

HAYVANSAL DOKULARDA OKSİTETRASİKLIN (OTC) VE
TETRASİKLIN (TC)'İN FLUOROMETRİK TAYİNİ VE SİTRİK
ASİDİN (OTC)'NİN EMİLMESİNDEKİ ETKİSİ*

*Fluorometric determination of oxytetracycline (OTC) and tetracycline
(TC) in animal tissues and influence of citric acid on absorption of
oxytetracycline*

Ahmet ACET¹
Mehmet NİZAMLIOĞLU²

Summary : In this study, 55 broiler chickens which have been provided from the poultry-house of the Veterinary Faculty of University of Selçuk were used.

Plasma, white muscle, red muscle, liver and kidney tissues, following the oral administration of the antibiotic tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC) alone or with citric acid, were determined in broiler chickens.

The fluorometric method was used for the determination of the OTC and TC residues in the tissues and plasma. The emission maxima of OTC and TC were at 500 nm and the excitation maxima were at 400 nm. The levels of OTC and TC in all the tissues were found to be between 0.041 and 2.86 ppm, 0.003 and 0.116 ppm respectively.

Özet : Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi kümesinden temin edilen 55 adet broyler piliç materyal olarak kullanıldı.

Üç grup halindeki deneme hayvanlarına ağızdan sırasıyla, tetrasiklin, oksitetrasiklin ve oksitetrasiklin ile sitrik asit beraber verilerek, plazma beyaz kas, kırmızı kas, karaciğer ve böbrek dokusunda düzeyleri araştırıldı.

Bütün dokularda ve plazmada OTC ve TC rezidüleri tesbitinde fluorometrik metot kullanıldı.

(*) Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonunun desteği ile yürütülmüştür.

(1) Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Farmakoloji Bilim Dalı, Konya.

(2) Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya Bilim Dalı, Konya.

OTC ve TC'nin emisyon maksiması 500 nm, eksitasyon maksiması ise 400 nm olarak belirlendi.

OTC ve TC'nin düzeyleri bütün dokularda sırasıyla 0.041 ve 2.86 ppm, 0.003 ve 0.116 ppm arasında bulundu.

Giriş

Tetrasiklinler çeşitli streptomiçes kültürlerinden elde edilen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir (1). Doğal kaynaklı dört tetrasiklin türeviden (tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve dimetilklortetrasiklin) başka, yarı sentetik (doksisisiklin, minosiklin, rolitetrasiklin) türevleri bulunmaktadır. Bunlar günümüzde insan ve hayvanlarda bakteriyal hastalıkların kontrolü ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (8, 12, 13). Ayrıca danalarda ve kümes hayvanlarında ağırlık artışı sağlamak amacıyla gıdalara ilave katkı maddesi olarak da katılırlar (2, 6, 7, 15).

Uzun süre bu ilaçlarla yapılan tedavi sonucunda kemik ve dişlerde tetrasiklinlerin biriktiği ve özellikle çocuklarda diş bozukluklarına sebep olduğu tesbit edilmiştir (10). Tetrasiklinlerin 1 ppm düzeylerinde insanlar tarafından alınmasında toksik etki meydana gelmediği, ancak 5-7 ppm düzeylerinde toksik etki oluşturabilecekleri belirtilmiştir (1).

Veteriner hekimlikte ineklerin çeşitli hastalıklarında oksitetresiklin yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada (4), oksitetrasiklin sağlıklı ve endometritisli ineklere i.v. verilmiş ve her iki grupta ilacın gerek doku gerekse plazma düzeylerindeki mevcut yoğunluğunda önemli bir farklılığın olmadığı tesbit edilmiştir. Ayrıca oksitetrasiklin farklı yollardan pospartum ve östrus siklusundaki hayvanlara verilmiş, plazma ve uterus dokusunda ilacın dağılımının farklı olduğu tesbit edilmiştir (3).

Plazma ve dokudaki tetrasiklin düzeyleri mikrobiyolojik (2, 8, 9), spektrofotometrik (5, 14), ince tabaka kromatografik (15, 16) ve fluorometrik (11) metotlar ile tayin edilmiştir.

Bu çalışma oksitetrasiklin rezidülerinin biyolojik materyallerde tesbit edilmesi için duyarlı bir kimyasal analiz metodu araştırmak ve sitrik asidin oksitetrasiklin absorpsiyonu üzerindeki etkisini denemek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal olarak, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma kümesinden temin edilen 55 adet broyler piliç kullanıldı. Çalışmada kul-

lanılan standart oksitetrasiklin ve tetrasiklin bileşikleri Sigma Firmasından temin edildi.

Üç grup halinde çalışmaya alınan piliçlerin birinci grubuna, 20 mg/kg dozundaki oksitetrasiklin ağız yoluyla verildikten sonra, 0, 2, 5, 8, 24, 72, 120 ve 168. saatlerde plazma, beyaz kas, böbrek ve karaciğer numuneleri alındı. İkinci grup piliçlere yine ağız yolundan, oksitetrasiklin (20 mg/kg) ve oksitetrasiklin 20 mg/kg + sitrik asit (1 + 5 ve 1 + 8) karışımı verildi. İlacın verilmesini müteakip 1. ve 13. saatler arasında her saat başı olmak üzere kan alınıp plazmaları çıkarıldı. Üçüncü grup piliçlere ise, 50 mg/kg dozundaki tetrasiklin ağız yoluyla verildikten sonra, 0, 2, 5, 8, 24, 72, 120 ve 168. saatlerde plazma, beyaz kas, kırmızı kas ve böbrek numuneleri alındı. EDTA'lı tüplere alınan kanlardan elde edilen plazma ile ayrı ayrı polietilen naylon torbalara konmuş doku numuneleri analize kadar -15°C 'de bekletildi. Numunelerin ölçülmesinde Fluorescence Spectrophotometre (HITACHI 650-40, Xenon lambalı) kullanıldı. Numunelerin analizinde ise Poiger ve Schlatter (11)'in kullandıkları metot esas alındı.

Fluorescen Reaktifinin Hazırlanışı : 200 mg sodyum barbital ve 600 mg magnezyum asetat 100 ml metanolde çözdürülerek hazırlandı.

Numunelerin Okunması : Fluorescence spektrofotometre, oksitetrasiklin ve tetrasiklin için emisyon maksiması 500, eksitasyon maksiması 400, emisyon siliti 10 nm ve eksitasyon siliti 5 nm'ye ayarlandı. Metanolde hazırlanmış ve mikrolitresinde 5 μg oksitetrasiklin ve tetrasiklin bulunan standartların spektrofotometrenin hafızasına kaydedilmesinden sonra, 3 ml hacmindeki numune ekstratlarına 0,5 ml fluorescence reaktifi katılarak yoğunlukları okundu.

Numunelerin Hazırlanması :

Plazma : 3 ml plazma, 10 ml'lik santrifüj tüpüne konuldu ve üzerine 2 ml 1M triklorasetik asit ilave edildikten sonra 400 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvının 3 ml'sine her birinden 2 ml olmak üzere 2M sodyum asetat ve 0.6 M kurşun nitrat solusyonu katıldı. 30 dakika bekletildikten sonra santrifüj edilerek üstteki sıvıdan 4 ml alındı ve üzerine doymuş potasyum iyodat solusyonundan 1.5 ml ilave edildi. 15 dakika bekletildikten sonra santrifüj edildi, üstteki sıvı kısımdan 5 ml ağız kapaklı santrifüj tüpüne alındı ve bunun üzerine 50 μl 1M kalsiyum klorit ilave edildi. pH yoğun amonyak solusyonu ile 9.5'e ayarlandı ve 3 ml etilasetat ilave edilerek 10 dakika çalkalandıktan sonra üstteki etilasetat ekstraktı otomatik pipet yardımıyla ağız kapaklı cam tüpe konarak spektrofotometrede okumaya hazır hale getirildi.

Kas Dokusu : 10 gr et parçası pH: 2 olan 0.1 M glisin buffer'ın 5 ml'si ile momojenize edilerek parçalandı. Bu homojenatın 6 gramı ultra homojenizatörde 4 ml glisin buffer ilave edilerek iyice homojen hale getirildi. 3 gr dokuya tekabül eden 7.5 gr homojenat santrifüj tüpüne alındı. 2.5 ml 1M triklorasetik asit ilave edildikten sonra büyük presipitatları dağıtmak için iyice çalkalandı ve 4000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvıdan 5 ml alınarak üzerine her birinden 1.5 ml olmak üzere 2M sodyum asetat ve 0.06 M kurşun nitrat ilave edilip karıştırıldıktan sonra 30 dakika bekletildi. Santrifüj işleminden sonra üstteki sıvıdan 6 ml alınarak içerisinde 1 ml doymuş potasyum iyodat solusyonu ilave edildi ve 15 dakika çöküntü teşekkül edene kadar bekletildi. Bu numune santrifüj edilerek üstteki sıvının 6 ml'sine 50 µl 1M kalsiyum klorit ile karıştırıldı ve pH yoğun amonyak ile 9.5'e ayarlandı. Ekstraksiyon işlemi yukarıdaki gibi yapıldı.

Böbrek Dokusu : 10 gr böbrek parçası buffer kullanmaksızın homojenizatörde iyice homojen hale getirildi. Bu homojenattan 2 gr alınarak santrifüj tüpüne kondu, üzerine pH 2 olan 0.1 M glisin bufferden 2 ml ilave edilerek iyice karıştırıldı. 5 dakika sonra üzerine 3 ml 1M triklorasetik asit ilave edildi ve bundan sonraki işlem kas dokusunda belirtildiği şekilde yapıldı.

Karaciğer Dokusu : 10 gr karaciğer 10 ml glisin buffer (pH: 2) ile homojenizatörde iyice homojen hale getirildi. Bu homojenatın 2 gramı santrifüj tüpüne alındı ve üzerine pH 2 olan 0.1 M glisinden 2 ml ilave edilerek iyice karıştırıldı. 5 dakika sonra üzerine 3 ml 1M triklorasetik asit ilave edildi ve işlem kas dokusunda belirtildiği şekilde tamamlandı.

Oksitetrasiklin için numunelerin hazırlanmasında kullanılan potasyum iyodat solusyonu yerine kurşun iyodat, kalsiyum klorit yerine sodyum klorit kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi yukarıdaki izah edilen şekilde yapıldı.

Bulgular

Çalışma bulgularının özetlendiği tablo 1'de görüldüğü gibi oksitetrasiklin yoğunluğu sırasıyla en fazla beyaz kas ve plazmada belirlendi. Dokularda tesbit edilen oksitetrasiklin yoğunluklarının en düşük 0.041 ppm, en yüksek 2.86 ppm miktarları arasında olduğu görüldü. Oksitetrasiklin rezidüleri ilacın hayvanlara verilmesinden 2.5-8 saat sonra karaciğer ve böbrekte, 3 gün sonra da beyaz kas ve kırmızı kasta tesbit edildi. Böbrek numunesinde 168. saatten sonra oksitetrasiklin rezidüsüne raslanmadı.

Tablo 2'de oksitetrasiklin ve oksitetrasiklin + sitrik asit (1 + 8) ile OTC + sitrik asit (1 + 8) şeklinde tertiplenen değişik preparatların hayvanlara verilmesinden sonra toplanan plazma örneklerinde oksitetrasiklinin 4. saatte en yüksek düzeye ulaştığı görüldü. Oksitetrasiklin + sitrik asit (1 + 5 ve 1 + 8) oranlarında hazırlanan karışımların ve yalnız oksitetrasiklin verilen hayvanlardan elde edilen plazmalardaki oksitetrasiklin yoğunlukları arasında belirgin bir farklılığın olmadığı tesbit edildi. Oksitetrasiklin verilen hayvanlardan elde edilen plazmalarda en düşük ve en yüksek yoğunluk 0.023 - 0.039 ppm, oksitetrasiklin + sitrik asit (1 + 8) için ise 0.022 - 0.027 ppm arasında olduğu belirlendi.

Tetrasiklinin piliçlere ağız yoluyla 50 mg/kg dozunda verilmesinden sonra, belirtilen saatlerde alınan plazma, beyaz kas, kırmızı kas karaciğer ve böbrek numunelerinde tablo 3'de görüldüğü gibi tetrasiklin rezidüleri sırasıyla en yüksek beyaz kas, kırmızı kas, karaciğer, böbrek ve plazmada tesbit edildi. Tesbit edilen bu değerlerin en düşük 0.0033 ppm en yüksek 0.116 ppm arasında olduğu görüldü.

Tablo 1 - Oksitetrasiklin (OTC) Tavuklara Ağız Yoluyla 20 mg/kg Dozunda verildikten sonra, doku ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ve Plazma ($\mu\text{g}/\text{kg}$) da Tesbit edilen Yoğunluklar

Süre Saat	Plazma (x)	Beyaz Kas (x)	Kırmızı Kas (x)	Karaciğer (x)	Böbrek (x)
0	0.023	0.340	0.039	0.168	0.216
2.5	0.024	0.65	0.040	0.165	0.302
8	0.025	2.50	0.039	0.189	0.208
24	0.022	0.178	0.037	0.204	0.256
72	0.027	0.387	0.039	0.180	0.289
120	0.025	0.580	0.043	0.206	0.231
168	—	2.86	0.041	0.217	0.186

(x) Aritmetik ortalama .

Tablo 2 - Oksitetrasiklin ve Oksitetrasiklin + Sitrik asit Karışımı
Tavuklara Ağız Yoluyla Verildikten Sonra Elde Edilen
Yoğunluklar ($\mu\text{g/ml}$)

Süre Saat	A	B	C
1	0.039	0.025	0.027
2	0.030	0.023	0.024
3	0.024	0.027	0.023
4	0.037	0.048	0.027
5	0.023	0.023	0.024
6	0.025	0.027	0.023
7	0.023	0.029	0.024
8	0.025	0.028	0.023
9	0.030	0.028	0.022
10	0.027	0.026	0.022
11	0.024	0.023	0.027
12	0.023	0.022	0.026
13	0.023	0.023	0.023

A : Oksitetrasiklin (20 mg/kg)

B : Oksitetrasiklin + Sitrikasit (1 + 5)

C : Oksitetrasiklin + Sitrikasit (1 + 8)

Tablo 3 - Tetrasiklin (TC) Tavuklara Ağız Yoluyla 50 mg/kg
Dozunda Verildikten Sonra, Doku ($\mu\text{g/gr}$) ve Plazma
($\mu\text{g/ml}$)'da Tesbit Edilen Yoğunluklar

Süre Saat	Plazma (x)	Beyaz Kas (x)	Kırmızı Kas (x)	Karaciğer (x)	Böbrek (x)
0	0.002	0.012	0.027	0.032	0.016
2.5	0.003	0.116	0.041	0.032	0.64
8	0.003	0.026	0.036	0.015	0.014
24	0.002	0.029	0.108	0.016	0.017
72	0.003	0.013	0.025	0.020	0.033
120	0.006	0.057	0.021	0.053	0.09
168	0.003	0.138	0.072	0.032	0.07

(x) : Aritmetik ortalama

Tartışma ve Sonuç

Günümüzde gerek oksitetrasiklin gerekse tetrasiklin insan ve hayvanlarda bakteriyal hastalıkların kontrolü ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca danalar ve kümes hayvanlarında ağırlık artışı sağlamak amacıyla yemlerin içine katılırlar. Bu kadar geniş kullanım alanına sahip bu grup antibiyotiklerin hayvansal dokulardaki miktarlarının bilinmesi gerekmektedir.

Yurdumuzda oksitetrasiklin ve tetrasiklin rezidülerinin tayini ile ilgili bir araştırmaya raslanmamıştır. Biyolojik materyallerde ve hayvansal gıdalarda bu maddelerin rezidülerini tayini için değişik metotlar kullanılmaktadır. Bu çalışmada Poiger ve ark. (11)'nin tanımladığı fluorometrik metot kullanılmıştır.

Tetrasiklinler insanlar tarafından gıda ile 1 ppm miktarında alındığında herhangi bir toksik etki meydana getirmediği, ancak 5-7 ppm düzeyindeki miktarlarının toksik etki gösterebilecekleri belirtilmiştir (1). Tablo 1, 2 ve 3'de görüldüğü gibi analizleri yapılan dokulardan elde edilen düzeylerde oksitetrasiklin ve tetrasiklinin insanlar tarafından alınmasıyla toksik etkiler meydana getirmeyeceğini doğrulamaktadır.

Pollet ve Glatz (12), tarafından klortetrasiklin, mide-barsak kanalından emilimini artırmak için, sitrik asit ile kombine edilerek verilmiştir. Araştırmacılar sitrik asidin klortetrasiklin emilimini artırdığını belirlemişlerdir. Buna karşılık, tablo 2'de görüldüğü üzere yukarıda belirtilen araştırmacıların elde ettiği sonucun aksine, oksitetrasiklin tek başına veya sitrik asit ile karışımının verilmesi sonucu elde edilen değerler arasında belirgin bir farklılığın olmadığı görülmüştür.

Özet olarak, bu araştırma ile fluorometrik metodun biyolojik materyallerde bulunabilecek oksitetrasiklin ve tetrasiklin rezidülerinin tayininde güvenle kullanılabileceği görüldü. Ayrıca bu grup antibiyotikler tedavi edici dozlarda hayvanlara ağız yoluyla verildiğinde rezidü problemi yaratmayacağı kanaatindeyiz.

Kaynaklar

1. Boot, N. H., McDonald, L. E. (1982). «Veterinary Pharmacology and Therapeutics.» 5. ed., The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
2. Bradley, B. D., Allen, E. H., Showalter, D. H. and Colaianne, J. J. (1982). Comparative pharmacokinetics of chlortetracycline in milk fed versus conventionally fed calves. J. Vet. Pharmacol. Therap. 5, 267-278.
3. Bretzlaff, K. N., Koritz, G. D., Beutll, R. F., Gustafsson, B. K., and

- Davis, L. E. (1983). Distribution of oxytetracycline in genital tract tissues of postpartum cows given the drug by intravenous and intrauterine routes. *Am. J. Vet. Res.*, 44 (5): 764 - 769.
4. Bretzlaff, K. N., Ott, R. S., Koritz, G. D., Bevil, R. F., Gustafsson, B. K., and Dawis, L. E. (1983). Distribution of oxytetracycline in the healthy and diseased postpartum genital tract of cows. *Am. J. Vet. Res.*, 44 (5): 760 - 763.
 5. Chatten, I. G. and Kronose, S. I. (1971). Colorimetric Assay of Tetracycline Antibiotics. *J. Pharmaceutical Sciences*, 60 (1): 107-110.
 6. Dawson, K. A., Langlois, B. E., Stahly, T. S. and Cromwell, G. L. (1983). Multiple Antibiotic Resistance in Fecal, Cecal and Colonic Coliforms from pigs fed therapeutic and subtherapeutic consent rations of chlorotetracycline. *J. An. Science.*, 57 (5): 1225 - 1234.
 7. Honikel, K. O. (1976). Tetracyclinrückstände in Knochen verschiedener Schlachttiere und deren Verhalten beider: Verarbeitung. *Die Fleischwirtschaft*, 722 - 726.
 8. Honikel, K. O., Schwidt, U., Woltesdorf, W. and Leistner, L. (1978). Effect of Storage and Processing on Tetracycline Residues in Meat and bones. *J. A. O. A. C.*, 61 (5): 1222 - 1227.
 9. Mol, H., Boer, E., Demmers, W. A. M., Schut, K. en Vincentie, H. M. (1978). Antibiotica - Residuen in Goedgekeurde runderulers en in daardat berelde vleeswaren. *Tijdschr. Diergeneesh.*, 103 (5): 257-267.
 10. Nouws, J. F. M. (1981). Tolerances and Detection of Antimicrobial Residues in slaughtered Animals. *Archiv For Lebensmittelhigiene*, 4: 103 - 110.
 11. Poiger, H. and Schlatter, ch. (1976). Fluoritemirc Determination of Tetracyclines in Biological Materials. *Analyst*, 100: 808 - 814.
 12. Pollet, R. A., and Glatz, C. E. (1984). Oral Absorption of Chlorotetracycline in Turkeys: Influence of Citric Acid and Pasteurella Multocida Infection. *Poultry Science*, 63: 1110 - 1114.
 13. Pollet, R. A., Glatz, C. E., Dyer, D. C., Barnes, H. J. (1983). Pharmacokinetics of chlorotetracycline potentiation with citric acid in the chicken. *Am. J. Vet. Res.*, 44 (9): 1718 - 1721.
 14. Roushdi, I. M., Ibrahim, E. A., Beltagy, Y. A. and Issa, A. (1973). Colorimetric Methods for the Estimation of Tetracycline Hydrochloride and Oxytetracycline Hydrochloride. *Pharmazie*, 8 (4): 236 - 237.
 15. Ryan, J. J., and Dupont, J. A. (1974). Chemical Analysis of Tetracycline Residues in Animal Tissues. *J. A. O. A. C.*, 57 (4): 828 - 831.
 16. Szabo, A., Nagy, M. K. and Tömörkeny, E. (1978). Thin-layer Chromatographic assay of tetracyclines. *J. Chromatog.*, 151: 256 - 258.