

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
KESİN RAPORU**

**Proje Başlığı**

Florfenikolün Yumurtaya Geçiş Kinetiğinin Belirlenmesi ve Yumurtadaki Kalıntıya  
Yönelik Etkilerin Araştırılması

**Proje Yürütücüsünün İsmi**

Ayhan FİLAZİ

**Yardımcı Araştırmacıların İsmi**

Ufuk Tansel ŞİRELİ

Begüm YURDAKÖK

Farah Gönül AYDIN

Aslı Gül KÜÇÜKOSMANOĞLU

**Proje Numarası**

10B3338003

**Başlama Tarihi**

01.02.2010

**Bitiş Tarihi**

01.08.2011

**Rapor Tarihi**

23/11/2011

**Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Ankara - 2011**

## **RAPOR FORMATI**

### **I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri**

#### **Florfenikolün yumurtaya geçiş kinetiğinin belirlenmesi ve yumurtadaki kalıntıya yönelik etkilerin araştırılması**

**Özet:** Bu projenin amacı florfenikol ve florfenikol aminin tavuk yumurtasından analizi için yöntem geliştirmek, tavuklara değişik yollardan uygulanan florfenikolün yumurtalara geçiş düzeyini belirlemek ve değişik ortam ısılarında (oda ısısı ve buzdolabı) 28. güne kadar muhafaza edilen yumurtalar ile yumurtalara uygulanan farklı pişirme yöntemlerinin (kızartma ve haşlama) kalıntılara yönelik etkilerini belirlemektir.

Florfenikol ve florfenikol amin yumurta sarısı, akı ve homojenize yumurtadan internal standart kloramfenikol varlığında fosfat buffer çözeltisiyle (pH=7) ekstrakte edildi, saflaştırıldı ve Foto Diode Array (PDA) dedektör ile C<sub>18</sub> kolon kullanılarak HPLC tekniğiyle analiz edildi. Daha sonra bu yöntem valide edildi. Buna göre florfenikol, florfenikol amin ve internal standart olan kloramfenikolün alıkonulma zamanları yüklü (spike) örneklerde sırasıyla 20.98; 13.37 ve 23.28 dakika, en düşük tespit limiti (LOD) ve en düşük belirleme limiti (LOQ) ppb olarak florfenikol için sırasıyla 1.94 ve 6.45, florfenikol amin için 0.48 ve 1.58 olarak bulundu. Ortalama geri kazanım değerleri florfenikol ve florfenikol amin için yumurta sarısı, yumurta beyazı ve homojenize yumurtada sırasıyla 86.57; 86.46; 88.52 ve 87.38; 89.95; 90.91 olarak tespit edildi. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik yönünden göreceli standart sapma (RSD) değerleri de (<%11) kullanılan yöntemin yumurtadan florfenikol ve florfenikol aminin analizine uygun olacağı sonucuna varıldı.

Çalışmada 50 adet yumurtacı tavuk 5 gruba ayrıldı ve 20 mg/kg dozunda florfenikol ağızdan (Grup 1), kas içi (Grup 2) ve deri altı (Grup 3) yoldan bir defada uygulandı. Diğer gruplara günlük olarak yine 20 mg/kg dozunda florfenikol 3 (Grup 4) ve 5 gün (Grup 5) süreyle ağızdan uygulandı. Florfenikolün yumurtlayan tavuklara ağızdan ve parenteral yollarla uygulandığında ilk günden itibaren elde edilen yumurtalara florfenikol ve florfenikol amin olarak geçtiği, ayrıca hangi yoldan uygulanırsa uygulansın uygulanan toplam dozun yaklaşık %0.1 oranında florfenikol ve %0.08 oranında florfenikol amin olarak yumurtayla atıldığı ve atılmanın yaklaşık %57'sinin yumurta sarısında gerçekleştiği belirlendi. İlacın yumurtadan tamamen arınma süresi 1, 2 ve 3. grupta 7 gün, 4. grupta 8 günve 5. grupta 9 gün olarak hesaplandı.

Değişik ortam ısılarında yumurtaları muhafaza etmenin yumurtalarda bulunan kalıntılara yönelik etkileri araştırıldığında, gerek oda ısısında (15-20°C) ve gerekse buzdolabı (+4 °C) ısılarında bekletilen yumurtalarda bulunan florfenikol ve florfenikol amin kalıntılarında anlamlı düzeylerde düşme görülmesine rağmen 28. güne kadar hala kalıntı bulunduğu görüldü. Aynı şekilde yumurtaya uygulanan kızartma ve haşlama (1 ve 5 dk kaynatma) işlemleriyle yumurtada bulunan florfenikol ve florfenikol amin kalıntılarının miktarında anlamlı düzeylerde azalma görülmesine rağmen bu işlemlerin de kalıntıları tamamen dekompoze edemediği belirlendi. Böylece florfenikol ve florfenikol aminin ısıya oldukça duyarlı görüldü.

Sonuç olarak florfenikolün yumurtlayan tavuklarda kullanılmaması veya kullanılmak zorunda kalındığında yumurtadan ilaçların tamamen arınma süresine uyulması (ağızdan, kas içi veya deri altı yolla tek doz kullanıldığında en az 7 gün, 3 gün ağızdan kullanıldığında 8 gün ve 5 gün ağızdan kullanıldığında en az 9 gün) ve bu sürede florfenikol kalıntısı içeren yumurtanın insan tüketimine sunulmaması önerilebilir.

## **Determination of the Transition Kinetics of Florfenicol to Eggs and Investigation of Factors on Residue Levels**

**Abstract:** The aim of this study was to develop a suitable method for florfenicol and florfenicol amine analysis in chicken eggs; to investigate the transition level of florfenicol to eggs by different applications and to evaluate the effects of various incubation conditions (room temperature, refrigerator) on the residue levels in the eggs stored up to 28 days and lastly to evaluate the different cooking procedures (frying, boiling) on the residue levels.

Florfenicol, florfenicol amine and the internal standard chloramphenicol were extracted from the egg yolk, white and homogenized egg by phosphate buffer (pH=7) and ethylacetate. Following the purification, samples were applied to HPLC with photodiode array detector (PDA) performed by C18 column and the method was validated accordingly. The retention time of florfenicol, florfenicol amine and the internal standard chloramphenicol were found as 20.98; 13.37 and 23.28 respectively in the spiked samples. Limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) values were found as 1.94 and 6.45 for florfenicol and 0.48 and 1.58 for florfenicol amine. Mean recovery values for florfenicol and florfenicol amine in the spiked egg yolk, egg white and homogenized egg samples were found as 86.57; 86.46; 88.52; 87.38; 89.95; 90.91 respectively. Relative standard deviation (RSD) values (<%11) of intra-day and inter-day variation also confirmed the method for analyzing florfenicol and florfenicol amine in eggs.

50 laying hens were divided into five groups; where 20 mg/kg florfenicol were administered as single dose application, orally to Group 1, intramuscular to Group 2 and subcutaneous to Group 3; and as repeated dose applications, 20 mg/kg were administered orally for three days to Group 4 and five days to Group 5. From the first day of both oral and parenteral administration, florfenicol and florfenicol amine were detected in eggs as % 0.1, %0.08 respectively regardless the route of application and %57 of the elimination process were eventuated at the egg yolk. Withdrawal time of the drug for Group 1, 2 and 3 were found as seven days, for Group 4 as eight days and for Group 5 as nine days.

Residue levels in eggs were investigated on various incubation conditions (room temperature, 15-20°C; refrigerator, +4 °C) and both florfenicol and florfenicol amine were still found on the 28th day, even though the level of the residue decreased significantly. Frying and boiling (1 and 5 minutes) cooking procedures revealed similar results to incubation described above; where significant decrease in the residue levels were observed, however was not yet enough for decomposing. These results indicate that florfenicol and florfenicol amine was found as resistant to heating procedures.

To conclude, it could be suggested that florfenicol should not be used in laying hens and in obligatory conditions, the withdrawal time of the drug in the eggs should be followed precisely (in oral, intramuscular and subcutaneous single dose applications for at least seven days; in three days consecutive oral dose applications for at least eight; in five days consecutive oral dose applications for at least eight days) and the human consumption of these contaminated eggs should be avoided.

## II. Amaç ve Kapsam

Evcil hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi ile yemden yararlanmanın artırılması veya gelişmenin hızlandırılması amacıyla ilaç kullanımı günümüzde vazgeçilmez bir uygulama haline gelmiştir. Bu amaçla yararlanan birçok ilaç arasında tavukçuluk sektöründe antibakteriyel ilaçların kullanımı önemli bir yer tutmaktadır (Kaya ve ark., 1992; Norcross ve Brown, 1991). Antibakteriyel ilaçların kanatlılarda gelişmeyi hızlandırmak amacıyla kullanımı Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde 2006 yılından beri yasak olmasına rağmen Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde halen bu amaçla kullanıldığı bildirilmektedir (Goetting ve ark., 2011).

Hayvanlara gereksiz veya aşırı miktarlarda ilaç verilmesi, ilaç kalıntı arınma süresine uyulmaması, yem katkısı olarak kullanımlarda karıştırma hatalarının yapılması veya hayvanların mevcut fizyolojik durumları dikkate alınmadan (yumurtlayan veya sağılan) ilaç müstahzarlarının seçilmesi gibi faktörler ilaçların gıda zincirine girmelerine neden olmaktadır. Bu durumun başta antibiyotikler olmak üzere insan tüketimi için vazgeçilmez protein kaynağı olan hayvan kökenli gıdalarda ilaç kalıntıları riskini oluşturması (Katz ve Levin, 1978; Norcross ve Brown, 1991; Norcross ve Post, 1990) bu araştırma projesine temel oluşturmuştur.

İlaç kalıntılarının, başta çocuk ve yaşlılar olmak üzere insanların gıda zincirine girerek, hafif bir allerjiden kanserojen, teratojen veya mutajenik etkilere ve hatta penisilinlerde olduğu gibi ölüme kadar varabilen ciddi halk sağlığı problemlerine yol açtığı bilimsel verilerle ortaya konulmuştur (Botsoglou ve Fletouris, 2001; Donoghue, 2003; Kaya ve Şahal, 1989; Paige ve ark., 1997). FAO (Gıda ve Tarım Örgütü), WHO (Dünya Sağlık Örgütü) gibi kuruluşlar söz konusu sağlık sakıncalarını en aza indirebilmek için ilaç kullanımından sonra her ilaca özgü olan yasal bekletme sürelerine uyulmasını zorunlu kılmaktadır (Nouws, 1981). Ancak ilacın vücuttan tamamen atılması için gereken bekletme sürelerinin çoğu zaman uzun olması ve bu süre içerisinde kalıntı ihtiva eden et, süt ve yumurta gibi ürünlerin tüketilmeden imha edilmesi, ekonomik yönden yetiştiriciye külfet olmakta ve bu nedenle yasal bekletme sürelerine uyulmasını güçleştirmektedir. Ayrıca birçok ilaç için bu sürelerin bilinmediği gibi bilinenlerin de kalıntı izleme programı için yeterli kontrol ve denetimlerinin yapılmadığı bilinmektedir. Bu amaçla Avrupa Birliği (AB) "çiftlikten sofraya gıda güvenliğini sağlamak" için "*izlenebilirlik*" kapsamı içerisinde kalıntı ile ilgili direktifler oluşturarak, birçok ilaç için gıdalarda bulunması gerekli limitleri belirlemişlerdir (Commission Regulation 1181/2002).

Türkiye'nin AB ile müzakerelerinin devam ettiği süreç içerisinde oluşturulan uzman komisyonlar, veteriner ilaç kalıntı limitlerini AB mevzuatını dikkate alarak 09.03.2007 tarih ve 26457 sayılı resmi gazetede yayımlanan Tebliğ ile hazırlamışlardır (Türk Gıda Kodeksi Tebliği, 2007). Bu tebliğde florfenikolün kanatlı etleri ve sakatları için maksimum kalıntı limitleri (MRL) verilmesine karşın, yumurtası insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılmayacağı belirtilmiştir. Bilindiği gibi AB mevzuatı hazırlanırken ilgili uzmanlar yapılan bilimsel araştırmaları dikkate alarak karar vermekte ve ilacın bir hayvan türünde kullanıldığını gösteren bilimsel bir araştırma olmadığı takdirde, insan sağlığını da düşünerek o türde kullanılmasını yasaklamak suretiyle önlem almaktadırlar. Zira yapılan literatür taramalarında florfenikol'ün yumurtaya geçiş düzeyi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Halbuki yine AB ülkelerinde yumurtası insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılması yasak olan dihydrostreptomisin (Roudaut, 1989), spektinomisin (Roudaut 1989), gentamisin (Filazi ve ark., 2005), apramisin (Romvary ve ark., 1991), kanamisin (Yoshida ve ark., 1976), kloramfenikol (Sisodia ve Dunlop, 1972; Samouri ve ark., 1993 ve 1998), tiamfenikol (Giorgi ve ark., 2000), ampisilin (Donoghue ve ark., 1997; Roudaut ve ark., 1987) ve sefaleksis (Kitagawa ve ark., 1988) gibi antibakteriyel ilaçların yumurtaya geçiş düzeyi ve ilaç kalıntı arınma süresini gösteren pek çok çalışmaya rastlanmıştır. Sayılan bu antibakteriyel ilaçlardan spektinomisinin

yem (yeme 110, 165 ve 220 mg/kg miktarda katılarak 7 gün süreyle verildiğinde) (Cuerpo ve Livingston, 1994) ve su (suya 0.5 g/L oranında katılıp 50 mg/kg canlı ağırlık dozunda 5 gün süreyle verildiğinde) (Roudaut, 1989) ile kullanıldığında yumurtada kalıntısının olmayacağını gösteren çalışmalar olmasına rağmen AB ülkelerinde kullanılması yasaktır. Ancak ABD’de yumurta tavuklarında kullanılmasına izin verilmekte ve maksimum kalıntı limiti de 0 mg/kg olarak verilmektedir. Yine aynı şekilde neomisin suya 0.25 g/L oranında (her kg canlılık için 25 mg neomisin) katılıp hayvanlara 5 gün süreyle verilmesi sonunda yumurtada kalıntı olmayacağını gösteren çalışmaya karşın (Roudaut, 1989) ABD’nde neomisin kullanımı yasak ama AB ülkelerinde serbesttir (yumurta için 500 µg/kg maksimum kalıntı limiti verilmiştir). Bunun yanında Çin Halk Cumhuriyetinde yapılan bir çalışmada yerel satış yerlerinden toplanan 50 adet tavuk yumurtasının bir tanesinde 19 µg/kg florfenikol ve 36 µg/kg florfenikol amin bulunması yasak olmasına rağmen florfenikolün yumurtası insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanıldığını gösteren bariz örneklerden biridir (Xie ve ark., 2011).

Florfenikol, veteriner hekimlikte kullanılmak üzere özel olarak geliştirilmiş, tiamfenikol ve kloramfenikolün de içinde bulunduğu amfenikoller sınıfında bulunan, geniş spektrumlu sentetik bir antibakteriyel ilaçtır. Yapısal olarak kloramfenikole benzediği ama 2 yerde ondan ayrıldığı bildirilmiştir; birincisi p-nitro grubu yerine metil sülfonil grubu, ikincisi ise hidroksil grubu yerine flor atomunun varlığıdır (EMEA, 1999) Ayrıca tiamfenikolden de hidroksil grubu yerine 3’karbon pozisyonunda flor atomu içermesiyle ayrılır. Bu bağın florfenikolü *in vitro* ortamda kloramfenikol ve tiamfenikolden daha etkin hale getirdiği ve tiamfenikol ve kloramfenikole dirençli olsalar bile evcil hayvanlarda infeksiyonlara neden olan *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Haemophilus somnus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus suis*’e karşı onlardan daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu bildirilmiştir (Cannon ve ark., 1990; Graham ve ark., 1988).

Florfenikolün, 3 ile 9 aralığındaki pH seviyelerinde iyonlaşmadan kaldığı (Sams, 1995) ve ayrıca sulu çözeltilerde zayıfça çözüldüğü kaydedilmiştir. Lipofilik özelliğinden dolayı dokulara iyi dağılım gösterir. Geniş etki spektrumu, terapötik etkinliği, düşük toksisite riski ve gıda değeri olan hayvanlarda solunum ve sindirim sistemi infeksiyonlarının tedavisinde etkinlik sağlaması nedeniyle tartışmasız en önemli veteriner ilaçlarından biri haline gelmiştir. Ayrıca yapısal analoglarına üstünlüğü nedeniyle etiket dışı ilaç kullanım potansiyeli yüksektir. Bunun için doz miktarı, dozaj aralığı ve ilaç kalıntı arınma süresinin belirlenmesiyle ilgili bilgilerin öğrenilmesini sağlayan farmakokinetik çalışmaların yapılması, sağaltımdaki başarısızlığı ve istenmeyen ilaç kalıntılarının önlenmesi için gerekli olarak görülmektedir (Chang ve ark., 2010). Florfenikolün farmakokinetiğine yönelik çalışmalar besi sığırı (Adams ve ark., 1987; Lobell ve ark., 1994; Varma ve ark., 1986), süt ineği (Bretzlaff ve ark., 1987), domuz (Jiang ve ark., 2006; Li ve ark., 2006), tavşan (El-Aty ve ark., 2004), koyun (Jianzhong ve ark., 2004), balık (Christopher ve ark., 2003) ve tavuk (Afifi ve El-Soud, 1997; Anadon ve ark., 2008; Chang ve ark., 2010; Ismail ve El-Kattan, 2009; Shen ve ark., 2002 ve 2003;) gibi bir çok gıda değeri olan hayvanda yapılmıştır. Ancak tavuklarla yapılan çalışmaların hepsi etçi tavuklarda yapılmış, yumurtlayan tavuklarda kullanılması sonucu yumurtaya geçip geçmediği veya geçtiği takdirde hangi oranlarda geçtiğine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Birçok ilacın diğer kanatlılarda kullanılmasına izin verilmesine rağmen, yumurta tavuklarında sınırlı sayıda antibiyotığın (AB ülkelerinde sadece neomisin, tilozin, eritromisin, kolistin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin ve tetrasiklin; ABD’de ise sadece spektinomisin, tilozin, eritromisin ve klortetrasiklin) kullanılmasına izin verilmektedir (Goetting ve ark., 2011). Bu

nedenle tavuk yumurtalarındaki ilaç kalıntıları insanlarda haklı olarak endişeye yol açarlar. Yumurtalarda ilaç kalıntılarının görülmesi tavuğa yanlışlıkla ilaçlı yem verilmesi, yemin hazırlanması ve karıştırılması sırasında kontamine olması veya etiket dışı ilaç verilmesinden kaynaklanır (Şanlı, 1999). Bir tavuk yaklaşık her 24 saatte bir yumurtlarken, yumurtanın *in vivo* olarak gelişmesi günlerce sürer. Yumurtanın doğası gereği uzun süren gelişmesi nedeniyle, ilaçların arınması için ilacın verilmesini takiben haftalar geçmesi gerekebilir.

Yumurtanın üç ana bileşeninden (yumurta sarısı, beyazı ve kabuğu) yumurta sarısı, en uzun gelişme süresine sahip kısımdır. Yumurta sarısı lipoproteinlerinin prekürsörleri (öncüleri) karaciğerde üretilir ve ovaryumdaki yumurta sarısı folliküllerine kan dolaşımıyla taşınırlar. Aktif olarak yumurtlayan bir tavukta farklı gelişme aşamasında birçok follikül ovaryumda aynı anda bulunur. Yumurta, yumurtlanmadan önce yumurta sarısı 10 gün gibi bir sürede boyutunun katlanarak hızlı bir şekilde büyüyeceği büyüme dönemine girer. Yumurta sarısında biriken ilaçlar bu sürede hızla birikirler ve tedaviyi takiben arka arkaya 10 gün veya daha fazla bir süre yumurtada bulunabilirler. Yumurta sarısının olgunlaşmasını takiben 2-3 saatte yumurta akı üzerini kaplar. Yumurta akı da ilaç kalıntısı için yeni bir depolanma alanıdır. Yumurta akının proteinleri birikip suyla seyreltikten sonra yumurta kabuğu da bunun üzerine eklenir. Birçok ilaç fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak yumurta sarısı veya akında birikebilir. Kalıntıların dağılımını ilacın plazma proteinlerine bağlanma eğilimi, hidrofobik veya hidrofilik olması ve farklı dokulara taşınma yeteneği etkiler. Bununla beraber bir ilacın kinetiği kimyasal özelliklerinden her zaman tahmin edilemez (Goetting ve ark., 2011). Kloramfenikolün tavuklara içme suyuyla 5 gün boyunca 40 mg/L miktarında verilmesiyle, ilacın kesilmesini takiben yumurta sarısında >5 gün, akında 4 gün boyunca görülmesine rağmen (Sisodia ve Dunlop, 1972), tiamfenikolün yine tavuklara 5 gün boyunca 40 mg/kg dozunda kapsül şeklinde verilmesiyle yumurta sarısında 8 gün ve beyazında 1 gün kalması (Giorgi ve ark., 2000), yapısal yönden birbirine benzeyen ilaçlarda bile bir farklılık olduğunu ve kimyasal özelliklerine bakarak kinetiğinin tahmin edilemeyeceğini gösteren örneklerdir. Aynı şekilde yeme her kg canlı ağırlığa 35 mg dozunda olacak şekilde uygulanan kloramfenikolün 3.25, 3.75 ve 4.25 aylık tavukların yumurtasında bulunmadığını ama 4.75 ve 5.25 aylık tavukların yumurtasında 23 gün ve 10 aylık tavukların yumurtasında 73 gün süreyle kalıntı bıraktığını gösteren çalışma (Schwarzer ve Dorn, 1987) tavukların yaşının da yumurtada kalıntı oluşmasına etki ettiğini göstermektedir.

Hayvanlarda florfenikolün metabolizmasını belirlemek amacıyla yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalardan bir tanesinde, danalara kas içi yoldan verilen 20 mg/kg dozundaki florfenikolün yaklaşık %64'ünün idrarla ana ilaç olarak atıldığı, idrardaki metabolitlerinin florfenikol amin, florfenikol alkol, florfenikol oksamik asit ve mono-klorfenikol olduğu, florfenikol aminin sığırların karaciğerinde en uzun kalan major metabolit olduğu ve bu yüzden ilaç kalıntı arınma süresinin hesaplanmasında marker kalıntı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Sams, 1995). Anadon ve ark.(2008) tarafından yapılan bir çalışmada, etçi tavuklara ağızdan günlük 40 mg/kg dozda (her seferinde 12 saat arayla 20 mg/kg) 3 gün boyunca verilen florfenikolün ilacın kesilmesini takiben böbrek ve karaciğerde 7 gün boyunca (sırasıyla florfenikol 119.34 ve 817.34 µg/kg; florfenikol amin 60.57 ve 48.50 µg/kg) kaldığı bildirilmiştir. Böylece hayvanların tüketilebilir dokularında florfenikol ve metaboliti olan florfenikol aminin kalıntılarının kalış süresinin uzamasının halk sağlığına yönelik risk oluşturması nedeniyle gıda güvenliğinde önemli bir rol oynadığı, ilaç kalıntı arınma süresinin bu dozda verildiğinde 6 gün olarak uygulanmasının florfenikol için AB'nin kabul ettiği maksimum kalıntı limitlerinin altına düşmesi için gerekli olduğu rapor edilmiştir.

Yukarıda belirtilen gerekçelerle florfenikolün yumurtaya geçiş düzeyinin şimdiye kadar

belirlendiğine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmaması bir eksiklik olarak değerlendirilmiş ve bu projede birincil hedef olarak bunun ortaya konulması amaçlanmıştır.

Ayrıca hayvan kaynaklı birçok gıda maddesi tüketilmeden önce pişirildiğinden veya belirli bir süre muhafaza edildiğinden pişirme işlemi veya değişik ısılarda muhafaza işlemlerinin antibiyotik kalıntılarını azaltıp azaltmayacağı da sürekli bir ilgi konusu olmuştur. Birçok araştırmada özellikle gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntılarına uygulanan değişik pişirme işlemleri ve farklı ısılardaki muhafaza yöntemlerinin kalıntının miktarında azalmaya neden olduğu veya değiştirmedeği ortaya konmuştur (Baydan ve ark., 2000a, 2000b ve 2002; Gustafson, 1991; Nouws ve Ziv, 1976; Şireli ve ark., 2006). Veteriner ilaçlarının kalıntılarına yönelik olarak uygulanan ısı işlemleriyle genellikle sulfametazin (Pappanagioutou ve ark, 2005; Rose ve ark., 1995), oksasilin, kloramfenikol, aminoglikozidler, kinolonlar, klindamisin, novobiosin, trimetoprim, vankomisin ve azlosilinin ısıya dayanıklı (Traub ve Leonhard, 1995), oksitetrasiklin, (Hassani ve ark., 2008) ve eritromisinin (Traub ve Leonhard, 1995) ısıya duyarlı olduğu bildirilmektedir. Öte yandan penisilin G, ampisilin ve amoksisilin gibi bazı beta-laktamların kısmen duyarlı oldukları belirtilmektedir. Ayrıca aynı sınıftan olsa bile bazı antibiyotiklerin ısı işleminin uygulandığı farklı matriks ve ısı işlemine farklı yanıtlar verebildiği (Franje ve ark., 2010; Kitts ve ark., 1992; Rose ve ark., 1996) belirtilmiştir.

Yumurtanın kızartma, 1.5 ve 5 dk kaynatma ve +4 °C'de muhafaza edilmesiyle gentamisin kalıntılarının etkilenmediği, ancak oda ısında muhafaza edilen yumurtaların gentamisin kalıntısı miktarında 21. ve 28. günlerde önemli bir azalmaya uğradığı bildirilmektedir (Şireli ve ark., 2006). Tavuk dokularındaki enrofloksasin (Baydan ve ark., 2000a) ve danofloksasinin (Baydan ve ark., 2000b) kalıntıları üzerine yapılan çalışmalarda kalıntıların ızgara işleminden etkilenmediği ama dokuları suyla haşlamanın kalıntıda azalmaya neden olduğu ancak kalıntının haşlama suyuna geçtiği, -18 °C'de muhafaza edilen dokuların ise 5. güne kadar kalıntıda bir değişikliğe yol açmadığı, ancak 20. ve 30. günlerde önemli miktarda azaldığı rapor edilmiştir. Sülfakinoksalin, süfadimetoksin ve süfadoksinin tavuk dokularındaki kalıntıları üzerine yapılan bir başka çalışmada dokulara uygulanan pişirme işlemlerinin (ızgara ve haşlama) kalıntıda azalmaya neden olduğu, derin dondurucuda muhafaza etmenin ise kalıntı miktarını etkilemediği belirtilmiştir. Siprofloksasin, norfloksasin ve flumekuin'in de araştırıldığı aynı çalışmada ise sülfonamidlerin tersi olarak kinolonların pişirme işlemlerinden etkilenmediği, ancak derin dondurucuda muhafaza etmenin kalıntı miktarında düşmeye neden olduğu bildirilmiştir (Baydan et al., 2002). Sulfametazinin 100 °C'de suda haşladıktan sonra stabil kaldığı, ancak 260 °C'de yağda kızartmayla parçalandığı, ayrıca derin dondurucuda saklamayla 3 ay boyunca dayanıklı kaldığı da bildirilmiştir (Rose ve ark., 1995). Oksitetrasiklinin ise dokuların 100 °C suda pişirilmesiyle dayanıksız olduğu ama 180 °C'de bitkisel yağda kızartılmasının daha dayanıklı olduğu ortaya konulmuştur (Rose ve ark., 1996).

Franje ve ark (2010) tarafından amfenikollerle yapılan bir çalışmada normal suya, tuzlu suya, soya sosuna ve tavuk etine eklenen florfenikol, tiamfenikol ve kloramfenikol 100 °C'de 2 saate kadar pişirilmiş ve sonuçta 3 bileşiğin de tavuk etinde ve soya sosunda diğerlerinden daha çok parçalandığı, ayrıca mikrodalgayla pişirmenin parçalanmayı hızlandırdığı rapor edilmiştir. Ancak araştırmacılar, gıdalarda bulunabilecek amfenikol kalıntılarının ısı işlemi uygulanmasıyla insan tüketimi için güvenli bir gıda temini sağlanmasının beklenmemesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

Yukarıda verilen bilgilerden de anlaşılacağı gibi yapılan araştırmalar, veteriner ilaçlarının hayvansal dokularda kalıntı bıraktığını ortaya koymakta ve kalıntı içeren hayvansal gıdaların, gıda zincirinin bir halkası olarak insan gıdasına dönüştüğünde önemli riskler söz konusu

olabileceğini göstermektedir. Büyüme yaşındaki çocuklar günlük diyetlerinde hemen hemen her gün, diğer yaş gruplarındaki insanlar ise haftalık diyetlerinde önemli miktarlarda yumurta tüketebilmektedirler. Eğer yumurta üretimi kontrolsüz ve sağlıksız işletmelerde yapılıyorsa, işletmeler kullandıkları veteriner ilaçları için gerekli yasal kalıntı arınma sürelerine dikkat etmiyorlarsa veya etiket dışı ilaç kullanımı söz konusu oluyorsa, bu durum halk sağlığı için ciddi risk yaratıyor demektir.

Projenin temel amacı yumurta tavuklarında sağaltım dozlarında oral veya parenteral yolla uygulanan florfenikol'ün yumurtaya geçiş oranının ortaya konulması ve aynı yumurtalara değişik pişirme işlemleri (haşlama, kızartma gibi) uygulandıktan ve değişik sıcaklıklarda muhafaza edildikten sonra florfenikol miktarında ne gibi değişiklikler şekillenebileceğinin ortaya konmasıdır. Böylece florfenikol'ün yumurtaya geçiş oranının yanı sıra pişirme işlemi ve değişik sıcaklıklarda muhafaza etmenin florfenikol kalıntılara olan etkisi belirlenecektir. Bu bağlamda Türkiye'de florfenikol'ün yumurta tavuklarında etiket dışı kullanılma olasılığının olması, böyle bir çalışmanın yapılmasına temel oluşturmuştur. Ayrıca ulusal kalıntı mevzuatımızda florfenikol'ün kanatlı etleri ve sakatatları için maksimum kalıntı limitleri verilmesine rağmen yumurta için yasal bir limitin verilmemesi de bu kapsamda dikkate alınmıştır. Zira bu çalışmadan elde edilecek sonuçların gelecekte hazırlanacak mevzuata temel oluşturması gibi bir yarar sağlaması da projenin amaçları arasında sayılabilir.

Bu araştırma projesinden beklenen özgün değer Türkiye'de kanatlı sektöründe kullanılan florfenikol'ün yumurtaya geçişi, kalışı ve teknolojik işlemlerle kalıntının nasıl etkilendiğinin belirlenmesidir. Yapılan literatür çalışmalarında bu konuyla ilgili bir çalışmaya rastlanmadığı gibi yasal mevzuatlarda da florfenikol'ün yumurta üretiminde kullanılmaması gerektiği belirtilmektedir. Ayrıca araştırma projesi yumurtalarda florfenikolün saptanması ve düzeyinin belirlenmesiyle ilgili yöntem olarak da özgünlük taşımakta olup, konuyla ilgili hiç bir çalışmanın bulunmaması ve yumurtalara ilişkin yöntem geliştirilmemiş olması ile de özgünlük taşımaktadır (Ancak proje sonuçlandıktan ve yazım aşamasına geçildikten sonra Xie et al. (2011) tarafından henüz basımda olan bir yöntem çalışmasına rastlanmıştır). Zira kalıntıların yumurtadan geri alınımı ve değerlendirilmesi oldukça zahmetli bir çalışmayı gerektirmektedir. Bu nedenle bu araştırma projesi ile yeni bir ilke adım atılması da amaçlanmaktadır.

### **III. Materyal ve Yöntem**

*Kimyasal maddeler ve ayıracılar:* Florfenikol (%99.5) (Fluka, F1427, 081K1680) ve florfenikol amin (%100) (TRC, Lot#4-QFY-179-1) analitik standartları Medikavet ve İntervet Firmalarından bağış yoluyla sağlandı. Kloramfenikol analitik standardı (Sigma, QFY-179-1), Asetonitril ve polietilen glikol (PEG) Sigma'dan, etil asetat ise Merck'ten HPLC saflığında satın alındı. Ultra saf su Milipore marka su cihazından sağlandı. Tavuklarda ağızdan ilaç uygulamak için kanatlılarda kullanılmaya özgü olarak ruhsatlandırılmış ve beher ml'de 300 mg florfenikol içeren ticari bir müstahzardan (Mediflor %30 Oral çözelti, Medikavet), kas içi ve deri altı ilaç uygulamak içinse yine büyükbaş hayvanlarda kullanılmaya özgü ruhsatlandırılmış ve beher ml'de 300 mg florfenikol içeren ticari bir müstahzardan (Florvil Enjektabl, Vilsan A.Ş.) yararlanıldı. Ekstraksiyon aşamasında kullanılan 0.1 M fosfat tampon (pH 7); 117 ml 0,2 M monobazik stok (13,9 g sodium fosfat monobazik tartılarak 500 ml suda çözülürerek hazırlandı) ile 183 ml 0,2 M dibazik stok (24,8 g sodium fosfat dibazik tartılarak 1000 ml suda çözülürerek hazırlandı) karıştırılarak 600 ml su ile tamamlanarak elde edildi.

*Standart stok çözelti ve çalışma çözeltileri:* Florfenikol ve florfenikol amin standartları 500 µg/L konsantrasyonda polietilen glikol (PEG) ile hazırlandı. Ana stoktan hazırlanan diğer

derişimlerde ise ultra saf su kullanıldı. İnternal standart olarak kullanılan kloramfenikol (Sigma, QFY-179-1) ise ultra saf suda çözdürülerek hazırlandı.

*Araç ve cihazlar:* Numune hazırlanmasında azot evaporatörü (VLM Evra marka, Almanya), hassas terazi (Sartorius marka), Vortex mixer (Velp marka), Soğutmalı santrifüj (Sigma) ve ultra saf su cihazı (Millipore marka) kullanıldı. Kromatografi için Shimadzu Model 20-AT prominence HPLC sistemi ve Photo Diode Array detektör kullanıldı (Shimadzu Company, Japonya). Ayırma işlemi Inertsil C<sub>18</sub> kolonla (250mmX4,6 mm i.d., 5 µm) yapıldı. Kolon sıcaklığı 30°C'de sabitlendi. İnjesiyon hacmi otomatik örnekleyici ile 20 µl'ye ayarlandı. Analiz işlemi mobil faz olarak asetonitril: su (27:73; v/v) kullanılarak ve akış hızı 0.6 ml/dk'ya ayarlanarak yapıldı. Detektörün dalga boyu 223 nm'ye ayarlandı.

#### *Hayvanlar*

Tavuklar ve kümes Ankara'nın Sincan İlçesi Yenikent Beldesinde bir yumurta tavuğu yetiştiriciliği yapan firmadan (Bil-Yem A.Ş.) karşılandı. Çalışmada 50 adet ISA Brown ırkı, 40 haftalık, 1.7-2.2 kg ağırlığında yumurta tavuğu kullanıldı. Tavukların her biri ayrı kafeslerde (30X35X45 cm'lik tel kafesler) tutuldu ve kümes ısısının sabit bir ısıda (20 °C) olması sağlandı. Gün ışığı 14 saat olarak tutuldu. Burada tavuklara ilaç uygulamadan önce 2 hafta boyunca ilaç katılmamış ve kirletici madde kalıntısı içermeyen yem (Ham protein %23, metabolik enerji 3100 kkal/kg, ham kül %8, ham selüloz %6) ve su *ad libitum* olarak verildi. Bunun için önce Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan izin alındı (Karar No: 2007-15-45).

#### *Denemeler*

Denemeler iki periyotta yapıldı (Şekil 1). Birinci periyotta florfenikolün değişik uygulama yollarından verildikten sonra tüm (homojenize) yumurta, yumurta sarısı ve akına geçiş düzeyi ayrı ayrı belirlendi. Bunun için her grupta 10 tavuk olacak şekilde 5 gruba ayrılan hayvanlardan birinci gruba ağızdan (kursak içine), ikinci gruba kas içi, üçüncü gruba deri altı tek dozda 20 mg/kg, dördüncü gruba 3 gün ve beşinci gruba 5 gün boyunca ağızdan (kursak içine) günlük 20 mg/kg canlı ağırlık dozunda florfenikol uygulandı (Tablo 1). İlaç verme işlemi öğleden önce saat 09.00-10.00 arasında yapıldı. Yumurtalar ilaç verildikten sonra günlük olarak toplandı. Bazı tavuklar bazı günlerde yumurtlamadıkları için her gruptan 8 yumurta toplandı ve florfenikol ve metaboliti olan florfenikol amin kalıntısı yönünden analiz edildi.

**Tablo 1.** Birinci periyotta tavuklara uygulanan florfenikol dozu ve uygulama yolu

Grup (n=10)	Uygulama yolu	Doz (mg/kg)	Uygulama süresi
1	Ağızdan	20	1 defa
2	Kas içi	20	1 defa
3	Deri altı	20	1 defa
4	Ağızdan	20	3 gün
5	Ağızdan	20	5 gün

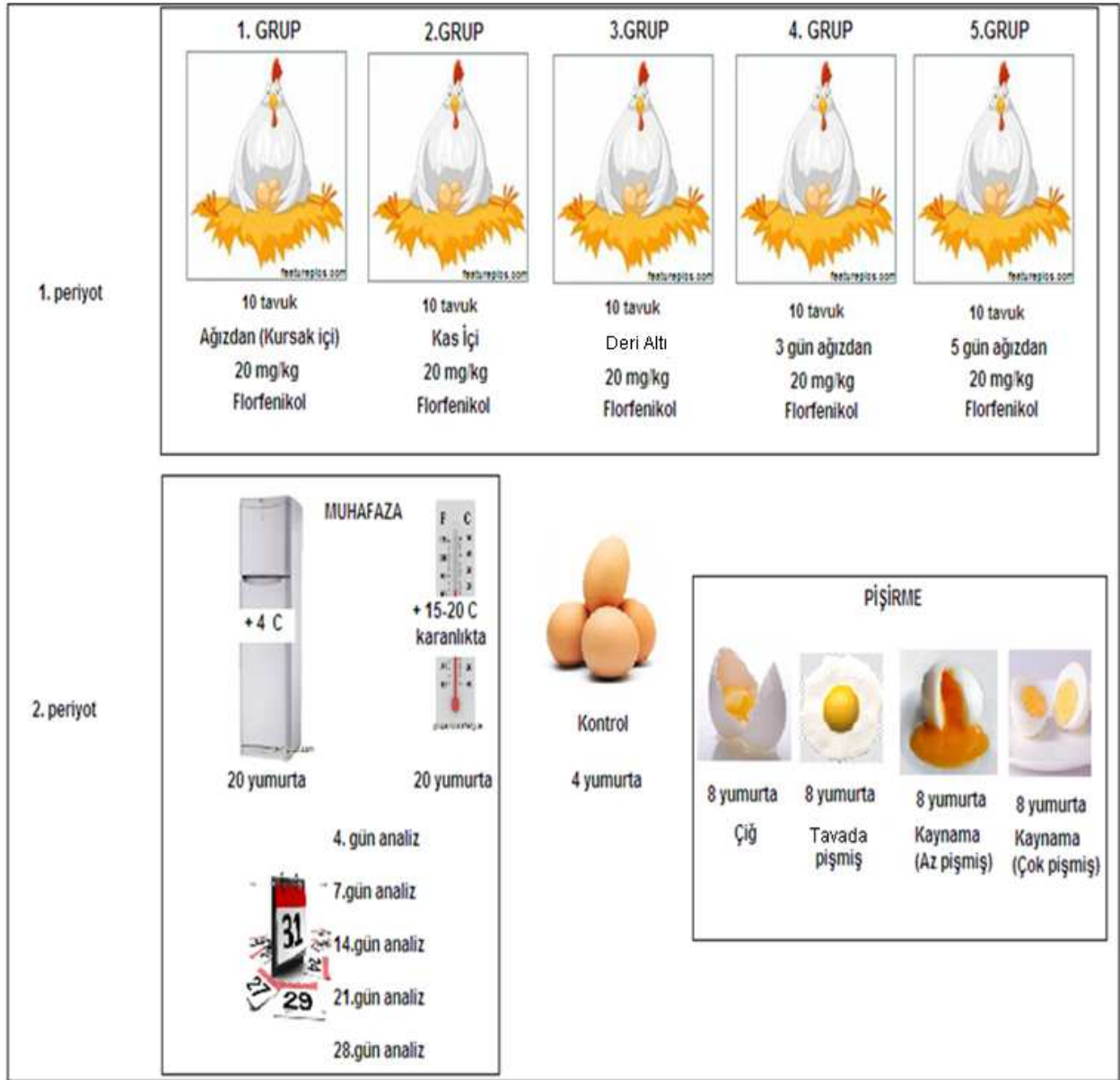
Birinci periyotta ilaç uygulanan tavuklar, florfenikolün vücuttan tamamen arınması için aynı yemle 60 gün boyunca beslendi. Daha sonra aynı tavukların hepsine piyasada en çok tercih edilen uygulama yolu olması nedeniyle ağızdan 20 mg/kg dozunda florfenikol 3 gün boyunca verildi. Bunların toplanan yumurtalarında birinci gün muhafaza işlemlerinin kalıntılara yönelik etkisi (44 tanesi), ikinci gün ise pişirme işlemlerinin kalıntılara yönelik etkisi (32 tanesi ) belirlendi. Buna göre birinci gün toplanan yumurtalardan 4 tanesi çiğ olarak analiz edilirken, 20

tanesi +4°C’de buzdolabında, 20 tanesi ise 15-20 °C’de oda ısısında muhafaza edilerek 4, 7, 14, 21 ve 28. günlerde her seferinde 4 adet olmak üzere florfenikol ve onun metaboliti olan florfenikol amin yönünden analiz edildi. İkinci gün toplanan yumurtaların 8 tanesi çiğ, 8 tanesi yağda kızartılarak, 8 tanesi az pişmiş (1 dk kaynatma), 8 tanesi ise çok pişmiş (5 dk kaynatma) haşlama işlemlerine tabi tutularak analiz edildi (Tablo 2). Bu dönemde yapılan analizlerin hepsi homojenize yumurtada yapıldı. Böylece pişirmenin ve değişik ısılarda muhafazanın kalıntılara etkisi ortaya kondu.

Tablo 2. İkinci periyotta tavuklara ve yumurtalara uygulanan işlemler

Günler	Tavuklara uygulanan işlem (50 adet tavuk)	Yumurtalara yapılacak işlem
1. gün	Ağızdan ilaç uygulandı (20 mg/kg florfenikol)	-
2. gün	Ağızdan ilaç uygulandı(20 mg/kg florfenikol)	-
3. gün	Ağızdan ilaç uygulandı (20 mg/kg florfenikol)	-
4. gün	44 adet yumurta alındı	4 tanesi hemen analiz edildi 20 tanesi +4 °C’de buzdolabında bekletildi 20 tanesi Oda ısısında bekletildi (4, 7, 14, 21, 28 gün muhafaz□)
5. gün	32 adet yumurta alındı	8 adet çiğ olarak analiz edildi. 8 adeti az pişmiş haşlamaya tabii tutulup analiz edildi. 8 adeti çok pişmiş haşlamaya tabii tutulup analiz edildi 8 adeti yağda kızartılarak analiz edildi.
8. gün	-	Buzdolabında ve oda ısında bekletilen yumurtalardan 4’er tanesi analiz edildi (4 günlük muhafazanın etkisi)
11.gün	-	Buzdolabında ve oda ısında bekletilen yumurtalardan 4’er tanesi analiz edildi (7 günlük muhafazanın etkisi)
18. gün	-	Buzdolabında ve oda ısında bekletilen yumurtalardan 4’er tanesi analiz edildi (14 günlük muhafazanın etkisi)
25. gün	-	Buzdolabında ve oda ısında bekletilen yumurtalardan 4’er tanesi analiz edildi (21 günlük muhafazanın etkisi)
32. gün	-	Buzdolabında ve oda ısında bekletilen yumurtalardan 4’er tanesi analiz edildi (28 günlük muhafazanın etkisi)

Çalışmanın her iki periyodunu gösteren toplu şeması Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Çalışma Yöntemi şeması

#### Örneklerin hazırlanması:

Proje başvurusu yapıldığı sırada yumurtadaki florfenikol ve metaboliti olan florfenikol amin kalıntılarının ekstrakte edilmesi ve belirlenmesi için geliştirilmiş bir yöntem olmadığından bu amaçla Shen ve ark. (2002)'nin plazmadan florfenikol'ü ekstrakte etmek için geliştirdiği yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Bunun için analiz edilecek örnekten (yumurta sarısı, akı veya homojenize yumurta) 1 g yumurta 50 mL'lik polipropilen santrifüj tüplerine tartıldı, üzerine 1 mL 0.1 M fosfat buffer çözeltisi (pH 7.0) ilave edilerek vorteksle yaklaşık 1 dk karıştırıldı. Bunun da üzerine 4 mL etil asetat eklenip 2 dk daha karıştırıldı. Üstte kalan kısım diğer bir tüpe aktarıldı. Geri kalan kısım etil asetatla aynı işlem yapıldı. Üstte kalan kısımlar birleştirilip 45 °C'ye ayarlanmış azot evaporatöründe kuruyana kadar uçuruldu. Elde edilen kalıntı 1 mL mobil fazla (asetonitril:su, 27:73, v/v) çözdürüldü ve 18.000 x g'da 15 dk santrifüj edilerek 0.45 µm'lik disposable filtreden süzülerek bunun 20 µL'si HPLC'ye uygulandı.

**Veri Analizleri:** Uygulamalar arası farklılığın değerlendirilmesi, günler arası farklılığın anlamlılığı ve pişirme-muhafaza işlemlerinin değerlendirilmesi amacıyla uygulanan istatistik hesaplamalar için “SPSS 17.0” ile “NCSS 2007” istatistik paket programlarından yararlanıldı. Veriler aritmetik ortalama ve standart sapma şeklinde ifade edildi. Yumurtaya geçiş oranı ise tüm yumurtada ölçülen toplam kalıntının verilen toplam doza bölünmesiyle (Filazi ve ark., 2005; Inglis ve Katz, 1978) hesaplandı.

#### **IV. Analiz ve Bulgular**

##### **Yöntemin Validasyonu**

###### *Seçicilik (Selectivity)*

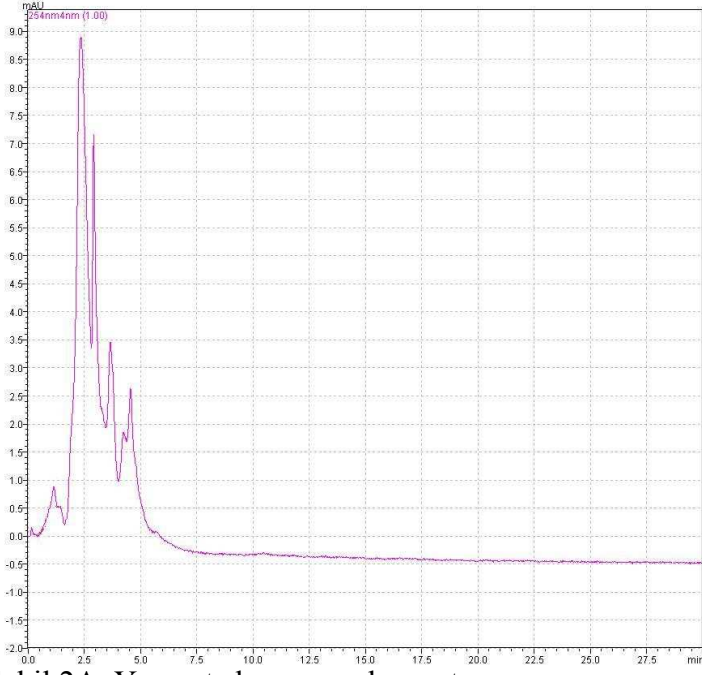
Yöntemin seçiciliği altı farklı kör (blank) ile 5 farklı yüklü (spike) konsantrasyonda yumurta sarısı, yumurta beyazı ve homojenize yumurta ile belirlendi. Bu kromatogramlarda herhangi bir kirlilik ve yabancı pik gözlenmedi. Florfenikol, florfenikol amin ve internal standart olan kloramfenikolün alikonulma zamanları analitik standartlarda sırasıyla 21.57, 11.26 ve 25.11 dakika olarak bulunurken, yüklü numunelerde sırasıyla 20.98, 13.37 ve 23.28 dakika olarak bulundu (Şekil 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B).

###### *Duyarlılık (Sensitivity)*

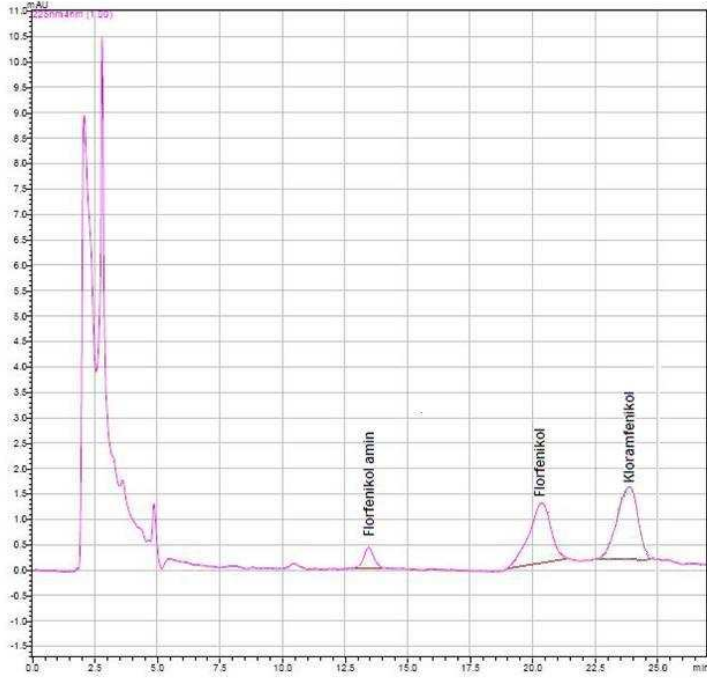
Yöntemin duyarlılığı ise en düşük tespit limiti (LOD) ve en düşük hesaplama limiti (LOQ) değerlendirilerek yapıldı. LOD, signal to noise oranı 3:1 verilerek numunedeki her bir analitin konsantrasyonuna göre hesaplandı. LOQ ise signal to noise oranı 10:1 olarak her bir analitin kalibrasyon eğrisindeki en düşük nokta olarak belirlendi. Bunun için florfenikol ve florfenikol aminin standart eğrileri 0.19-100 ppb aralığında (aritmetik olarak iki kat artış ile 0.19; 0.39; 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25.00; 50.00 ve 100.00 ppb) 10 farklı doz ile çalışıldı. Sonuçlar Tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 3.** Florfenikol ve florfenikol aminin en düşük tespit (LOD) ve en düşük hesaplama limitleri (LOQ)

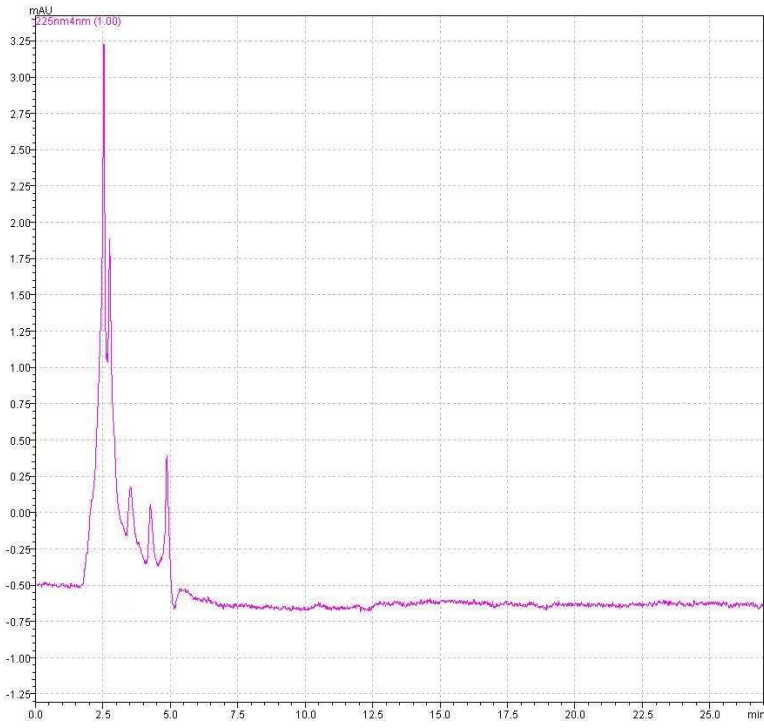
Analit	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Florfenikol	1,94	6,45
Florfenikol amin	0,48	1,58



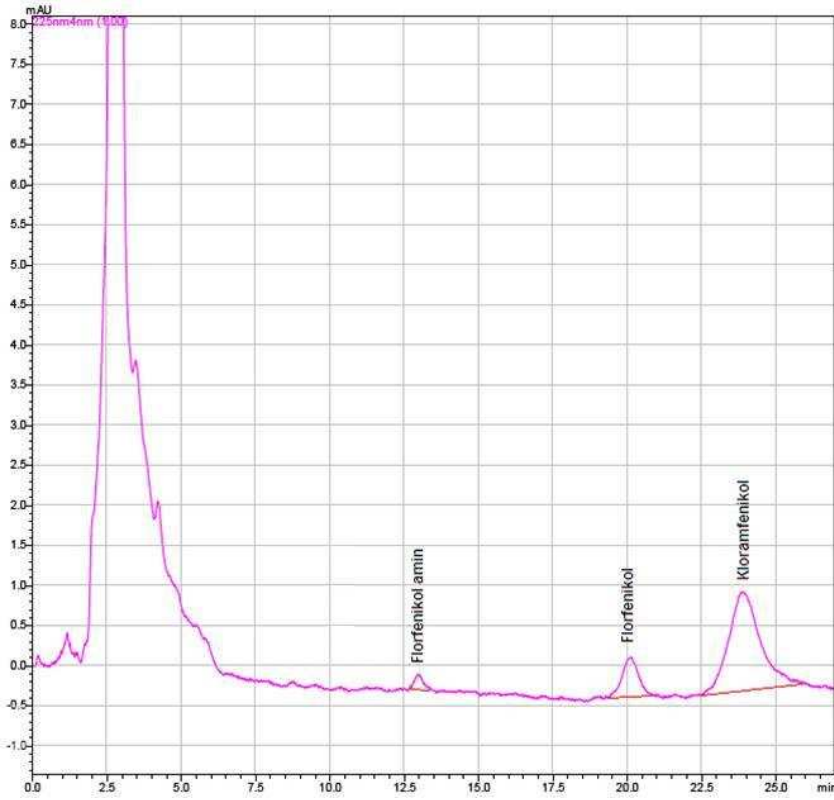
Şekil 2A. Yumurta beyazının kromatogramı



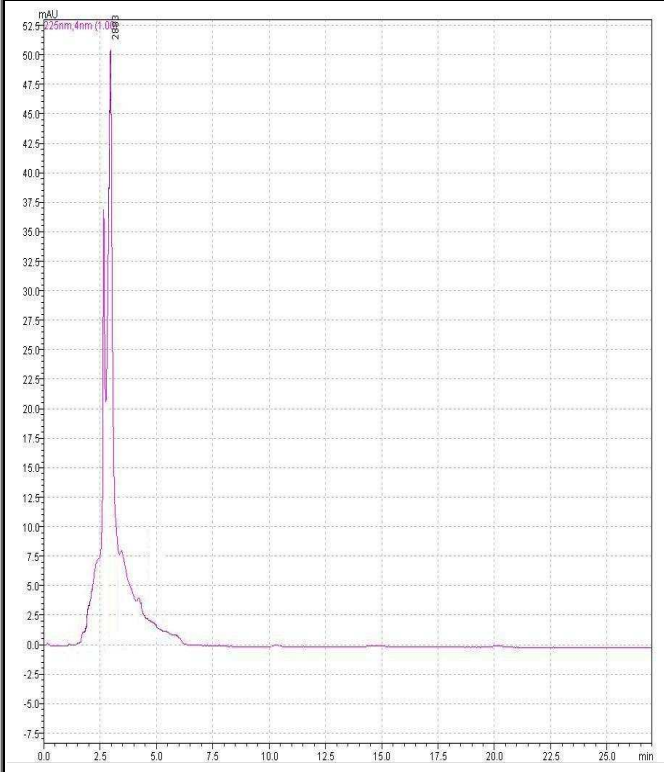
Şekil 2B. Yumurta beyazına her birinden 6'şar ppb florfenikol, florfenikol amin ve kloramfenikol katıldıktan sonra elde edilen kromatogram



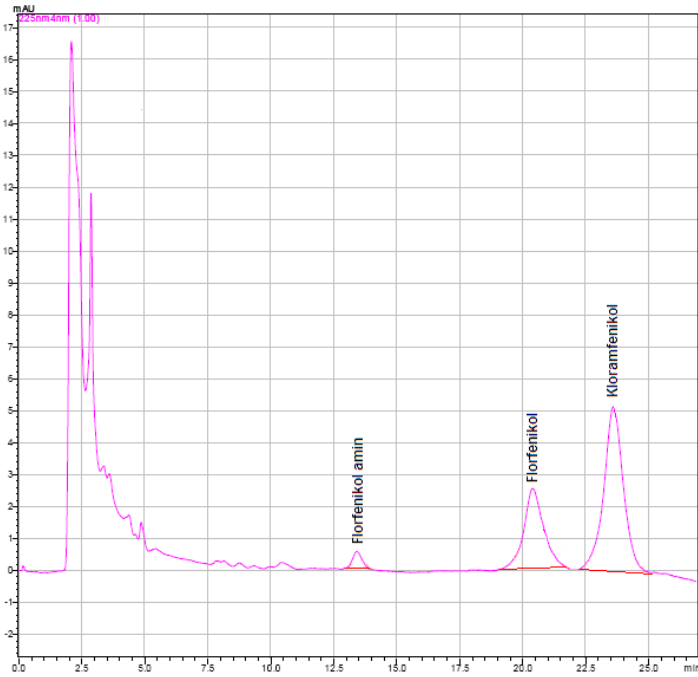
Şekil 3A. Yumurta sarısının kromatogramı



Şekil 3B. Yumurta sarısına her birinden 6'şar ppb florfenikol, florfenikol amin ve kloramfenikol katıldıktan sonra elde edilen kromatogram



Şekil 4A. Homojenize yumurtanın kromatogramı



Şekil 4B. Homojenize yumurtaya her birinden 6'şar ppb florfenikol, florfenikol amin ve kloramfenikol katıldıktan sonra elde edilen kromatogram

### Doğrusallık (Linearity)

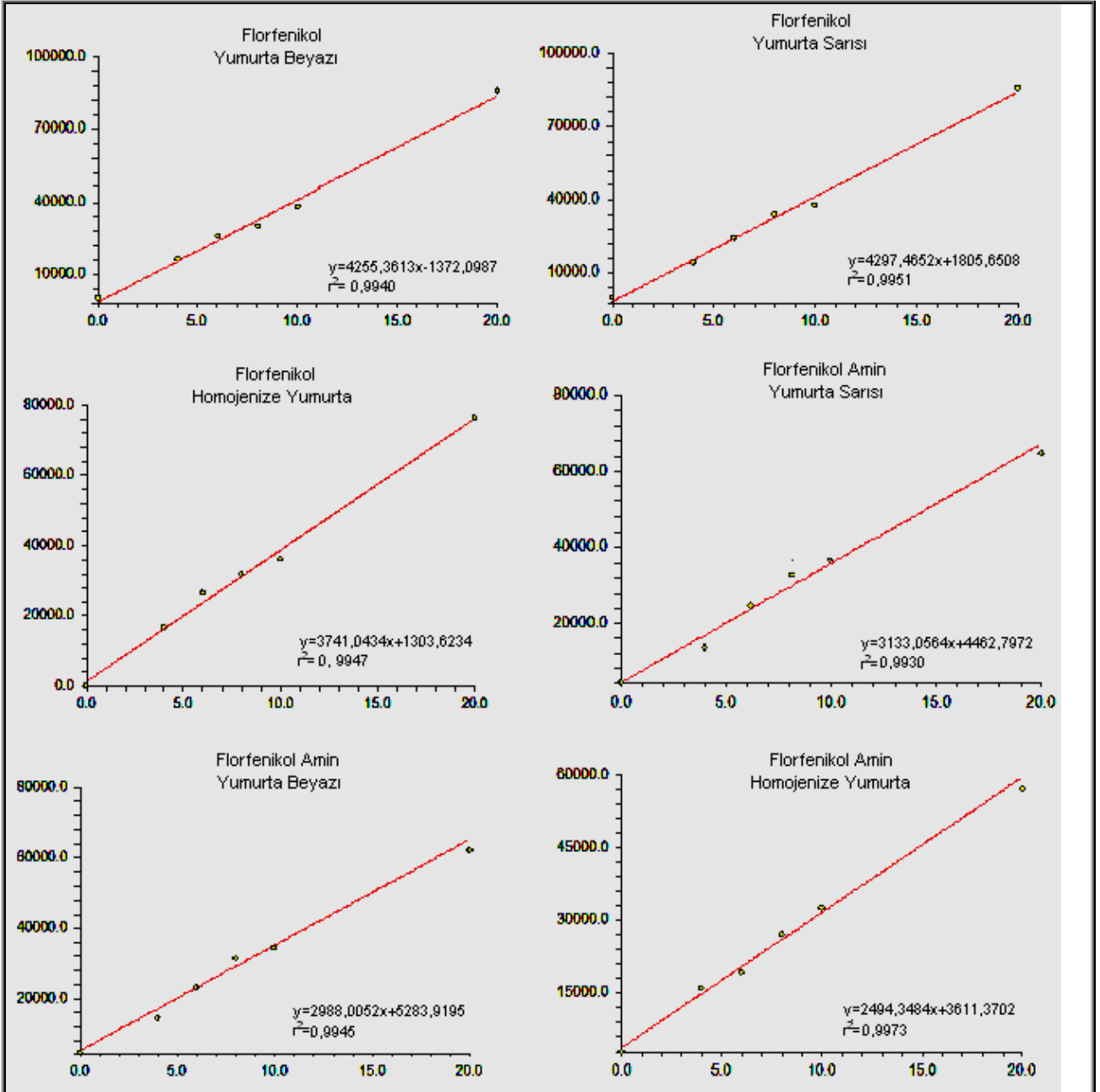
Kalibrasyon eğrileri lineer regresyon metoduna göre yapıldı ( $y=aX+b$ ,  $y$ =analitin pik alanı,  $x$ = analit konsantrasyonu,  $a$ =eğim,  $b$ =kesişim). Florfenikol ve florfenikol aminin çalışma standart çözeltileri 0.19-100 µg/L aralığında 10 farklı konsantrasyonda (aritmetik olarak iki kat artış ile 0.19; 0.39; 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25.00; 50.00 ve 100.00 µg/L) çalışıldı. Bunların her biri HPLC cihazına 3 defa uygulandı. Florfenikol ve florfenikol amin için regresyon eğrileri, belirleme katsayıları ( $r^2$ ), ve kalibrasyon sınırları Tablo 4'te verilmiştir. Aynı işlemler ve konsantrasyonlar her matriks için yumurta sarısı, akı ve homojenize yumurtada da yapılmıştır (Şekil 5 ve Tablo 5) Böylece geliştirilen analitik yöntemin 0.19-20 µg/L konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu kanıtlandı.

**Tablo 4.** Florfenikol ve florfenikol aminin regresyon eğrileri, belirleme katsayıları ( $r^2$ ) ve kalibrasyon aralığı.

Analit	Regresyon Eğrisi	Belirleme Katsayısı ( $r^2$ )	Kalibrasyon aralığı (µg/ml)
Florfenikol	$y= 4357,16x+1082,73$	0,9992	0,195313-25
Florfenikol amin	$y= 4945,32x - 170,76$	0,9977	0,195313-12,5

**Tablo 5.** Yumurta sarısı, beyazı ve homojen yumurtada yüklü konsantrasyonlarda bulunan florfenikol ve florfenikol aminin regresyon eğrisi formülleri ve belirleme katsayıları.

Matriks	Analit	Regresyon Eğrisi	Belirleme Katsayısı ( $r^2$ )
Yumurta Sarısı	Florfenikol	$y= 4297,4652x+1805,6508$	0,9951
	Florfenikol amin	$y= 3133,0564x+4462,7972$	0,9930
Yumurta Beyazı	Florfenikol	$y= 4255,3613x-1372,0987$	0,9940
	Florfenikol amin	$y= 2988,0052x+5283,9195$	0,9946
Homojenize Yumurta	Florfenikol	$y= 3741,0434x+1303,6234$	0,9947
	Florfenikol amin	$y= 2794,3484x+3611,3702$	0,9973



Şekil 5. Yumurta sarısı, beyazı ve homojenize yumurtada yüklü konsantrasyonların florfenikol ve florfenikol amin için regresyon eğrileri

#### *Doğruluk (Accuracy) ve Kesinlik (Precision)*

Yöntemin doğruluk ve kesinliği florfenikol ve florfenikol aminin yumurta sarısı, akı ve homojenize yumurtaya 4, 6, 8, 10 ve 20 ppb konsantrasyonlarda katılıp geri kazanım oranlarının hesaplanmasıyla değerlendirildi. Her bir konsantrasyon 6 defa uygulandı. Yöntemin geri kazanımı örneklerle katılan konsantrasyonların belirlenen konsantrasyonlara oranlanarak hesaplandı. Tablo 5'te görüldüğü gibi 4-20 ppb dozları arasında geri kazanım değerleri yüzde ortalama olarak yüklü yumurta sarısında florfenikol için %75.50-96.96, florfenikol amin için %73.83-94.65; yumurta beyazında florfenikol için %81.31-93.76, florfenikol amin için %80.45-98.80; homojenize yumurtada florfenikol için %78.77-96.05 ve florfenikol amin için %82.68-94.75 arasında değişmektedir. Farklı matrikslerde göreceli standart sapma (relative standart

deviation-RSD, varyasyon katsayısı) yüzde olarak florfenikol için %4.24-11.76 arasında ve florfenikol amin için %4.74-10.94 arasında hesaplandı. Ortalama geri kazanım değerleri ise florfenikol ve florfenikol amin için yumurta sarısı, yumurta beyazı ve homojenize yumurtada sırasıyla %86.57; %86.46; %88.52 ve %87.38; %89.95; %90.91 olarak bulundu.

**Tablo 6.** Doğruluk ve kesinlik değerlendirmesine göre yöntemin performansı.

Matriks	Analit	Yüklü (spike) konsantrasyon (ppb)	Ortalama geri alım (ppb)	Geri kazanım (%)	% Göreceli Standart Sapma (RSD)
Yumurta Sarısı	Florfenikol	4	3,02 ± 0,19	75,50	6,14
		6	4,93 ± 0,39	82,21	7,85
		8	6,65 ± 0,70	83,11	10,51
		10	9,51 ± 0,81	95,09	8,57
		20	19,39 ± 2,05	96,96	10,55
	Florfenikol Amin	4	2,95 ± 0,32	73,83	10,94
		6	5,16 ± 0,46	85,93	8,95
		8	7,29 ± 0,38	91,14	5,19
		10	9,14 ± 0,95	91,35	10,42
		20	18,93 ± 1,82	94,65	9,64
Yumurta Beyazı	Florfenikol	4	3,25 ± 0,38	81,31	11,76
		6	4,96 ± 0,38	82,60	7,63
		8	6,65 ± 0,64	83,06	9,61
		10	9,38 ± 0,48	93,76	5,08
		20	18,32 ± 1,06	91,59	5,77
	Florfenikol Amin	4	3,22 ± 0,18	80,45	5,72
		6	5,34 ± 0,50	88,95	9,41
		8	7,18 ± 0,49	98,80	6,81
		10	8,85 ± 0,75	88,46	8,48
		20	18,62 ± 1,35	93,11	7,26
Homojenize Yumurta	Florfenikol	4	3,15 ± 0,20	78,77	6,40
		6	5,10 ± 0,41	85,03	7,97
		8	7,03 ± 0,65	87,84	9,18
		10	9,49 ± 1,06	94,92	11,19
		20	19,21 ± 0,81	96,05	4,24
	Florfenikol Amin	4	3,31 ± 0,20	82,68	6,12
		6	5,33 ± 0,25	88,90	4,74
		8	7,49 ± 0,54	93,64	7,15
		10	9,47 ± 0,85	94,75	9,02
		20	18,92 ± 1,88	94,60	9,91

### *Tekrarlanabilirlik ve Tekrar Üretilirlik*

Tekrarlanabilirlik çalışması ise yine beş farklı dozda yüklü örneklerle aynı gün içerisinde üç tekrar olarak yapılmıştır. Tekrar üretilebilirlik çalışmaları için ise yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki örneklerin analizi 4 farklı günde yapılmıştır. Bu analizlerin sonuçları Tablo 7’de belirtilmiştir.

**Tablo 7.** Farklı matrikslerde florfenikol ve florfenikol aminin yüklü doz seviyelerinde gün içi ve günler arası % Göreceli Standart Sapma (%RSD) değerleri.

Matriks	Analit	Yüklü konsantrasyon (ppb)	Gün içi - % Göreceli Standart Sapma-RSD	Günler arası - % Göreceli Standart Sapma-RSD
Yumurta Sarısı	Florfenikol	4	5,24	7,85
		6	7,73	10,05
		8	7,81	9,37
		10	5,67	10,78
		20	5,81	9,88
	Florfenikol Amin	4	4,94	5,93
		6	3,65	4,74
		8	4,74	5,97
		10	3,19	4,88
		20	6,68	8,28
Yumurta Beyazı	Florfenikol	4	7,52	8,42
		6	4,99	6,59
		8	5,85	7,60
		10	5,21	6,77
		20	6,25	8,74
	Florfenikol Amin	4	1,99	6,18
		6	7,84	9,40
		8	5,49	7,85
		10	8,12	9,09
		20	6,26	7,96
Homojenize Yumurta	Florfenikol	4	5,58	8,93
		6	4,93	6,91
		8	6,80	8,85
		10	8,98	10,78
		20	4,55	9,10
	Florfenikol Amin	4	1,52	5,05
		6	3,90	9,04
		8	4,53	8,69
		10	3,34	10,43
		20	1,52	4,73

### Florfenikol ve Florfenikol Aminin Yumurta Sarısına Geçiş Miktarı

Florfenikol uygulanan tavukların yumurta sarısı, akı ve tüm (homojenize) yumurtasına geçen florfenikol konsantrasyonu günlere göre sırasıyla Tablo 8, 9 ve 10'da verilmiştir. Buna göre florfenikol hangi yolla verirse verilsin 20 mg/kg dozda verildiğinde, ilaç uygulamasını takiben birinci gün alınan yumurtalarda (yumurta sarısı, akı ve homojenize yumurtada) en yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiş daha sonra gittikçe azalarak 1, 2 ve 3. grupta 7. günden sonra, 4. grupta 8. günden sonra, 5. grupta ise 9. günden sonra belirlenme limitinin altında kalmıştır.

**Tablo 8.** Florfenikol uygulanan tavukların ilaç uygulaması kesildikten sonra yumurta sarısına geçen florfenikol miktarı (ppb)

Gün	Gruplar (n=8)				
	1 Ağızdan 1 kez	2 Kas içi	3 Deri altı	4 Ağızdan 3 gün	5 Ağızdan 5 gün
1	278.92±11.29	312.17±34.59	328.66±24.55	297.89±24.45	322.03±30.17
2	200.64±12.34	245.44±21.67	226.74±21.45	269.81±21.31	297.89±24.45
3	150.08±9.99	187.75±11.12	185.75±12.99	164.58±14.67	248.55±21.36
4	76.65±6.33	80.09±7.09	88.45±11.01	100.06±12.33	173.80±14.07
5	23.77±1.47	32.06±4.66	42.23±5.81	43.31±3.05	114.58±9.14
6	10.04±1.13	11.99±2.45	16.97±3.40	12.34±1.09	64.02±6.53
7	6.06±0.87	5.02±1.11	6.78±1.02	7.71±0.94	27.01±1.91
8	<LOD	<LOD	<LOD	2.65±0.06	13.46±0.94
9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6.88±0.71
10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

**Tablo 9.** Florfenikol uygulanan tavukların ilaç uygulaması kesildikten sonra yumurta beyazına geçen florfenikol miktarı (ppb)

Gün	Gruplar (n=8)				
	1 Ağızdan 1 kez	2 Kas içi	3 Deri altı	4 Ağızdan 3 gün	5 Ağızdan 5 gün
1	223.46±12.31	283.65±13.49	301.55±42.66	288.78±23.01	295.61±24.59
2	178.75±13.42	189.67±12.10	204.89±22.05	254.39±20.02	290.03±21.16
3	109.65±10.75	88.67±9.08	110.25±11.23	175.62±11.21	244.06±16.19
4	43.46±4.95	56.71±4.77	68.44±7.88	98.76±9.88	160.25±11.04
5	11.32±3.07	9.79±2.22	18.93±3.40	46.77±4.71	68.77±7.33
6	4.79±1.07	5.99±0.88	6.88±1.21	9.54±1.15	41.69±3.17
7	<LOD	<LOD	2.23±0.32	4.44±0.72	17.09±2.12
8	<LOD	<LOD	<LOD	2.87±0.23	8.82±1.15
9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.86±0.77
10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

**Tablo 10.** Florfenikol uygulanan tavukların ilaç uygulaması kesildikten sonra yumurtasına (homojenize yumurta) geçen florfenikol miktarı (ppb)

Gün	Gruplar (n=8)				
	1 Ağızdan 1 kez	2 Kas içi	3 Deri altı	4 Ağızdan 3 gün	5 Ağızdan 5 gün
1	264.19±22.97	302.43±21.23	316.78±12.77	290.71±24.22	301.68±28.34
2	189.87±10.99	201.33±12.67	213.55±20.98	257.42±20.91	288.45±19.90
3	134.52±12.31	142.99±15.76	156.23±18.79	154.33±14.44	179.31±11.07
4	56.91±6.09	75.55±6.01	70.03±4.87	99.07±11.28	102.27±9.70
5	18.78±3.89	12.24±2.41	33.46±5.02	45.55±5.90	65.43±7.77
6	8.21±0.99	4.77±0.39	10.92±2.47	11.28±2.01	36.71±4.28
7	5.15±0.34	<LOD	4.67±1.00	5.39±0.83	12.82±1.96
8	<LOD	<LOD	<LOD	2.52±0.19	5.35±0.79
9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3.50±0.76
10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Florfenikol uygulanan tavukların yumurta sarısı, akı ve tüm (homojenize) yumurtasına geçen florfenikol amin konsantrasyonu günlere göre sırasıyla Tablo 11, 12 ve 13'te verilmiştir. Buna göre florfenikol tek dozda ağızdan, kas içi ve deri altı yolla 20 mg/kg dozda verildiğinde, ilaç uygulamasını takiben ikinci gün alınan yumurtalarda (yumurta sarısı, akı ve homojenize yumurtada) en yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiş daha sonra gittikçe azalarak 7. günden sonra belirlenme limitinin altında kalmıştır. Florfenikol aminin ikinci gün toplanan yumurtalarda en yüksek konsantrasyonda bulunmasının nedeni metabolize olması için geçen zamanla açıklanabilir. Florfenikol amin, tek dozda ilaç verilen tavuklardan farklı olarak, ağızdan 3 veya 5 gün süreyle ilaç uygulanan tavukların ilacın kesilmesini takiben 3. gün toplanan yumurtalarında en yüksek konsantrasyonlarda ölçülmüştür. Bu durum ilacın üst üste verilmesini nedeniyle olabilir. Florfenikol amin de florfenikol gibi ilaç uygulaması kesildikten sonra 4. ve 5. grup hariç tüm gruplarda 7. günden sonra toplanan yumurtalarda ölçülebilir miktarın altına düşmüştür. Yalnızca ağızdan 3 ve 5 gün boyunca ilaç uygulanan tavuklarda, ilacın kesilmesini takiben sırasıyla 8. ve 9. gün ölçülebilir miktarda florfenikol amin tespit edilmiş, daha sonra ölçülebilir düzeyin altında kalmıştır. Florfenikol amin 7. Gün yalnızca deri altı yolla ilaç verilen tavukların (Grup 3) yumurta sarısında ve ağızdan bir kez ilaç verilen tavukların (Grup 1) yumurta beyazında ölçülebilir miktarın altında kalmış, diğer grupların hepsinde tespit edilmiştir. Burada da florfenikol kalıntısında olduğu gibi ilaç hangi yolla verilirse verilsin florfenikol aminin yumurtayla atılma süresi tüm gruplarda (4. ve 5. grup hariç) aynı olmuştur. Yalnız ağızdan 4 ve 5 gün süreyle ilaç uygulanan tavuklarda florfenikol aminin arınma süresi sırasıyla 8 ve 9 gün olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 11.** Florfenikol uygulanan tavukların ilaç uygulaması kesildikten sonra yumurta sarısına geçen florfenikol amin miktarı (ppb)

Gün	Gruplar (n=8)				
	1 Ağızdan 1 kez	2 Kas içi	3 Deri altı	4 Ağızdan 3 gün	5 Ağızdan 5 gün
1	102.35±9.80	108.44±7.63	106.52±11.29	110.37±12.79	118.59±10.48
2	276.55±21.30	288.02±18.77	278.91±23.77	175.68±14.13	192.38±13.45
3	110.78±9.97	106.56±13.44	109.92±9.89	281.02±22.27	245.67±24.50
4	36.88±3.19	52.19±3.77	53.21±4.32	132.40±10.35	144.85±16.89
5	8.85±2.65	10.75±2.01	9.01±2.14	79.66±6.40	87.30±6.09
6	3.32±0.61	4.07±1.79	3.89±0.94	34.98±2.11	46.02±2.75
7	1.64±0.11	1.82±0.07	<LOD	8.77±1.01	20.99±1.25
8	<LOD	<LOD	<LOD	4.37±0.86	12.57±1.04
9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5.01±0.80
10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

**Tablo 12.** Florfenikol uygulanan tavukların ilaç uygulaması kesildikten sonra yumurta beyazına geçen florfenikol amin miktarı (ppb)

Gün	Gruplar (n=8)				
	1 Ağızdan 1 kez	2 Kas içi	3 Deri altı	4 Ağızdan 3 gün	5 Ağızdan 5 gün
1	73.87±6.66	82.91±9.70	86.73±7.99	105.67±14.78	115.16±10.81
2	238.41±20.09	243.08±23.11	249.91±20.33	161.29±15.07	185.32±12.36
3	103.76±11.90	123.88±13.48	132.09±9.79	242.67±23.51	240.17±17.52
4	33.98±4.52	42.19±3.76	49.51±4.00	121.33±11.19	139.90±11.73
5	9.71±1.55	12.87±1.02	13.41±1.90	65.40±5.82	89.74±7.34
6	1.44±0.32	3.29±0.86	4.38±0.99	29.02±2.24	44.81±6.49
7	<LOD	1.48±0.07	1.34±0.23	7.65±0.98	16.44±2.15
8	<LOD	<LOD	<LOD	3.01±0.46	9.83±0.96
9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.33±0.62
10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

**Tablo 13.** Florfenikol uygulanan tavukların ilaç uygulaması kesildikten sonra yumurtasına (homojenize yumurta) geçen florfenikol amin miktarı (ppb)

Gün	Gruplar				
	1 Ağızdan 1 kez	2 Kas içi	3 Deri altı	4 Ağızdan 3 gün	5 Ağızdan 5 gün
1	96.92±8.79	102.80±14.57	99.89±8.90	108.81±12.24	116.21±11.24
2	265.17±16.34	246.97±24.55	252.31±25.16	169.37±13.65	190.75±10.60
3	110.01±9.76	86.79±8.08	124.21±17.87	270.08±20.46	244.36±25.71
4	57.91±6.78	47.89±4.71	51.10±3.54	125.59±11.21	141.88±13.05
5	10.99±1.23	8.79±0.99	11.56±2.33	68.02±3.08	92.39±7.63
6	4.73±1.25	3.77±0.97	4.02±1.01	32.33±1.30	45.04±2.27
7	1.02±0.04	1.65±0.08	1.23±0.09	7.78±0.99	18.59±1.33
8	<LOD	<LOD	<LOD	4.05±0.43	10.65±0.84
9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3.42±0.42
10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Bu değerlere göre tek dozda ilaç uygulanan gruplarda yumurtaya geçen florfenikol ve florfenikol amin miktarının verilen toplam florfenikol miktarına bölünmesiyle ilacın yumurtayla atılma oranı da belirlenmiştir. Florfenikol ağızdan, kas içi veya deri altı yolla verildiğinde, yaklaşık %0.1 oranında florfenikol ve %0.08 oranında florfenikol amin şeklinde yumurtayla atılmış ve bu miktarların yaklaşık %57'si yumurta sarısında belirlenmiştir. Böylece hangi yoldan verilirse verilsin yumurtaya geçme oranının değişmediği görülmüştür.

### Muhafaza İşlemlerinin Kalıntılara Etkileri

Oda (15 ile 20 °C arasında) ve buzdolabı (+4 °C) ısılarının florfenikol ve florfenikol amin kalıntılara yönelik etkileri 0., 4., 7., 14., 21. ve 28. günlerde araştırıldı. Buna göre günler arası her iki maddenin miktar olarak azalması anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Oda ısısında muhafaza edilen yumurtalarda florfenikol ve florfenikol aminin buzdolabında muhafaza edilenlere göre tüm günlerde daha düşük miktarda kalıntı içerdiği tespit edildi; ancak bu farklılık sadece florfenikol için 7., 14. ve 21. günlerde anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ) Farklı muhafaza koşullarında yumurtalardaki florfenikol ve florfenikol amin düzeyleri ppb düzeyinde Tablo 14'te gösterilmiştir.

**Tablo 14.** Yumurtayı oda ısısında (15 ile 20 °C arasında) ve buzdolabında (+4 °C) saklamının florfenikol ve florfenikol amin kalıntılara etkisi (ppb).

Gün (n=4)	Florfenikol		Florfenikol amin	
	Oda ısı (15-20 °C)	Buzdolabı(+4 °C)	Oda ısı(15-20 °C)	Buzdolabı(+4 °C)
0	290.65±11.02 <sup>a</sup>	290.65±11.02 <sup>a</sup>	91.79±6.77 <sup>a</sup>	91.79±6.77 <sup>a</sup>
4	151.24±10.69 <sup>b</sup>	167.43±8.18 <sup>b</sup>	58.26±5.98 <sup>b</sup>	58.61±5.85 <sup>b</sup>
7	79.65±9.43 <sup>cx</sup>	105.10±4.25 <sup>cy</sup>	28.95±5.03 <sup>c</sup>	35.40±2.33 <sup>c</sup>
14	68.23±8.74 <sup>dx</sup>	87.84±5.01 <sup>dy</sup>	20.52±3.92 <sup>d</sup>	24.37±1.20 <sup>d</sup>
21	29.43±4.91 <sup>ex</sup>	61.82±2.11 <sup>ey</sup>	10.42±1.54 <sup>e</sup>	8.54±1.04 <sup>e</sup>
28	18.57±3.48 <sup>f</sup>	22.14±0.03 <sup>f</sup>	6.74±0.79 <sup>f</sup>	7.06±1.21 <sup>f</sup>

abcdef: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $p<0.05$ )

xy: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $p<0.05$ )

### Pişirme İşlemlerinin Kalıntılara Etkileri

Farklı pişirme şekillerinde yumurtadaki florfenikol ve florfenikol amin kalıntı miktarı değerlendirildi. Buna göre çığ ile haşlama ( 1 ve 5 dk) ve tavada kızartılan yumurtalar arasında her iki madde bakımından farklılık anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Böylece gerek florfenikol ve gerekse ana metaboliti olan florfenkol aminin ısıya oldukça duyarlı oldukları ve ısı uygulamasıyla dekompoze olabilecekleri ortaya konuldu (Tablo 15).

**Tablo 15.** Çiğ, tavada kızartma ve haşlamanın (1 ve 5 dk) florfenikol ve florfenikol amin kalıntılarına etkisi (ppb).

Kalıntı (n=8)	Çiğ	Kızartma	Haşlama (1 dk)	Haşlama (5 dk)
Florfenikol	265.45±13.67 <sup>a</sup>	56.51±9.68 <sup>b</sup>	35.67±4.57 <sup>c</sup>	5.68±1.17 <sup>d</sup>
Florfenikol amin	110.31±12.73 <sup>a</sup>	19.77±4.71 <sup>b</sup>	10.20±1.72 <sup>c</sup>	4.57±0.92 <sup>d</sup>

abcd: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0.05)

## V. Sonuç ve Öneriler

Projede öncelikle yumurtadan florfenikol ve onun ana metaboliti olan florfenikol aminin, internal standart (kloramfenikol) varlığında fosfat buffer çözeltisiyle (pH=7) ekstraksiyonu, saflaştırılması ve PDA dedektör ve C18 kolon kullanılarak HPLC tekniğiyle analizi valide edilmiştir. Buna göre florfenikol, florfenikol amin ve internal standart olan kloramfenikolün alıkonulma zamanları yüklü örneklerde sırasıyla 20.98; 13.37 ve 23.28 dakika, LOD ve LOQ değerleri ppb olarak florfenikol için sırasıyla 1.94 ve 6.45, florfenikol amin için 0.48 ve 1.58 olarak bulunmuştur. Ortalama geri kazanım değerleri florfenikol ve florfenikol amin için yumurta sarısı, yumurta beyazı ve homojenize yumurtada sırasıyla 86.57; 86.46; 88.52 ve 87.38; 89.95; 90.91 olarak tespit edildi. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik yönünden göreceli standart sapma (RSD) değerleri de kullanılan yöntemin yumurtadan florfenikol ve florfenikol aminin analizine uygun olacağı sonucuna varıldı.

Florfenikol ve florfenikol aminin yumurtaya geçiş konsantrasyonlarını belirlemek için yapılan denemelerden 20 mg/kg dozda ilacın tavuklara ağızdan, kas içi veya deri altı yolla uygulamasını takiben birinci gün alınan yumurtalarda (yumurta sarısı, akı ve homojenize yumurtada) en yüksek florfenikol konsantrasyonu tespit edilmiş daha sonra gittikçe azalarak 7. günden sonra belirlenme limitinin altında kalmıştır. 3 ve 5 gün süreyle ağızdan ilaç uygulanan tavukların yumurtalarında ise sırasıyla 8 ve 9 gün sonra kalıntıya rastlanmamıştır. Florfenikol aminin en yüksek konsantrasyonları, tek dozda ilaç uygulanan tavukların yumurtalarında (yumurta sarısı, akı ve homojenize yumurta) ikinci gün, 3 (Grup 4) veya 5 gün (Grup 5) ağızdan ilaç uygulanan tavuklarda ise ilacın kesilmesini takiben 3. gün toplanan yumurtalarında tespit edilmiştir. Böylece 20 mg/kg dozda bir defada ağızdan, kas içi veya deri altı yolla florfenikol uygulanan tavukların yumurtalarındaki ilaç kalıntısının tamamen arınma süresi ilacın kesilmesini takiben 7 gün, 3 veya 5 gün süreyle uygulandığında ise bu sürenin 8 gün olduğu tespit edildi.

Florfenikolün yumurtlayan tavuklara ağızdan veya parenteral yollarla uygulandığında ilk günden itibaren elde edilen yumurtalara florfenikol ve florfenikol amin olarak geçtiğinin yanı sıra hangi yoldan uygulanırsa uygulansın (ağızdan, deri altı veya kas içi) uygulanan toplam dozun yaklaşık %0.1 oranında florfenikol ve %0.08 oranında florfenikol amin olarak yumurtayla atılabileceği ve bu miktarların yaklaşık %57'sinin yumurta sarısında belirlendiği de ortaya konulmuştur.

Ayrıca değişik ortam ısılarında yumurtaları muhafaza etmenin yumurtalarda bulunan kalıntılara yönelik etkileri araştırıldığında, gerek oda ısısında (15-20°C) ve gerekse buzdolabı (+4 °C) ısılarında bekletilen yumurtalarda bulunan florfenikol ve florfenikol amin kalıntılarında anlamlı düzeylerde düşme görülmesine rağmen 28. güne kadar hala kalıntı bulunduğu görülmüştür. Aynı şekilde yumurtaya uygulanan kızartma ve haşlama (1 ve 5 dk) işlemleriyle yumurtada bulunan florfenikol ve florfenikol amin kalıntılarının miktarında anlamlı düzeylerde azalma görülmesine rağmen bu işlemlerin de kalıntıları tamamen dekompoze edemediği ortaya konulmuştur.

Bilindiği gibi günümüzde hastalıklardan korunma ve sağaltımda ilaç kullanımı kaçınılmaz

olduğuna göre özellikle kalıntı kontrol programlarının uygulanmadığı ülkelerde tüketicilerin konumundaki insanlar ürünlerini tketicilerken daima ilaç kalıntılı ürünleri tüketiciler kaygısıyla psikolojik bir rahatsızlık ve güvensizlik içerisinde bulunurlar. Bu yönüyle araştırma, ilaç kalıntılı ürün bulunsun bile farklı değerlendirme koşullarıyla tüketicilerde söz konusu ilaç kalıntısının bir zarar vermeyeceğinin güvencesini vermekle öncelikle tüketiciler; ekonomik güvence verme ve halk sağlığı açısından güvenilir ürünler sunabilme rahatlığı içerisinde olma bakımından ilacı zorunlu olarak kullanan ve istem dışı olarak bekletme süresine uymadan yumurtaları tüketiciler sunma durumunda kalan yetiştiriciler ve ilacı satışa sunan firmaya hitap etmektedir. Bu çerçevede değerlendirildiğinde yumurta tavuklarında kullanılma potansiyeli olan florfenikolün yumurtalara geçtiği ve yumurtaların değişik ortam ısıları ve srelerde muhafaza edilmesi ve değişik pişirme işlemlerine maruz bırakıldığlarında (kızartma, haşlama) kalıntı düzeylerinde anlamlı düzeylerde düşme olsa bile etkinliğini koruduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak florfenikolün yumurtlayan tavuklarda kullanılmaması veya kullanılmak zorunda kalındığında ilacın yumurtadan tamamen arınma süresine uyulması (ağızdan 3 veya 5 gün kullanıldığında kalıntı arınma süresi sırasıyla en az 7 veya 8 gün) ve bu sürede florfenikol kalıntısı içeren yumurtanın insan tüketicilerine sunulmaması önerilebilir.

### **Teşekkür**

Projenin gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü görevlilerine, ilaç ve etken maddeleri karşılayan Medicavet ve İntervet İlaç firmalarına, tavuk ve yemleri karşılayan ve kümes ortamını hazırlayan Bil-Yem firmasına teşekkür ederiz.

### **VI. Kaynaklar**

1. **Adams, P.E., Varma, K.J., Powers, T.E. and Lamendola, J.F.** (1987). Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in male veal calves given repeated doses. *Am. J. Vet. Res.*, 48, 1725–1732.
2. **Affi, N.A. and El-Sooud, K.A.** (1997). Tissue concentration and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.*, 38, 425–428.
3. **Anadn, A., Martınez, M.A., Martınez, M., Rıos, A., Caballero, V., Ares, I. and Martınez-Larraņaga, M.R.** (2008). Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol amine in chickens. *J. Agric. Food. Chem.*, 56, 11049-11056.
4. **Baydan, E., Akkaya, R., Traş, B., Bilgili, A., Tanyıldızı, S., Filazi, A., Yarsan, E. and zdemir, M.** (2002). Etlik piliçlerde kullanılan çeşitli veteriner ilaçların kalıntıları üzerine pişirme, dondurma ve benzeri işlemlerin etkilerinin araştırılması: 1. Sülfonamid grubu bazı antibakteriyellerin incelenmesi, 2. Kinolon grubu bazı antibakteriyellerin incelenmesi. *Etlik Veteriner Mikrob. Derg.*, 13, 56-76.
5. **Baydan, E., Filazi, A., Kum, C. ve Sekkin, S.** (2000a). Etlik piliçlerde pişirme ve dondurma işlemlerinin ilaç kalıntıları üzerine etkileri: 1. Enrofloksasin zerine pişirme ve farklı srelerde soğukta depolamanın etkisi. *Vet. Hek. Der. Derg.*, 71, 19-22.
6. **Baydan, E., Filazi, A., Kum, C. ve Sekkin, S.** (2000b). Etlik piliçlerde pişirme ve dondurma işlemlerinin ilaç kalıntıları üzerine etkileri: 2. Danofloksasin zerine pişirme ve farklı srelerde soğukta depolamanın etkisi. *Vet. Hek. Der. Derg.*, 71, 33-36.
7. **Botsoglou, N.A. and Fletouris, D.J.** (2001). *Drug Residues in Food.* Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
8. **Bretzlaff, K.N., Neff-Davis, C.A., Ott, R.S., Koritz, G.D., Gustafsson, B.K. and Davis, L.E.** (1987). Florfenicol in non-lactating dairy cows: pharmacokinetics, binding to plasma proteins and effects on phagocytosis by blood neutrophils. *J. Vet. Pharmacol.*

- Ther., 10, 233–240.
9. **Cannon, M., Harford, S. and Davies JA.** (1990). A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, tiamphenicol and some fluorinated derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26, 307-317.
  10. **Chang, S.K., Davis, J.L., Cheng, C.N., Shien, R.H., Hsieh, M.K., Koh, B.W. and Chou, C.C.** (2010). Pharmacokinetics and tissue depletion of florfenicol in Leghorn and Taiwan Native chickens. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 33, 471-479.
  11. **Christopher, L., Wrzesinski, L., Crouch, S. and Endris, R.** (2003). Determination of florfenicol amine in channel catfish muscle by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 86, 515–520.
  12. **Commission Regulation (EC) No.1181/2002 (2002).** Amending Annex I of Council Regulation (EEC) No.2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*. 01.07.2002.
  13. **Donoghue, D.J.** (2003). Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? *Poult.Sci.*, 82, 618–621.
  14. **Cuerpo, L. and Livingston, R.C.** (1994). Spectinomycin. In *Residues of some veterinary drugs in animals and foods*. Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives.
  15. **Donoghue, D.J., Hairston, H., Henderson, M., McDonald, M., Gaines, S. and Donoghue, A.M.** (1997). Modeling drug residue uptake by eggs: yolks contain ampicillin residues even after drug withdrawal and nondetectability in the plasma. *Poult. Sci.*, 76, 458–462.
  16. **El-Aty, A.M., Goudah, A., El-Sooud, K.A., El-Zorba, H.Y., Shimoda, M. and Zhou, H.H.** (2004). Pharmacokinetics and bioavailability of florfenicol following intravenous, intramuscular and oral administrations in rabbits. *Vet. Res. Commun.*, 28, 515–524.
  17. **EMA (1999).** Committee for veterinary medicinal products: Florfenicol (Extension to chicken). Summary Report (3). EMA/MRL/589/99-Final. [http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500014277.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014277.pdf), Access: 10.09.2011.
  18. **Filazi, A., Sireli, U.T. and Cadirci, O.** (2005), Residues of gentamicin in eggs following medication of laying hens. *Br. Poult. Sci.*, 46, 580-583.
  19. **Franje, C.A., Chang, S.K., Shyu, C.L., Davis, J.L., Lee, Y.W., Lee, R.J., Chang, C.C. and Chou, C.C.** (2010). Differential heat stability of amphenicols characterized by structural degradation, mass spectrometry and antimicrobial activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 53, 869-877.
  20. **Giorgi, M., Romani, M., Bagliacca, M. and Mengozzi, G.** (2000). Determination of thiamphenicol residues in albumin and yolk of hen eggs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 23, 397–399.
  21. **Goetting, V., Lee, K.A. and Tell, L.A.** (2011). Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 34, 521-556.
  22. **Graham, R., Palmer, D., Pratt, B.C. and Hart, C.A.** (1988). In vitro activity of florfenicol. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 7,691-694
  23. **Gustafson, R.H.** (1991). Symposium: antibiotic residues in meat and milk. Use of antibiotics in livestock and human health concerns. *J. Dairy Sci.*, 74, 1428-1432.
  24. **Hassani, M., Lazaro, R., Perez, C., Condon, S. and Pagan, R.** (2008). Thermostability of oxytetracycline, tetracyclines, and doxycycline at ultrahigh temperatures. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2676–2680.

25. **Inglis, J.M. and Katz, S.E.** (1978). Determination of streptomycin residues in eggs and stability of residues after cooking. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, 61, 1098-1102.
26. **Ismail, M. and El-Kattan, Y.A.** (2009). Comparative pharmacokinetics of florfenicol in the chicken, pigeon and quail. *Br. Poult. Sci.*, 50, 144–149.
27. **Jiang, H., Zeng, Z.L., Chen, Z.L., Liu, J.J. and Fung, K.F.** (2006). Pharmacokinetics of florfenicol in pigs following intravenous, intramuscular or oral administration and the effects of feed intake on oral dosing. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 29, 153–156.
28. **Jianzhong, S., Xiubo, L., Haiyang, J. and Walter, H.H.** (2004). Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in healthy sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 27, 163–168.
29. **Kan, C.A. and Petz, M.** (2000). Residues of Veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 6397-6403.
30. **Katz, S.E. and Levine, P.R.** (1978). Determination of neomycin residues in eggs and stability of residues after cooking. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, 61, 1103-1106.
31. **Kaya, S.** (2000). *Kemoterapötikler*. İçinde: Veteriner Uygulamalı Farmakoloji (Eds.S. Kaya, İ. Pirinçci, A. Bilgili) Cilt2, Baskı2. Medisan Yayınevi. Seri 42, Ankara.
32. **Kaya, S. ve Şahal, M.** (1989). Besinlerimizdeki ilaç kalıntıları, bunlara ilişkin tolerans düzeyleri, ilaç verilmiş hayvanlarda uyulması gereken kesim öncesi bekletme veya sütün kullanılmama süreleri. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 36, 390-403.
33. **Kaya, S., Yavuz, H., Akar, F., Liman, B.C. ve Filazi, A** (1992). Mezbahadan sağlanan sığır et, karaciğer ve böbrek örneklerinde antibiyotik kalıntıları. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 39, 13-29.
34. **Kitagawa, T., Gotoh, Y., Uchihara, K., Kohri, Y., Kinoue, T., Fujiwara, K. and Ohtani, W.** (1988). Sensitive enzyme-immunoassay of cephalixin residues in milk, hen tissues, and eggs. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 915–920.
35. **Kitts, D.D., Yu, C.W., Burt, R.G. and McErlane, K.** (1992). Oxytetracycline degradation in thermally processed. *J. Agric. Food Chem.*, 140, 1977–1981.
36. **Li, J. , Ding, S., Zhang, S., Li, C., Li, X., Liu, Z., Liu, J. and Shen, J.** (2006). Residue depletion of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in Swine tissues after intramuscular administration. *J. Agric. Food Chem.*, 54:9614-9619.
37. **Lobell, R.D., Varma, K.J., Johnson, J.C., Sams, R.A., Gerken, D.F. and Ashcraft, S.M.** (1994). Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 17, 253–258.
38. **Norcross, M.A. and Brown, J.L.** (1991). Food safety and inspection service initiatives for tissue residue reduction in meat and poultry. *J. Am. Vet. Med.Assoc.*, 198, 819-824.
39. **Norcross, M.A. and Post, A.R.** (1990). New food safety initiatives in the food safety and inspection service, U.S. department of agriculture. *J. Anim. Sci.*, 68, 863-869.
40. **Nouws, J.F.M.** (1981). Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 32, 92-140.
41. **Nouws, J.F.M. and Ziv, G.** (1976). The effect of storage at 4°C on antibiotic residues in kidney and meat tissues of dairy cows. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 101, 1145
42. **O'brien, J.J., Campbell, N. and Conaghan, T.** (1980). Antibiotic residues in meat: cooking and cold storage effects. *Vet. Rec.*, 106, 365
43. **Paige, J.C., Tollefson, L. and Miller, M.** (1997). Public health impact on drug residues in animal tissues. *Vet. Human Toxicol.*, 39, 162-169.
44. **Papapanagiotou, E.P., Fletouris, D.J and Psomas, E.I.** (2005). Effect of various heat treatments and cold storage on sulphamethazine residues stability in incurred piglet muscle and cow milk samples. *Anal. Chim. Acta*, 529, 305–309.
45. **Romvary, A., Kovacsics, L.A. and Ferenc, S.** (1991). Apramycin drug residues in eggs. *Hungar Vet. J.*, 46, 611–614.

46. **Rose, M.D., Farrington, W.H.H. and Shearer, G. (1995).** The effect of cooking on veterinary drug residues in food. III: Sulphamethazine (sulphadimidine). *Food Addit. Contam.*, 12, 739-750.
47. **Rose, M.D., Bygrave, J., Farrington, W.H.H. and Shearer, G. (1996).** The effect of cooking on veterinary drug residues in food. 4. Oxytetracycline. *Food Addit. Contam.*, 13, 275-286.
48. **Roudaut, B. (1989).** Residues of aminoglycosides antibiotics in eggs after medication of laying hens. *Br. Poult. Sci.*, 30, 265-271.
49. **Roudaut, B., Moretain, J.P. and Boisseau, J. (1987).** Residues of ampicillin in eggs after oral and parenteral administration. *Recl. Med. Vet.*, 163, 43-47.
50. **Sams, R.A. (1995).** Florfenicol: Chemistry and metabolism of a novel broad spectrum antibiotic. *Tierarzt. Umsch.*, 50, 703-707.
51. **Shen, J., Wu, X., Hu, D. and Jiang, H. (2002).** Pharmacokinetics of florfenicol in healthy and *Escherichia coli*-infected broiler chickens. *Res. Vet. Sci.*, 73, 137-140.
52. **Shen, J., Hu, D., Wu, X. and Coats, J.R. (2003).** Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 26, 337-341.
53. **Sisodia, C.S. and Dunlop, R.H. (1972).** Chloramphenicol residue in eggs. *Can. Vet. J.*, 13, 279-282.
54. **Samouris, G., Nathanael, B., Tsoukalipapadopoulou, H. and Papadimitriou, N. (1993).** Determination of chloramphenicol residues in eggs by highperformance liquid-chromatography (HPLC). *Vet. Hum. Toxicol.*, 35, 406-409.
55. **Samouris, G., Tsoukali-Papadopoulou, H., Nathanael, B. and Mirtsou-Fidani, V. (1998).** Chloramphenicol residues in albumen and yolk of hen's eggs after experimental administration. *Archiv Geflugelkunde*, 62, 83-85.
56. **Schwarzer, C. and Dorn, P. (1987).** Chloramphenicol residues in egg yolk after treatment of young and adult laying chickens. *Tierarzt. Umsch.*, 42, 897-902.
57. **Şanlı, Y. (1999),** Veteriner Klinik Farmakoloji ve İlaçla Sağaltım İlkeleri, Özkan Matbaacılık, s.719-872, Ankara.
58. **Şireli, U.T., Filazi, A. and Cadirci, O. (2006).** Effect of cooking and storage times on gentamicin residues in eggs. *Ital. J. Food. Sci.*, 18, 441-446.
59. **Traub, W.H. and Leonhard, B. (1995).** Heat stability of the antimicrobial activity of sixty-two antibacterial agents. *J. Antimicrob. Chemother.*, 35, 149-154.
60. **Türk Gıda Kodeksi Tebliğ No.2007/17 (2007).** Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ. 09.03.2007 tarih ve 26457 sayılı Resmi Gazete.
61. **Varma, K.J., Adams, P.E., Powers, J.D. and Lamendola, J.F. (1986).** Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 9, 412-425.
62. **Xie, K., Jia, L., Yao, Y., Xu, D., Chen, S., Xie, X., Pei, Y., Bao, W., Dai, G., Wang, J and Liu, Z. (2011).** Simultaneous determination of tiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Analyt Technol. Biomed Life Sci.*, 879, 2351-2354.
63. **Yoshida, M., Kubota, D., Yonezawa, S., Nogawa, H., Yoshimura, H. And Ito, O. (1976).** Transfer of dietary kanamycin into eggs and its disappearance from eggs and from the liver and bile. *Japan. Poult. Sci.*, 13, 129-135.

## **VII. Ekler**

- a) Mali Bilanço ve Açıklamaları
- b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar
- c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)
- d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**
- e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

**NOT: Verilen kesin rapor bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, kesin rapor Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Kesin raporda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslar arası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.**

