini sağlamıştır (EFSA, 2006, EMEA, 1999, EMEA, 2004).

Negatif sıcaklık etkisi dışında diğer ısı işlemler için bir bekletmeye gerek görülmemiştir. Ulusal mevzuatda antikoksidiyallerin B2b grubunda değerlendirilmesi AB laboratuvarına atıfla PVKAE'nin antikoksidiyal kalıntı için temel referans alınmasını gerekli kılmıştır (Resmi Gazete, 2005; GTHB, 2007; Resmi Gazete, 2007; Elliot, 1998; McDouglas, et.al.,1998; Mortier et.al., 2005; Oehme et.al., 1998). Yöntemin ülkemizde ve AB'de eş güdümlü kabul görmesi ve aynı ölçütlerin tekrarı, kontrol edilebilirliği ve

doğrulanabilirliği açısından büyük önem taşımaktadır (Regulation EC, 2003).

Lasalosit için yapılan tespit düzeyi çalışmaları, recovery ve validasyon işlemleri sonrasında 1ppb düzeyinde kalıntı tespiti yapılabildiği bunun da EFSA, EMEA ve ulusal verilerle paralel olduğu görülmüştür.

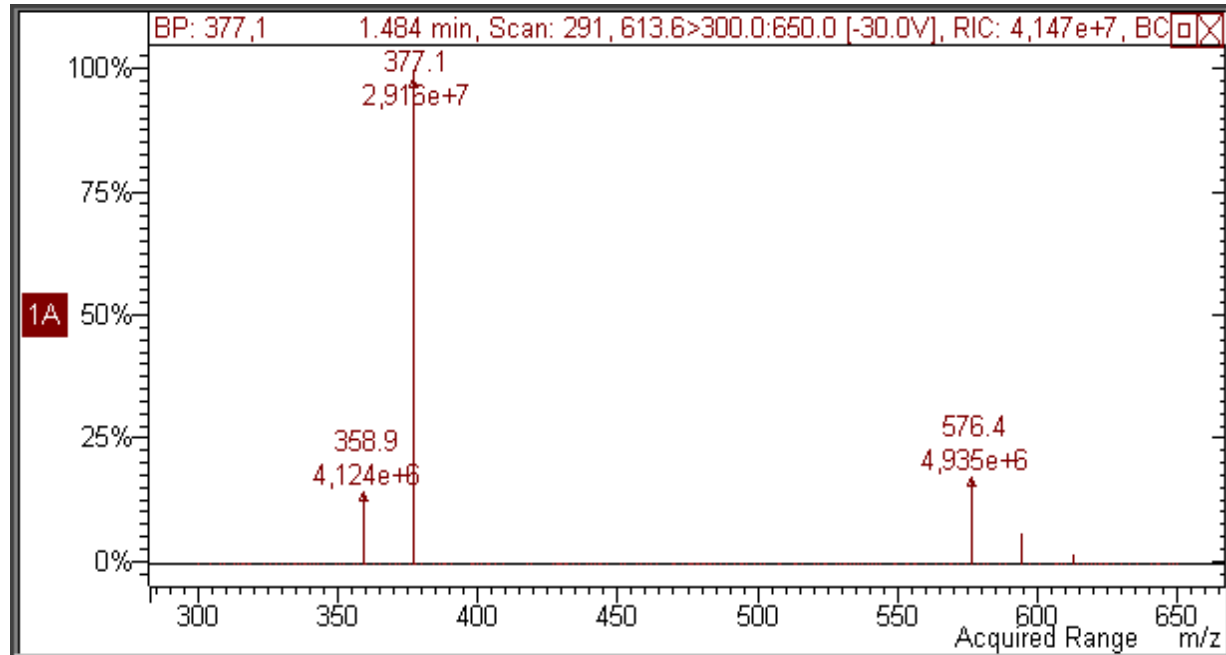
Lasalosit için yapılan tespit ve doğrulama çalışma sonuçları aşağıdaki gibidir;

Tablo 4. Lasalosit analiz ve doğrulama parametreleri

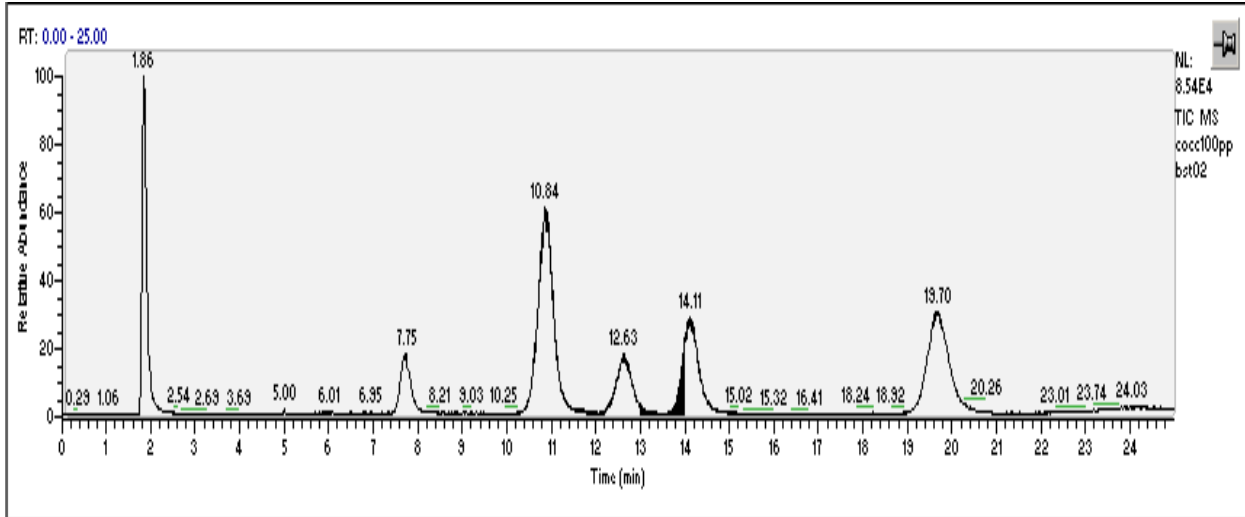
Table 4. Lasalosit analysis and validation parameters

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

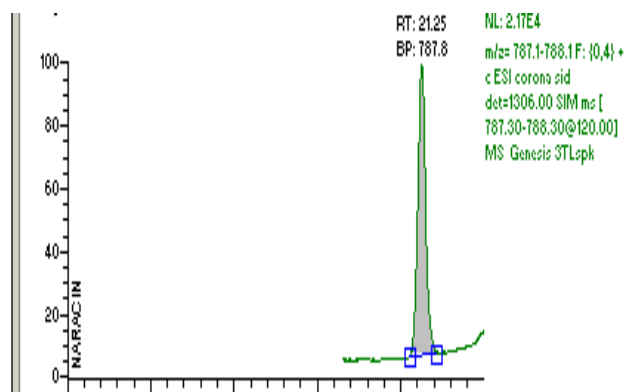
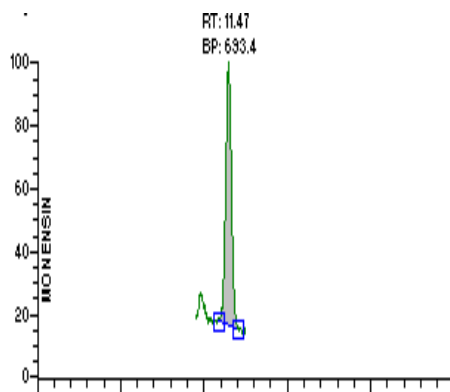
Lasalosit LC-MS/MS Spektrumu:



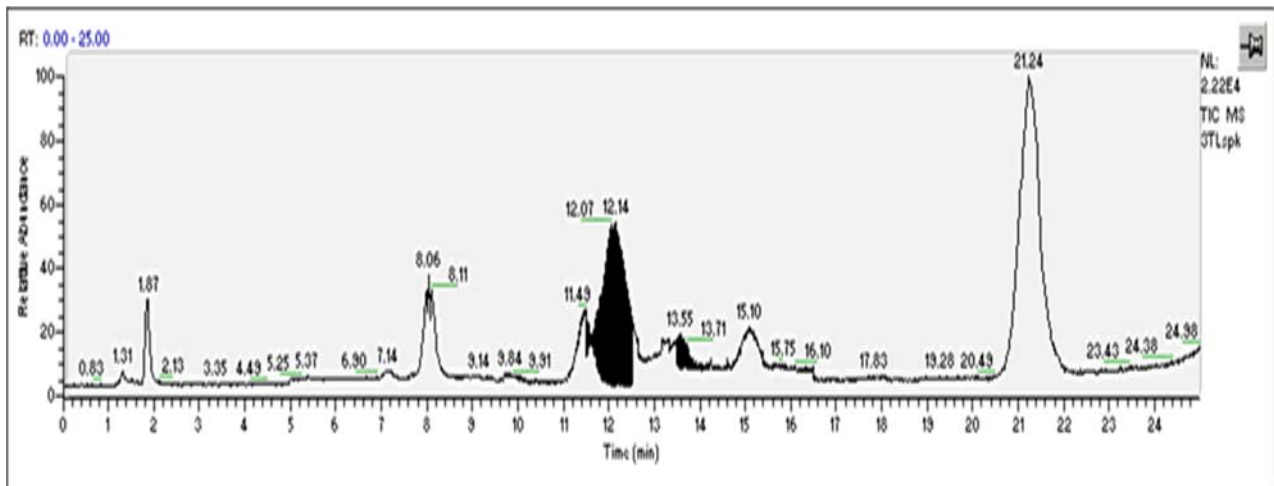
100ppb Mix Standart Kromotogramı:



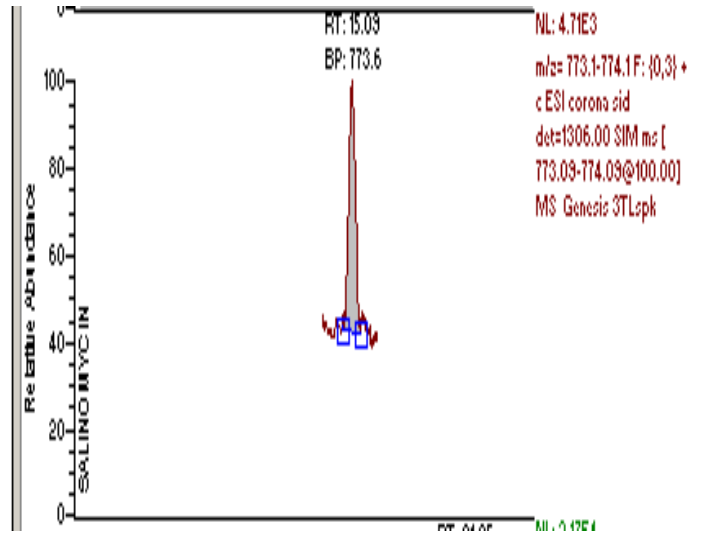
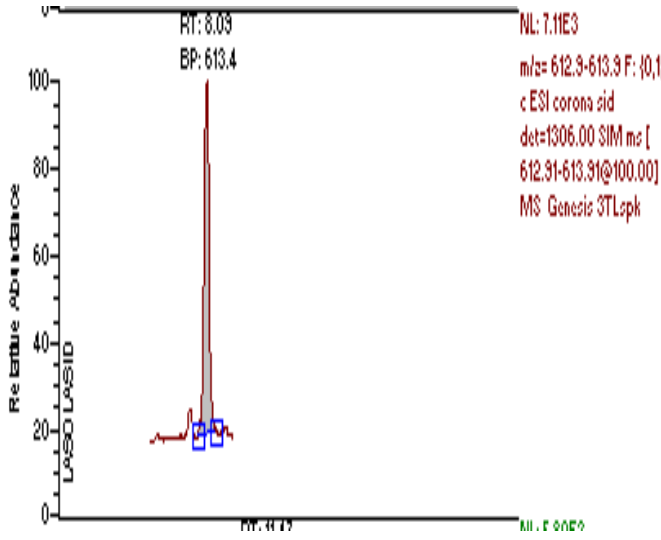
100ppb Mix Standart Kromotogramı:



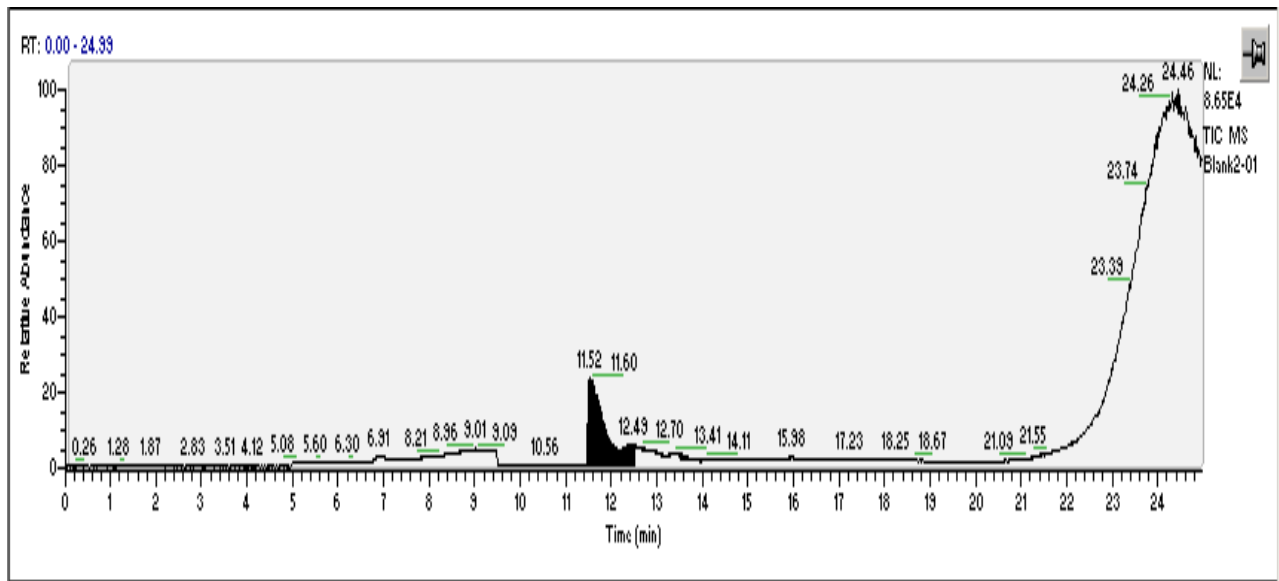
Spike yapılmış doku kromatogramı tespit limiti:



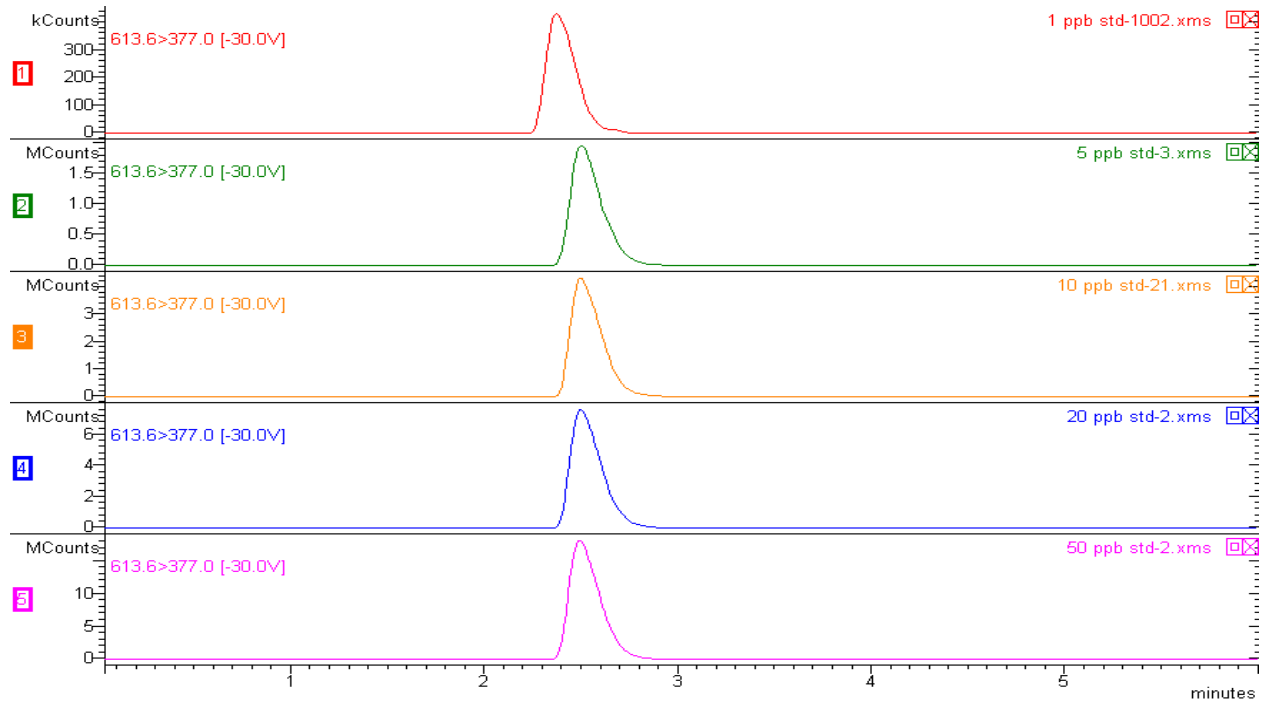
Lasalosit Kromatogramları:



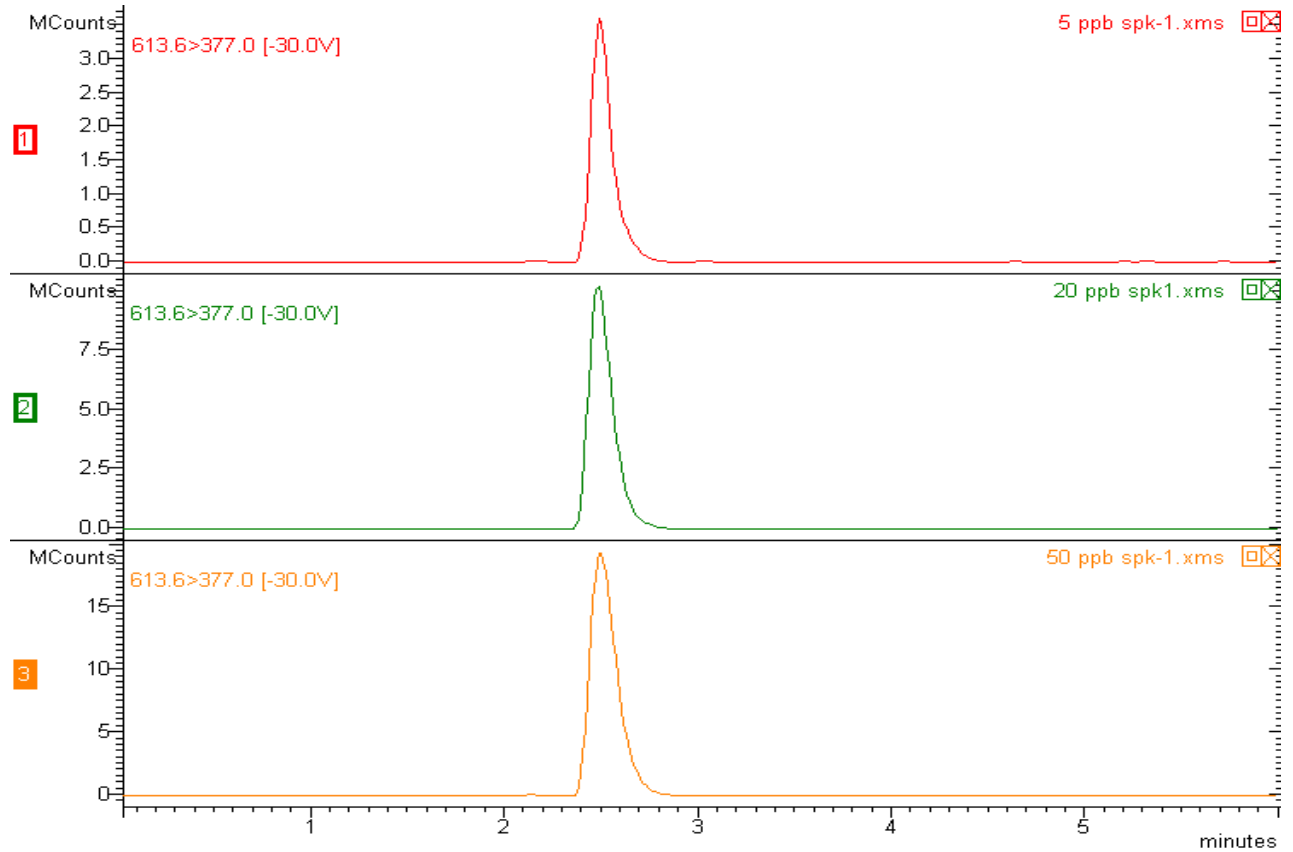
Blank Doku Kromatogramı:

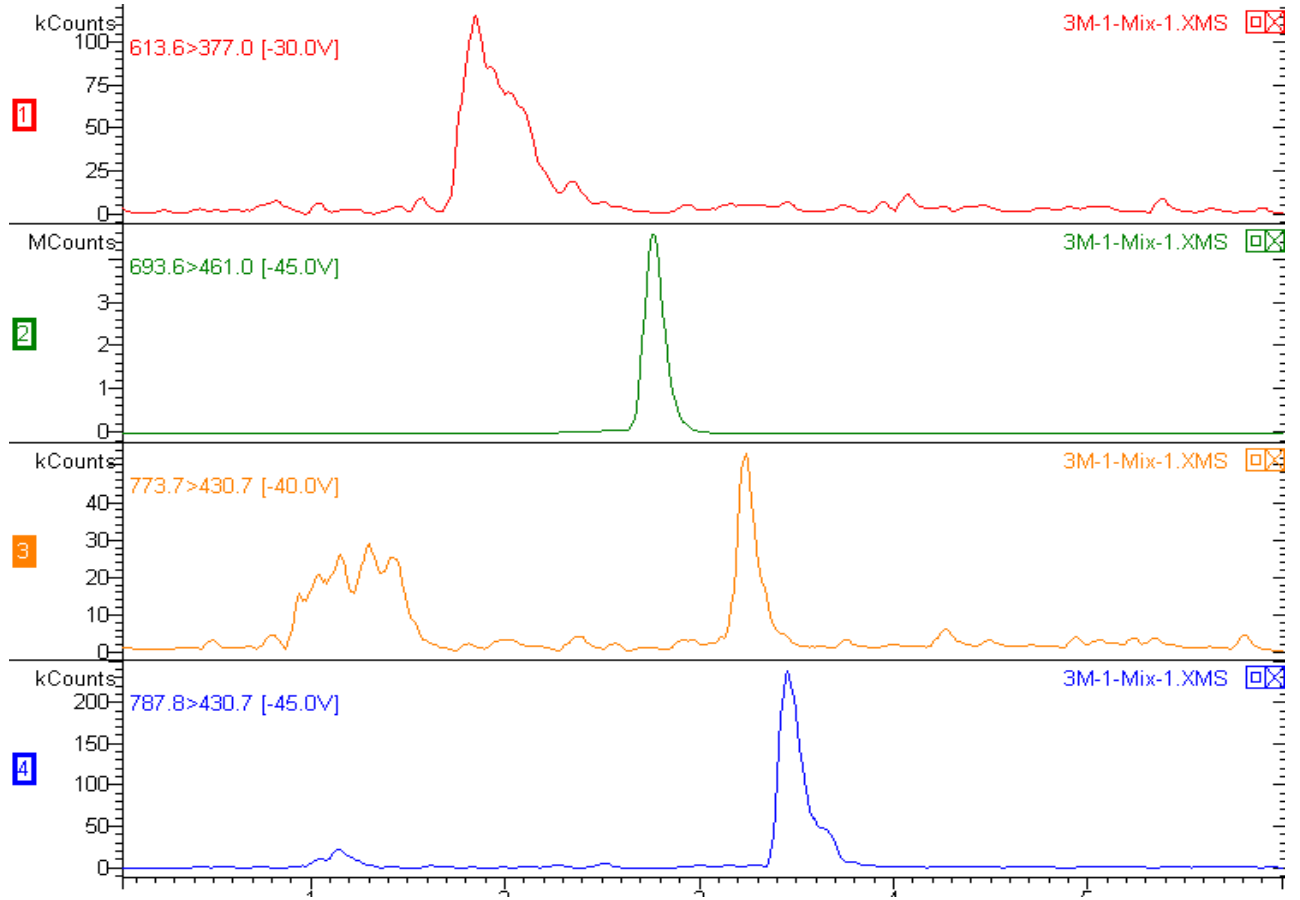


Lasalosit Linearitesi:



Spike Yapılmış Dokulardan Elde Edilen Lasalosit Kromatogramı:



Örnek Numune Kromatogramları:

Standart enjeksiyonlardan sonra elde edilen geri kazanım lasalositte %98, olmuştur. Bu yüksek değere ulaşılma nedeni lasalosit için çift değerli iyonları bağlama kapasitesi, kaybın daha az şekillenmesi ile makinaların yüksek performansta çalışabilmeleri ve yeni teknikler olmaları yanısıra özgün yapısının metotla iyi sonuç vermesine bağlanmıştır. 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 10 µg/kg ve doğrulama seviyesini ise 2 µg/kg ile yasal olarak düzenlemiş ve karar limiti olarak Lasalosit için >20 µg/kg olmasını kararlaştırmıştır (Resmi Gazete, 2007, GTHB,2007). Bu ulusal ve AB yasal mevzuatının yanısıra kullanımı devam edegelen Lasalosit' in

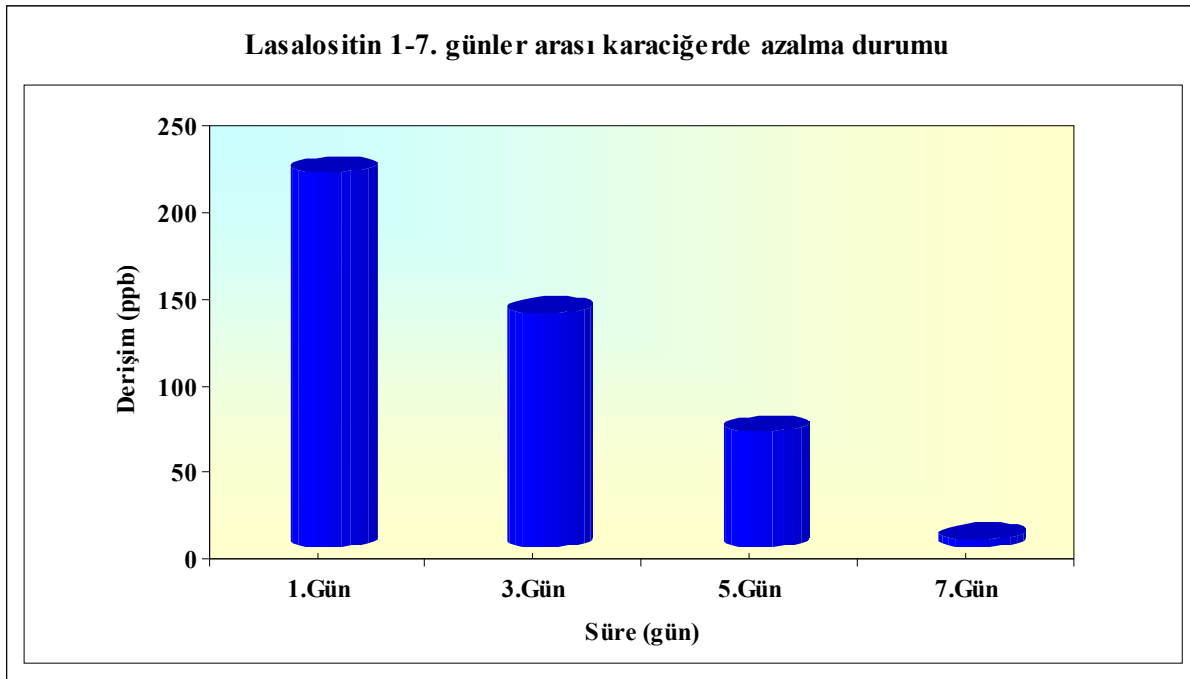
de dahil olduğu karboksilik iyonoforlar için kullanım parametreleri hususunda ülkemizde herhangi farklı bir saha taramasına rastlanmamıştır. Bu sayılanların ışığında lasalositin de içinde bulunduğu karboksilik iyonoforların mevcut kullanımları, yapıları, direnç oluşturma periyotlarının uzunluğu, koksidi etkenlerine etkin ve özgün etkimelerinden ötürü kullanımlarının devam edeceği kanaati bir çok literatürce de desteklenmektedir (Ebrahimezhad, 2005; Rokka ve Peltonen., 2006; Elliot, ve ark., 1998). Lasalosit için yapılan LC-MS tespit ve LC-MS/MS doğrulama analizleri sonucunda alınan örneklerden bir kaçını aşağıda verilmiştir. Verilen analiz raporları günlere bölünerek ortalama ideal olan, aynı grup örnekleri temsil edebilen, analizlerden sadece birer adedi konulmuştur. 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 değerlendirilmiştir. Burada Lasalosit' in yüksek seviyelerde bulunabilme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Analiz örnekleri 7. günü raporları tespit ve doğrulama limitlerimizin çok altında bulunmuştur.

Lasalosit broiler mix dokusunda 1-7. günler arasında bulunan kalıntı değerleri aşağıda verilmiştir.

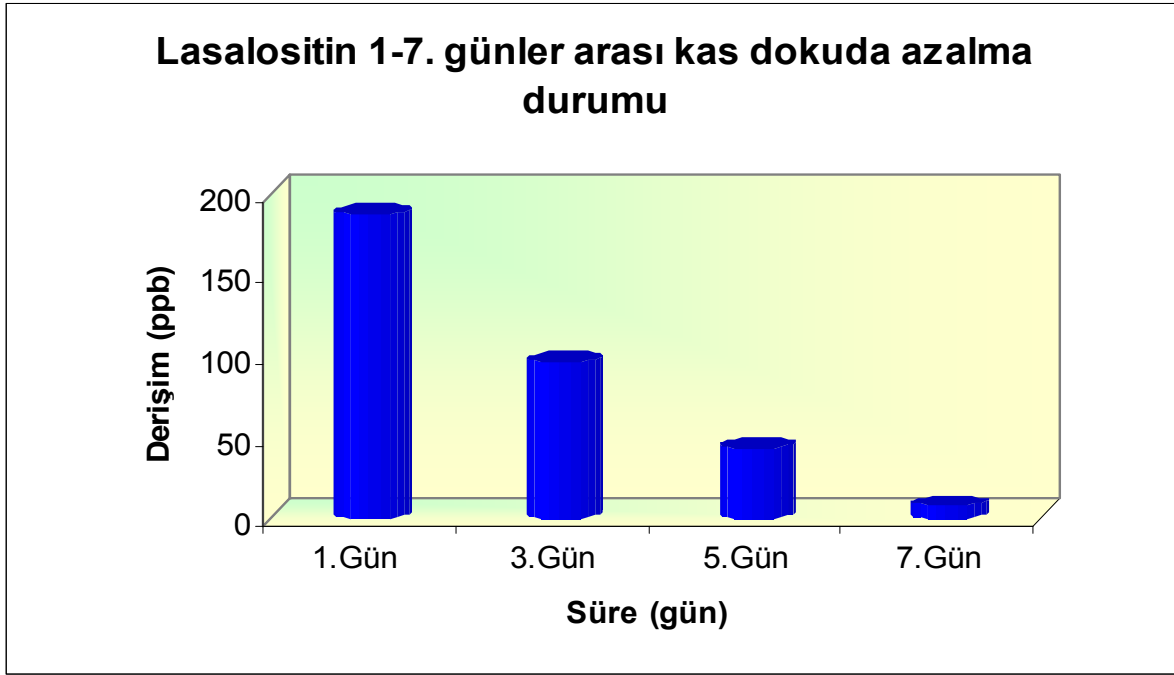
Yapılan kesimlerin 1., 3. ve 5. günlerinde kalıntı miktarın inen doğrusal bir eğim göstermesi, aradaki farklılıkların yüksek oluşu, Kinetiğinin; ilk geçiş etkisi ile büyük oranda atılımını sağladığı, kalan miktarın ise yapılmış çalışmalara

paralel olarak metabolizmada hızla degrade edildiği şeklinde yorumlanmıştır. 7. günde lasalosit için herhangi bir kalıntıya rastlanmazken 5. gün verileri AB otoritesine paralel olmuştur. Yapılan ısı işlemlerde sırasıyla kızartma, kaynatma ve dondurmada ısı her işlemde lasalositin yıkımlandığı görülmüştür. Yıkımlanma lasalositte daha orantılı bir düşüş kaydetmiştir. Lasalositin atılım bakımından doku konsantrasyonunun daha geç degradasyonu, ısı işlemlerden de kaynatmanın lasalositi daha az yıkımlandığı aşağıda verilen grafiklerden de anlaşılacağı üzere lasalositin daha istikrarlı olma eğilimine sahip olduğuna tanık olunmuştur.



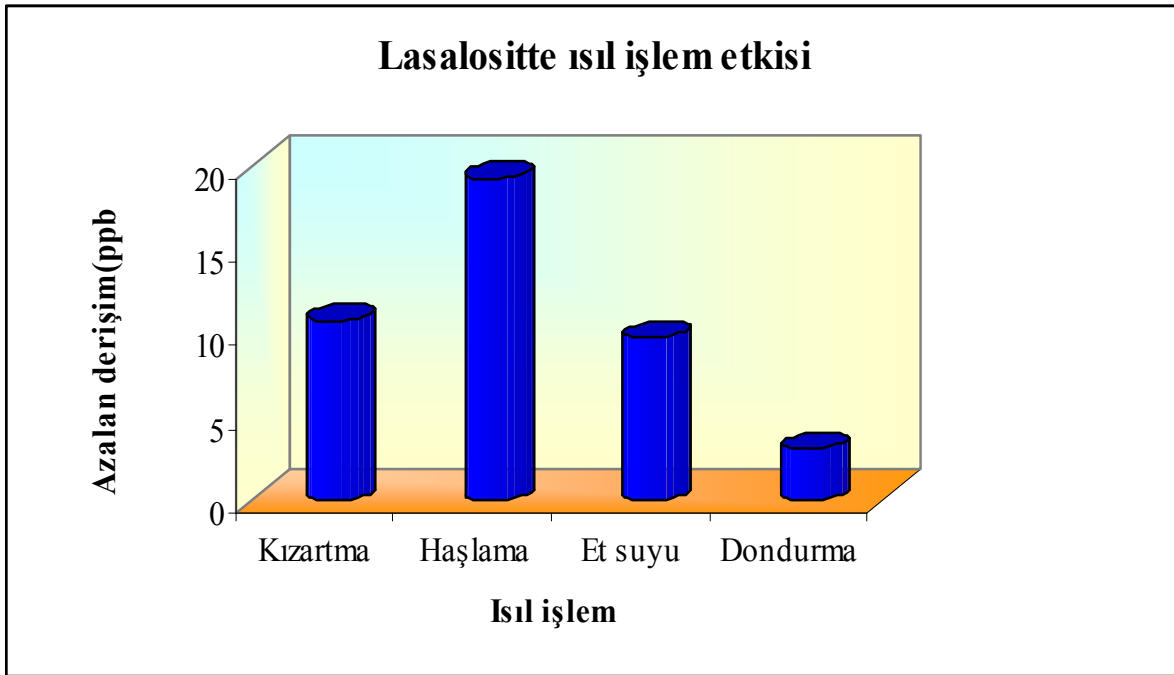
Şekil 1. Karaciğerde lasalositin zamana bağlı değişim konsantrasyonu

Figure 1. Lasalosit time-dependent concentration change in the liver



Şekil 2. Dokuda lasalositin zamana bağlı değişim konsantrasyonu

Şekil 2. Lasalosit time-dependent change in tissue concentration



Şekil 3. Isıl (kızartma, haşlama ve dondurma) işlemlerin Lasalosit kalıntı düzeyleri üzerine etkisi

Şekil 3. The effect of heat treatment on Lasalosit residue levels (fried,boiled and frozen)

Lasalosit içeren doku üzerine ısıtma işlemi uygulanması şeklinde şu ana kadar herhangi bir literatüre rastlamamıza 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 verilerin çok daha anlamlı olduğu görülmüştür (Baydan et.al., 1998, Dehai et.al. 1996, Rokka et.al., 2005).

İyonofor antikoksidiyallerden lasalosit içeren doku üzerinde ısıtma işlemi uygulanarak ısı

karşısındaki davranışlarına ilişkin benzer bir çalışmada Rokka'nın bir başka iyonofor olan narasin üzerinde yapmış olduğu çalışmaya paralellik arz etmiştir. Buna karşılık doku degradasyonuna ilişkin sonuçlar hem moleküllerin farklılığı hemde analiz metodunun farklılığına bağlı olarak değişim göstermiştir. Metod farklılığı ile beraber benzer sonuçlar ısıtma işlemlerinin iyonoforları belli düzeylerde yıkımladığı ve termo-labil olan iyonoforların etkilenmelerinin düşük ısıdan ziyade yüksek ısıda daha fazla olduğu müşahade edilmiştir.

Tablo 5. Lasalosit spike edilen dokuların kızartma, haşlama ve dondurma sonrası doku kalıntı miktarları

Table 5. Lasalocid spiked tissue residue levels (fried, boiled, frozen)

Lasalosit spike edilen dokularda kızartma sonrası düzeyler			
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	
Lasalosit spike dokuların haşlama sonrası kalıntı düzeyleri			
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	

Table 5. Devamı			
Lasalosit spike dokuların -20°C de kalıntı düzeyleri			
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%

Kayıp oranının lasalosit için kızartmada, kaynatma ette, -20°C'de dondurmada sırasıyla 10.71, 19.26, 3.06 ppb miktarlarında olduğu görülmüştür. Bu veriler ile şu ana kadar karboksilik iyonoforlardan lasalositin ısıtma işlemi karşısındaki tepkisinin miktar ve oranı ilk defa net ve ölçütlü ortaya konulmuştur. Kızartma işleminde dokudaki su kaybından dolayı ağırlık azalmasına bağlı olarak rezidüel değerler 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 dışına da çıkılmamıştır.

Sonuç

Besleyici değeri, ucuz maliyeti ve yüksek tüketimi göz önüne alındığında broiler etlerinde önemli bir risk faktörü olan Lasalosit kalıntılarının izlenmesinin büyük önem taşıdığı ve Lasalosit kalıntısının ısıtma işlemlere son derece hassas olduğu görülmüştür. AB otoritelerince yürütülen kalıntı aktivite araştırmalarının karar noktalarının farklı bağımsız ve ciddi anlamda belirleyici araştırmalar sonucu ortaya konulduğu bilinmektedir. Yapılan bu çalışmada elde edilen değerler itibarıyla tutarlılık ve hassasiyet olarak daha iyi sonuçlara ulaşılmış olmasının önemli bir gelişme olduğu düşünülmekte dahası bu durumun üzerinde çalışılan ana-

litik cihazların yeni ve yüksek hassasiyet değerlerine ulaşabilmesi, stabilitesini muhafaza edebilmesi bir diğer ifadeyle sistematığın farklı tarihlerde ve farklı uygulayıcı kişilerce kullanılması sırasında birbirine yakın sonuçlar alınabilmesi olarak da değerlendirilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma doktora tezinden özetlenmiş olup çalışmaya İstanbul Üniversitesi BAP birimi tarafından Proje No: 1224 ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- 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.
- Baydan, E., Özdemir, M. Kanbur, M. (2001): Kanatlı dokularındaki sülfadiazin kalıntıları üzerine pişirme, dondurma ve benzeri işlemlerin etkileri, *Çiftlik Dergisi*, 203: 81-90.
- Bishop, Y.M. (1996): The veterinary formulary: Handbook of Medicines Used in Veterinary

- Practice, 5th ed., Royal Pharmaceutical Society of Great Britain and British Veterinary Association, London, pp.176-178.
- Bories, G., Brantom, P., Barberà, J.B., Chesson, A., Cocconcelli, P.S., Debski, B., Dierick, N., Franklin, A., Gropp, J., Halle, I., Hogstrand, C., Knecht, J., Leng, L., Haldorsen, A.K.L., Mantovani, A., Mézes, M., Nebbia, C., Rambeck, W., Rychen, G., Wright, A., Wester, P. (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. *The EFSA Journal*, 547: 1-10.
- Dehai, X., Grizzle, J.M., Rogers, W.A., Santerre, C.R. (1996): Effect of cooking on residues of ormetoprim and sulfadimethoxine in the muscle of channel catfish. *Food Research International*, 29(3-4): 339-344.
- Dubois, M.G., Pierret, D. (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*, 813(1-2): 181-189.
- Ebrahimezhad, Y. (2005): Effects of ionophorous drugs, salinomycin and lasalocid, on the performance of broiler chicks and the relationship of these drugs to supplementary methionin. *Journal of Poultry Science*, 4(11): 911-916.
- EFSA, (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*, 76: 1-49.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/76.pdf>
- EFSA (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*, 53: 1-44.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/53.pdf>
- EFSA (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 Avatec in accordance with article 9G of council directive 70/524/EEC, *The EFSA Journal*, 77: 1-45.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/77.pdf>
- EFSA (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*, 378: 1-12.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/378.pdf>
- 12-EFSA, (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, *The EFSA Journal*, 553: 1-46.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/553.pdf>
- Elliot, C.T., Kennedy, D.G., McCaughey, W.J. (1998): Methods for the detection of polyether ionophore residues in poultry. *Veterinary Science Division*, 123: 45-56.
- EMEA (1999): Commission Directive 1997/76/EC. Annex. Determination of lasalocid sodium. 23 July 1999.
- EMEA (2004): Lasalocid Sodium. Summary Report of the Committee for Veterinary Medicinal Products. Summary Report. EMEA/MRL/912/04-Final, Oct.2004.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014596.pdf
- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB), Gıda kontrol Genel Müdürlüğü (GKGM) (2007): GTHB Ulusal Kalıntı Kontrol Planı.
http://www.veterinerx.com/dosyalar/2007_ulusal_kalinti_izleme_plani.pdf

- Jordan, F.T.W. (1990): Poultry disease. Bailliere Tindal, Oval road London/England. ISBN 0-7020-1339-0/24-28.
- Kennedy, D.G., Hughes, P.J., Blanchflower, W.J. (1998): Ionophore residues in eggs in Northern Ireland: incidence and cause. *Food Additives & Contaminants*, 15(5): 535-541.
- Kennedy, D.G., Hughes, P.J., Blanchflower, W.J., (1996): The incidence and cause of lasalocid residues in eggs in Northern Ireland. *Food Additives & Contaminants*, 13(7): 787-794.
- 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*. 127(6): 760-768.
- McDouglas, L.R., Seibert, B.P. (1998): Residual activity of veteriner drugs in chickens after withdrawal of medicated feed. *Veterinary Parasitology*, 74: 91-99.
- McEvoy, J.D.G. (2002): Contamination of animal feedingstuffs as cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Analytica Chimica Acta*, 473: 3-26.
- Mortier, L., Daeseleire, E., Peteghem, C.V. (2004): Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed. *Journal of Chromatography B*, 820: 261-270.
- Mortier L, Huet, A.C., Charlier, C., Daeseleire, E., Delahaut, P., Van Peteghem, C. (2005): Incidence of residues of nine anticoccidials in eggs. *Food Additives & Contaminants*, 22(11): 1120-1125.
- Oehme, F.W., Pickrell, J.A. (1999): An analysis of the chronic oral toxicity of polyether ionophore antibiotics in animals. *Veterinary and Human Toxicology*, 41(4): 251-257.
- Pareman, B., Pirak, M., Smith, B. (1993): Effect on the accidental feeding lasalocid sodium to broiler breeder chickens. *Veterinary Record*, 132(11): 271-273.
- Regulation (EC), (2003): European Parliament and the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition E.C.No: 1831/2003/E-JC.
- Resmi Gazete (2005): GTHB, Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler İle Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik. Resmi Gazete: 19.01.2005, No: 25705.
- Resmi Gazete (2007): Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı(GTHB). 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.
- Resmi Gazete (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.
- 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. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(1):38-42.
- Rokka, M., Peltonen, K. (2006): Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: validation of an LC-MS/MS method. *Food Additives & Contaminants*, 23: 470-478.
- Rosen, J. (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*, 126(11): 1990-1995.
- Şanlı, Y., Akar, F., Bilgili, A.,(1993): Et tipi piliçlerde althığı ıslatma sendromuna yol açan katılımcı etmenler üzerinde araştırmalar. Uluslararası Tavukçuluk Kongresi, 13-14 Mayıs 1993, İstanbul Bilimsel Tavukçuluk Derneği Yayınları, s. 376-389.