

AGAR-JEL DİFFÜZYON YÖNTEMİ İLE ET NEV'İLERİNİN AYIRDEDİLMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Yıldız AYZ (*)

GİRİŞ

Gıdaların hijyenik yönden kontrolleri Gıda Kontrol Hizmetleri içinde halk sağlığı yönünden önemli bir yer tutmaktadır. Ancak «Taklit veya Tağşiş» adı altında toplanan, üretici tarafından daha fazla kâr amacıyla, bilerek yapılan eksikliklerin, hilelerin tesbiti de hem sağlık hem de ekonomik olarak tüketiciyi etkilemektedir. Değişik etiketler altında başka nev'i etlerin satılması direkt olarak tüketiciyi aldatmak kapsamındadır.

Etlerin ayırddedilmesi konusu yurt dışında I. Dünya Savaşından sonra piyasadaki hilelerle önem kazanmıştır. Federal Almanya'da at etinin, et ürünlerine katılması, daha ileri tarihlerde kanguru etinin kullanılması ile konu güncelliğini sürdürmüştür.

Ülkemizde zaman zaman yapılan taramalarda az da olsa tek tırnaklı hayvan etinin et mamüllerinde kullanıldığı gözlenmektedir. Yakın tarihlerde belediye ekipleri tarafından çöplüklerde köpek artıklarının tespit edilmesi üzerine piyasada köpek eti yönünden taramalar istenmiştir. Aynı şekilde zaman zaman yabani domuz eti yakalanmakta ve bu yönde kontroller sıklaşmaktadır.

Et nev'ilerinin ayırımı Laboratuvarlarımızda Uhlenhuth metodu ile (Tüpte Presipitasyon reaksiyonu) yapılmaktadır. Bu yöntem duyarlı bir metod olup, uygulamada bazı zorluklar getirmektedir. Ma-

(*) Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Gıda Kontrol Lab. Şefi
Uzm. Vet. Hekim.

serasyon sıvısı ile presipitan serumun konsantrasyonlarının uygun olması, oluşan presipitasyon halkasının 20-30 dakika sonunda dağılım göstermesi, çok sayıdaki kontrollerde fazla miktarda presipitan serumu gerektirmesi bellibaşlı sakıncalar olarak sayılabilir.

Agar-gell diffusion metodunda ise homolog antijen ve antikorların agar içinde diffüze olmaları ve karşılaştıkları yerde presipitasyon bandı oluşturmaları esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyon 24-36 saat içinde gerçekleşmekte, oluşan presipitasyon bandı uzun süre kaybolmamaktadır. Bu metod ile çok sayıdaki kontrollerde fazla miktarda presipitan serum harcanmasının önüne geçilebilmektedir. Ancak her iki metotta da hiç ısı işlemi görmemiş et ve et mamüllerinde ve 60°C'ye kadar ısıtılmış et ve mamüllerinde bir sonuca varılabilmekte, yüksek ısı işlemi görmüş et, et ürünleri ve kan serumları ile çalışılmamaktadır.

LİTERATÜR ÖZETİ

Et nev'ilerin ayırdedilmesi başlığı altında hiçbir ısı işlemi görmemiş çiğ etlerin ayırdedilmesi ve ısı işlemi uygulanmış et ve et mamüllerinin ayırdedilmesi konuları yer almaktadır. Bizim laboratuvarında uygulamakta olduğumuz gerek Uhlenhuth ve gerekse Agar-Gell Diffüzyon (AGD) metodlarıyla maximum 60°C kadar ısıtılmış örneklerde ve hiç ısı işlemi uygulanmamış örneklerde olumlu sonuçlar alabilmekteyiz. Daha yüksek ısı dereceleri uygulanmış örneklerde serolojik yoklama yapamamaktayız.

Yurt içi taramalarımızda, Demirel (1) tarafından «Koyun ve Keçi Etlerinin Presipitasyon Metodu ile Ayırdedilmesi» konulu doktora tezinde araştırmacı tüpte presipitasyon ve AGD testleriyle koyun ve keçi etlerinin ancak sature edilerek spesifitesi sağlanmış antiserumlar kullanılarak ayırdedilebileceğini ortaya koymaktadır. AGD ve tüpte presipitasyon testlerinin ikisinde de birbirine yakın akraba Örn: koyun - keçi, at - eşek, hayvan etlerini ve kan serumlarını birbirinden ayırdetmek mümkün olmamaktadır. Bunu bertaraf etmek için elde edilen presipitan serumun elimine edilmek istenen hayvan kanı ile sature edilmesi gerekmektedir. Araştırmacı elde ettiği presipitan serumlarda 64-66°C'ye kadar ısıtılmış et ve 71-72°C'ye kadar ısıtılmış kan serumlarının bu metodlarla ayırd edilebileceğini vurgulamaktadır.

Manz (3) 80°C'de 60 dakika ısıtılmış sığır ve domuz etlerinde denatüre olmayan ve elektroferezde α_2 -globulin bölgesinde tespit edilebilen kas proteinlerinin varolmasından hareket ederek ısıtılmış ve üre ile ekstrakte edilmiş sığır ve domuz etlerinden elde edilen antijen ile tavşanlarda hyperimmunizasyonla, spesifik antiserumlar elde etmiş, bu antiserumları kullanarak ELİSA testiyle 80°C ısıtılmış sığır ve domuz etini ayırdedebilmiştir. Ancak araştırmacı 115°C'ye ısıtılmış sığır ve domuz etlerinden elektroferezde denatüre olmayan proteine rastlamadığı için bu ısı derecelerinde bir antiserum elde edememiştir. Sığır ve domuz etlerinden yaptığı ve 80°C'ye ısıttığı et karışımlarından olumlu sonuçlar aldığını bildirmektedir.

Robert ve arkadaşları (4) ise çiğ etlerin ayırımı için ELİSA uygulamış, sığır, koyun, kanguru, at, deve, domuz etlerini birbirinden ayırmağa çalışmışlardır. Test için microtitre plaklar pH'sı 5.5 olan at eti ekstraktı ile kaplanarak tavşanlardan elde edilen antiserumlarla reaksiyona sokulmuş ve sonuçların 3 saat içinde alındığı bildirilmektedir. Burada Cross reaksiyonları önlemek amacıyla hassas kromatografide cross reaksiyon veren antikorlar uzaklaştırılarak spesifik antiserumların elde edildiği bildirilmektedir.

Gleeson ve Wariker (2) yaptıkları çalışmalarda AGD testinde kullanılan serolojik reagentlerin spesifite kontrollerini yapmış ve bu testin mezbahalarda kullanılabilirliğini kontrol etmişlerdir. Araştırmacılar Agar-gell reaksiyonunun 18 saatlik inkubasyon sonunda gerçekleştiğini, reaksiyonun 24 saat sonra daha güçlendiğini bildirmektedir. Yaptıkları taramada anti sığır serumu ile pozitif reaksiyon veren örneklerde Wellcome anti koyun, anti keçi, serumlarıyla da pozitif sonuç aldıklarını bildirmektedirler. Bu durumun eliminasyon testlerinde zorluk yarattığını vurgulamaktadırlar.

MATERYAL VE METOT

a — **MATERYAL** : Sığır, at, domuz, köpek presipitan serumları, sığır, at, domuz, köpek kan serumları ve etleri, Ankara piyasasından toplanan hazır kıymalar, parça et, salam, sosis, sucuk örnekleri.

b — **METOT** : Presipitasyon reaksiyonu için gerekli olan presipitan serumların eldesi için 3 - 3.5 Kg. ağırlığında sağlıklı erkek tavşanlara beşerli gruplar halinde steril, inaktif sığır, at, domuz, köpek, kan serumları artan dozlar halinde ve periyodik aralıklarla subcutan olarak verildi. Enjectionların bitiminden bir hafta sonra tavşanlar

birgün önceden aç bırakılarak, boyun damarları kesilmek suretiyle kanları alındı. Kan serumları ayrılarak santrifüje edildi. Sterilize edilip; sterilite spesifite ve titre kontrolleri yapıldı. Uygun antiserumlar (en az 1/8000 titreli olanlar) kullanılmak üzere deep-freezde saklandı.

Agar-gell denemeleri için %0,5 tuzlu suya % 1 oranında agar katılarak pH 7'ye ayarlandı. 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. Petri kutularına 5 - 8 mm. kalınlığında dökülerek donmalarını takiben delme işlemleri yapıldı. Delikler çapı 5 mm olacak şekilde birbirlerine ve ortadaki deliğe uzaklıkları 1 cm. mesafede açıldı. Deliklerin dibi erimiş agarla kapatıldı. Vasatların hazırlanmasından sonra kan serumları, et maserasyon sıvıları ile denemelere başlandı. Kan serumları ile yapılan denemelerde, kan serumları çevredeki deliklere, presipitan serum ortadaki deliğe konarak 37°C'lik etüvde bekletildi. 24 saatlik süre içinde pozitif olduğu bilinen kan serumları ile presipitan serum arasında beyaz renkli presipitasyon bandı oluştu. Negatif olduğu bilinen serum ve fizyolojik tuzlu su ile yapılan denemelerde herhangi bir band oluşmadı. Aynı serumlar Uhlenhuth metodu ile de kontrol edildi. At, domuz, köpek, kan serumları ile ayrı ayrı çalışıldı.

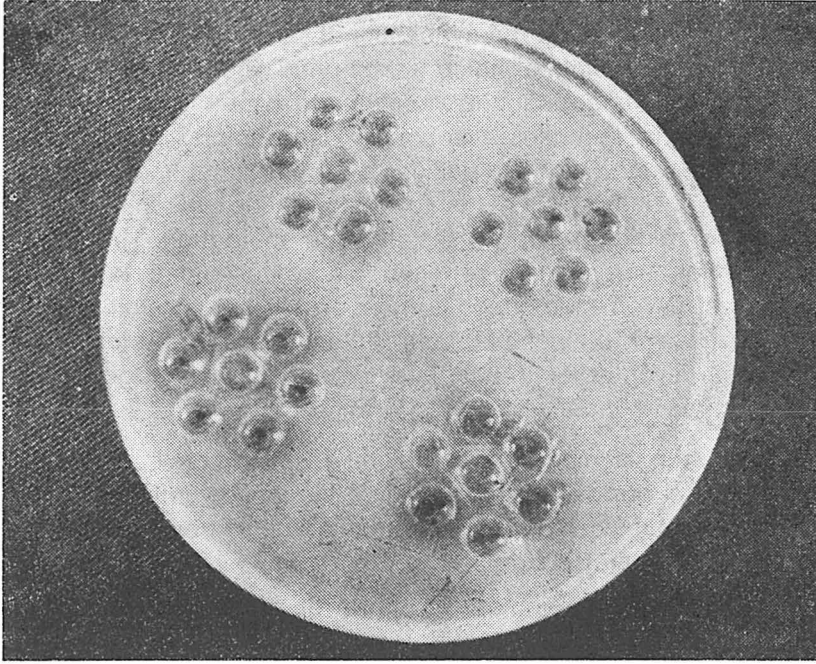
Et örneklerinden, deneme için 30 gr. et numunesine 50 ml. fizyolojik tuzlu su konarak ezildi, maserasyona bırakıldı. Maserasyon buzdolabında 1 gecede, 37°C'de 3-4 saatte oluşmaktadır. Maserasyon sıvısı bu süre sonunda süzülerek, plaktaki hazırlanmış deliklere uygulandı. Ortadaki deliğe denemek istenen presipitan serum kondu. Her deneyde pozitif olduğu bilinen maserasyon sıvısı, negatif olarak bilinen maserasyon sıvısı, kullanıldı. 24 saatlik sürede 37°C'de bekletilen plaklarda pozitif olduğu bilinen et maserasyonu ile o ete ait presipitan serum arasında beyaz, presipitasyon bandı oluştu. Bu denemeler her et nev'i için tekrarlandı. Çiğ et ve kıymalardan yapılan maserasyon sıvıları kendilerine ait presipitan serumlarla hem agar-gell diffusion metodunda hem de Uhlenhuth metodunda olumlu sonuç verdi.

Denemeler bu etlerin ısıtılması, ısıtılmış etlerin maserasyon sıvılarıyla tekrarlandı. 60°C'de 30 dk. ısıtılmış etlerin maserasyon sıvıları Agar-gell'de olumlu sonuç verdi. Fakat 70-80-90°C'lerde ısıtılan parça et ve kıymalardan agar-gell'de ve Uhlenhuth metodlarında bir sonuç alınamadı.

Kokuşmuş et ve kıyma örneklerinden yapılan agar-gell denemelerinde olumlu sonuç alındı.

Et çeşitlerinden çeşitli kombinasyonlar yapılarak bunlardan elde edilen maserasyon sıvıları ile deneyler yapıldı. Her iki metotla da karışık et nev'ilerini tespit etmek mümkün olmaktadır.

Denemelerin son aşaması olan et mamüllerinde deney için piyasadan toplanan hazır kıyma, salam, sucuk, sosis örneklerinden yapılan maserasyon sıvıları her iki metotla denendi.



BULGULAR TARTIŞMA VE SONUÇ

Laboratuvarda sığır, at, köpek, domuz etleri ve serumları ile yapılan çok sayıdaki deneyler dışında piyasadan toplanan parça et, kıyma, salam, sosis, sucuk olmak üzere 125 örnek hem Uhlenhuth yöntemi ile tüpte presipitasyon hem de Agal-gell difüzyon metoduyla analize alınmış, her iki metot arasında % 100 oranında bir uyum gözlenmiştir. 125 örnekte sığır eti müsbet sonuç vermiş, bunun dışında 2 salam ve sosis örneğinde hem sığır hem de domuz eti müsbet bulunmuştur. Bu durum etiketlerinde belirtildiğinden olumlu bir sonuçtur. Diğer örneklerde her iki metotta da sadece sığır presipitan serumu ile pozitif sonuç alındı.

Uhlenhuth metodunda deney sonucu 30 dk. içinde alındığı halde Agar-gell diffusion metodunda 24 saatten daha uzun süre beklemek gerekmektedir. Her iki metotta da presipitan serum titresi ne kadar yüksekse sonuç daha kısa sürede alınabilmektedir. İki metotta birbirleriyle yakın akraba hayvan etlerini Örnek: at-eşek, koyun-keçi birbirinden ayırabilmek mümkün olmamaktadır. Bunun için presipitan serumun o hayvan cinsine ait kan serumu ile saturasyonu gerekmektedir. Araştırmacıların bildirdiği gibi (1, 3, 4) renksiz, berrak, yüksek titrelili antiserum muayenesinin başarı oranını direkt olarak etkilemektedir. Presipitan halka metodunda pipeti dışarı çekerken serum damlatmamağa, sarsıntı yapmamağa azami gayret gerekmektedir. Serumların mutlaka iki tabaka oluşturmaları gereklidir. Agar-gell diffusion metodunda ise deliklerin dibinin kapatılması, antijen ve antiserumların deliklerinden taşmayacak şekilde ve tam olarak doldurulması gereklidir. Tüpte presipitasyon metodunda her numune için presipitan serum koyarken ayrı bir pastör pipeti kullanılırken, Agar-gell diffusion metodunda sayısız örnek için presipitan serumu koymak üzere tek bir pastör pipeti kullanılabilir. Aynı plak üzerinde örnek maserasyon sıvısının hangi nev'i ete ait olduğunu görmek AGD metodu ile mümkündür.

Ancak; her iki metot hiç ısı işlemi uygulanmamış veya 60°C'ye kadar ısı işlemi görmüş et, et mamulleri ve kan serumları hangi nev'i hayvana ait olduğunu belirten, bu amaçla kullanılabilir çabuk sonuç veren pratik metotlardır.

Yüksek ısı işlemi uygulanmış etlerin ayırılması bu metotlarla mümkün olmayıp, başka metotlar gerektirmektedir.

Ö Z E T

Çalışmaya başlarken gerek Uhlenhuth gerekse Agar-gell diffusion metodu için gerekli olan presipitan serumlar hazırlandı. Sığır, at, domuz ve köpek presipitan serumları elde edilerek spesifikite ve titre kontrolleri yapıldı. Uygun antiserumlar denemelerde kullanıldı. Çalışmalar önce presipitan serumların ait olduğu et maserasyonları ve kan serumları ile başlatıldı. Sığır, at, domuz, köpek kan serumları ve et maserasyon sıvıları ile Uhlenhuth ve agar-gell yöntemleri ile et nev'ileri tespit edildi. Uhlenhuth metodunda tüpte her iki sıvı arasında presipitasyon halkası, agar-gell metodunda ise agar-gell plakında presipitan serumu ve deney sıvısı arasında presipitasyon bandı gözlemlendi.

Her iki metotta da % 100 uyum sağlandığı tespit edildi. Sonucun hızlı ve güvenilir olarak alınabilmesi için her iki metotta presipitan serum titresinin yüksek olması gerekmektedir. Bizim çalışmalarımızda 1/8000'den daha düşük titreleri kullanmadık. Genellikle elde edilen titreler 1/10.000 ve 1/12.000 idi.

Numune etlere farklı ısılar uygulanarak ve etler kokuşturularak ısı işlemi uygulanmış ve kokuşmuş etlerde durum tespiti yapıldı. Buna göre 60°C'nin üstünde ısıtılmış etlerde her iki metotla da sonuç alınamamıştır. Kokuşmuş etlerde ise her iki metotla olumlu sonuç alındı.

Etler çeşitli kombinasyonlar haline getirilerek karışık etlerin ayırılabilmesi denemelerinden de olumlu sonuç alındı. Laboratuvar denemelerinden sonra piyasadan toplanan salam, sosis, sucuk, kıyma, parça et olmak üzere toplam 125 örnekte Agar-gell diffüzyon yöntemi ve Uhlenhuth yöntemi uygulandı. 125 örnekte sığır eti müsbet olarak tespit edildi. Etiketlerinde «Sığır ve domuz etlerinden yapılmıştır.» ifadesi bulunan 2 adet salam ve sosis örneklerinde hem sığır hem de domuz eti müsbet sonuç verdi. Bu durum etiketleriyle uyum sağlamıştır.

Sığır Presipitan Serumu					
Sığır Kan Serumu	Sığır eti Maserasyon	60°C Isıtılmış Et Maserasyon	Kokuşmuş Sığır Eti Muayenesi	At, Domuz Köpek Kan Serumu	At, Domuz, Köpek Eti Maserasyon
+	+	+	+	—	—

At Presipitan Serumu					
At Kan Serumu	At Eti Maserasyon	60°C Isıtılmış Et Maserasyon	Kokuşmuş At Eti Muayenesi	Sığır, Domuz, Köpek Kan Serumu	Sığır, Domuz, Köpek Eti Maserasyon
+	+	+	+	—	—

Domuz Presipitan Serumu					
Domuz Kan Serumu	Domuz Eti Maserasyon	60°C Isıtılmış Et Maserasyon	Kokuşmuş Domuz Eti Muayenesi	Siğır, At, Köpek Kan Serumu	Siğır, At, Köpek Et Maserasyonu
+	+	+	+	—	—

Köpek Presipitan Serumu					
Köpek Kan Serumu	Köpek Eti Maserasyon	60°C Isıtılmış Et Maserasyon	Kokuşmuş Köpek Eti Muayenesi	Siğır, Domuz, At Kan Serumu	Siğır, Domuz, At Et Maserasyonu
+	+	+	+	—	—

S U M M A R Y

Studes on differentiation of meat species by using agar-gell diffusion method.

The precipitant sera of cattle horse, pig and dog were prepared and checked. Meat species were determinated by using Agar-gell diffusion and Uhlenhuth's methods. Both of methods were found fitting 100 %.

The experiments were repeated by heating the meat specimens. It is impossible to determinate the meat species which are heated to 60°C with these two methods. The putrid meats are given positive result and mix meat can be differentrated by using these methods. After the laboratuary experiments, 125 spesimens including salami, sausage, savary sausage, mince and beef were taken from markets. Of these, beef was positive «prepared from pork» written on the label, in two salami and sausage specimens beef and pork were positive. This situation was appropriate for their labels.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — DEMİRER, M.A. (1964) : Koyun ve keçi etlerinin presipitasyon metodu ile ayırt edilmesi üzerinde araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları No: 152.
- 2 — GLEESON, L.J., WALKER, P.R. (1984) : Specifity Contrds on Commercial Serologic reagents for meat Speciotion by agar-gel diffusion test. Avustralion Veterinary Journal, Vol. 61, No: 5, May. 1984.
- 3 — JAKOB, M. (1985) : Nachweis hitzedaturierter Muskelproteine mittels ELİSA Fleischwirtsch, 65 (4), 1985.
- 4 — ROBERT, C., TERENCE, LJEAK. (1982) : An Enzyme-Linked Immunosorbent Assoy for Speoies Identification of Raw Meat. J. Sci. Food Agris. 1983, 34, 1143-1148.

AMFETAMİN VE METİLAMFETAMİN ENJEKSİYONUNDAN SONRA BU MADDELERİN, ATLARIN KANINDA ÇIKIŞ VE KAYBOLUŞ ZAMANLARININ SAPTANMASI

Ayman ÖNAL (*) Sebahattin KALAYCI (**)
Metin KERMAN (***)

GİRİŞ

Canlının normalin altında veya üstünde güç, sürat ve cesaret göstermesi, dıştan alınacak maddelerle bir dereceye kadar sağlanabilmektedir. Diğer spor alanlarında olduğu gibi, at yarışlarında da bir atın koşudaki sür'at, kuvvet ve cesaretini veya bunlardan birini değiştirmek amacıyla, normal gıdalar dışında herhangi bir yolla atlara verilen maddelere Doping maddeleri denir (3).

Doping kelimesi CROİSİER'e göre, Flamanca karışım anlamına gelen «Doop» kelimesinden alınmıştır (5).

Amfetamin ve Metilamfetamin, yarış atlarına doping amacıyla kullanılmaktadır. Biz bu maddeleri, yarış atlarının idrar ve salyalarında aramaktayız. Bilindiği gibi vücuda giren yabancı maddeler, etkisini tamamlayıp, idrar ve diğer yollarla vücuttan uzaklaştırılırlar. Ancak etkileri, kandaki seviyelerinin yükseldiği zamana rastlar. Bu bakımdan bu maddelerin kanda görülüş ve kayboluş zamanlarını saptayarak, kontrol edilecek kan numunesinin ne zaman alınması gerektiği konusuna ışık tutması amacıyla bu çalışmayı yaptık.

(*) Etlık Hay. Hast. Arşt. Enst. Biyokimya Lab. Şefi
(**) » » » » » Doping Lab. Şefi
(***) » » » » » Müdürü

LİTERATÜR BİLGİSİ

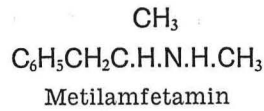
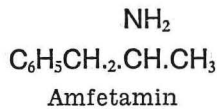
Araştırmacılar, doping maddelerini, etki özelliklerine göre değişik şekillerde gruplandırmışlardır.

Clarke (5) bu maddeleri 4 grup içinde toplamıştır.

- 1 — Stimulan maddeler
- 2 — Depresan maddeler
- 3 — Vitaminler
- 4 — Hormonlar

Amfetamin ve Amfetamin benzeri maddeler kuvvetli stimulan etkiye sahip maddeler olup bunlar tedavi alanında kullanıldığı gibi, bu etkilerinden dolayı doping alanında da geniş ölçüde kullanılmaktadır (2, 4). 5-20 mg.'lık dozlarıyla yorgunluk duygusunu, bilhassa yetersiz dinlenmeden ve uykusuzluktan meydana gelen yorgunluk duygusunu hafifletir, hatta kaldırır. Buna daha doğrusu maskeler demek yerinde olur. Bundan dolayı sporculardan başka, imtihana hazırlanan öğrenciler, gece mesaisi yapan şahıslar tarafından büyük bir istekle kullanılmaktadır. Hatta II. Dünya Savaşı'nda cephede uyanık kalabilmek için Alman ordusu tarafından kullanılmıştır. Ancak Amfetamin normal şahıslar için toksik bir madde olup devamlı kullanılmasında uykusuzluk, hipertansiyon, dolaşım kollapsı meydana getirebilir, karaciğer ve böbrekleri tahriş eder (1, 11).

Amfetamin ve Metilamfetamin baz karakterli maddelerdir. Aynı etkiyi gösterdikleri halde kimyasal yapıları farklıdır.



Amfetamin, barsaklardan iyi absorbe edilir. Alındıktan sonra ilk 24 saat içinde çoğu olmak üzere, 48 saat içinde % 30-40 oranında,

genellikle değişmeden idrarla atılır, 7 gün süreyle idrarda tespit edilebilir. Feçeste bulunmaz. Metilamfetamin de normal şartlar altında değişmeden atılır, yalnızca küçük bir miktarı dimetilasyona uğrar (6).

MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda iki deneme atı kullanıldı. Bunlardan birine Amfetamin sülfat diğerine Metilamfetamin hidroklorid subkutan ve intramuskuler olarak 400 mg. miktarlarında verildi. Atlardan güç sarfettirimeden ve güç sarfettirildikten 10 dakika, 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3,5 saat, 5 saat ve 8 saat sonra alınan kan örnekleri T.C.C. metoduyla analiz edildi (7, 10).

Alet ve Kimyasal Maddeler :

- 1 — T.L. Kromatografi seti (Desaga)
- 2 — Ayırma hunileri
- 3 — Büretler
- 4 — Erlenmayerler
- 5 — Porselen kapsüller
- 6 — Silicagel HF₂₅₄ (Merck)
- 7 — Amonyum sülfat (Merck)
- 8 — Amonyum Hidroksit (Merck)
- 9 — Kloroform (Merck)
- 10 — Amfetamin sülfat standardı (suda % 1'lik)
- 11 — Metilamfetamin Hidroklorid standardı (suda % 1'lik)
- 12 — Metanol (Merck)
- 13 — Potasyum Permanganat çözeltisi (suda % 1'lik)

Metod uygulamasında 50 cc. kan, 50 cc. suyla karıştırılarak homoliz edildi, sonra dilüe HCl ile asitlendirildi ve 60°C'de 100 gr. (HN₄)₂SO₄ ile doyuruldu ve süzöldü. Filtrat NH₄OH ile alkali yapıldı

ve 100 cc. kloroform ile ekstrakte edildi. Kloroform uçuruldu, eritici kalıntısı alkolle karıştırılarak silicagel HF₂₅₄ ile hazırlanıp aktive edilmiş cam kromatogramlara tatbik edildi. Aynı kromatogramlar yaklaşık 20-25 ug. miktarında Amfetamin sülfat ve Metilamfetamin standartları da tatbik edildi. Plakalar amonyumhidroksit + Metanol (1,5 + 100) solventinde developpe edildi.

Cam kromatogramlar ultraviyole lambası altında tetkik edildikten sonra, üzerlerine % 1'lik Potasyum permanganat çözeltisi püskürtüldü. Amfetamin sülfat (Rf: 0,56) ve Metil amfetaminhidroklorid (Rf: 0,48) pembe zemin üzerinde kirli sarı lekeler halinde belirlendi.

B U L G U L A R

Çalışmalarımızın birinci bölümünde etken maddeler, atlara subkutan ve intramuskular olarak verildi ve güç sarfettirilmeden 10 dakika, 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 3,5 saat sonra alınan kan örnekleri incelendi. (2 x 4 x 6 = 48 adet). Ancak 10 dakika sonra alınan kan örneğinin dışında hepsinin olumlu tepkime vermesi üzerine, ikinci bölümde bunlara ilaveten enjeksiyondan 5 saat ve 8 saat sonra aynı zamanda atlara güç sarfettirildikten sonra alınmak üzere (2 x 2 x 2 x 4 x 2 x 8 = 512 adet) toplam 560 adet kan örneği analiz edildi.

Buna göre: Tablo 1,

1 — Subkutan enjeksiyondan sonra güç sarfetmemiş atlardan alınan kan örneklerinin incelenmesinde;

Enjeksiyondan 10 dakika sonra alınan kan örneklerinin hiç birinde etken maddeler bulunamamıştır.

Enjeksiyondan 15 dakika sonra alınan kan örneklerinde gerek Amfetamin, gerekse Metilamfetamin maddesi zayıf tepkime göstermiştir.

Enjeksiyondan 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3,5 saat, 5 saat sonra alınan kan örneklerinin hepsinde olumlu tepkime saptanmıştır.

Enjeksiyondan 8 saat sonra alınan kan örneklerinin hepsinde zayıf tepkiye saptanmıştır.

2 — Subkutan enjeksiyondan sonra, güç sarfetmiş atlardan alınan kan örneklerinin incelenmesinde;

Enjeksiyondan 10 dakika sonra alınan kan örneklerinde etken maddeler bulunamamıştır.

Enjeksiyondan 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3,5 saat ve 5 saat sonra alınan kan örneklerinin hepsinde olumlu tepkime saptanmıştır.

Enjeksiyondan 8 saat sonra alınan kan örneklerinde, Metilamfetamin maddesi, ikisinde olumlu fakat zayıf, ikisinde olumsuz tepkime göstermiş, Amfetamin maddesi, hepsinde olumlu fakat zayıf tepkime göstermiştir.

3 — İntramuskuler enjeksiyondan sonra, güç sarfetmemiş atlardan alınan kan örneklerinin incelenmesinde;

Enjeksiyondan 10 dakika sonra alınan kan örneklerinin hiçbirinde etken madde saptanamamıştır.

Enjeksiyondan 15 dakika sonra alınan kan örneklerinde zayıf tepkimeler saptanmıştır.

Enjeksiyondan 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3,5 saat ve 5 saat sonra alınan kan örneklerinin hepsinde olumlu tepkime saptanmıştır.

Enjeksiyondan 8 saat sonra alınan kan örneklerinin hepsinde olumlu fakat zayıf tepkime saptanmıştır.

4 — İntramuskuler enjeksiyondan sonra güç sarfetmiş atlardan alınan kan örneklerinin incelenmesinde;

Enjeksiyondan 10 dakika sonra alınan kan örneklerinde etken maddeler bulunamamıştır.

Enjeksiyondan 15 dakika sonra alınan kan örneklerinde olumlu fakat zayıf tepkimeler saptanmıştır.

Enjeksiyondan 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3,5 saat ve 5 saat sonra alınan kan örneklerinin hepsinde olumlu tepkime saptanmıştır.

Enjeksiyondan 8 saat sonra alınan kan örneklerinde 2 Amfetamin ve 2 Metilamfetamin olumlu fakat zayıf tepkime göstermiş, diğerlerinde etken maddeler bulunamamıştır.

T A R T I Ş M A

Deneme atlarında yaptığımız bu çalışmanın sonucunda, Amfetamin ve Metilamfetamin'in 400 mg. miktarlarının, subkutan ve intramüskuler enjeksiyonlarından 15 dakika sonra kanda görülmeye başlandığı, 8 saatin sonunda da kaybolduğu saptanmıştır. Kalaycı ve Kerman (9) Amfetamin grubu maddelerin 400 mg. miktarlarını deri altı ve kas içi yolla kısırlara vermişler, idrar ve salya örneklerinde bu maddelerin çıkış ve kaybolmuş zamanlarını saptamışlardır. Buna göre idrar örneklerinde çıkış zamanı şiringadan sonraki 30-40-45. dakikalar, kayboluş zamanı 29,5-31-33. saatlerdir. Salya örneklerinde ise çıkış zamanı şiringadan sonraki 40. dakika, kayboluş zamanı ise 24. saattir.

Debackere ve Massart-Leen (8) 6 kısırağa, tedavi dozlarında D-amfetamin tartarat enjekte etmişler, salya, idrar ve kan örneklerinde T.L.C. metoduyla çalışmışlardır.

Enjeksiyondan sonra 1 ve 3. saatlerde kanda amfetamin bulmuşlar, daha sonra saptayamamışlardır. Araştırmacılar burada etken maddeleri tedavi dozunda şiringa etmişler ve analiz için 20 ml. kan kullanmışlardır. Biz 50 ml. kandan ekstraksiyon yaptık ve enjeksiyondan sonra 8. saate kadar amfetaminin kanda bulunabildiğini gördük.

S O N U Ç

Sonuçta gerek intramuskuler, gerekse subkutan enjeksiyondan sonra, her iki maddenin de atların kanında görülüş zamanınının 15. dakikanın sonu, kayboluş zamanınının ise 8. saatin sonu olduğu kanısına varılmıştır. Bu arada en şiddetli tepkimenin yarım saat ile 1 saat arasında olduğu gözlenmiştir (Tablo: 2).

Ö Z E T

Yarış atlarına doping amacıyla kullanılan Amfetamin ve Metilamfetamin'in yüksek dozlarının enjeksiyonundan sonra bu maddelerin kanda görülüş ve kayboluş zamanlarını saptamak için bu çalışma yapıldı.

Bunun için bu maddelerin suda eriyen tuzları olan Amfetamin sülfat ve Metilamfetamin hidroklorid kullanıldı.

İki deneme atından belli saatlerde aldığımız kan örnekleriyle çalışıldı.

Çalışmalarımızda T.L.C. metodu uygulandı.

Toplam 560 adet kan örneği analiz edildi.

Sonuçta etken maddelerin deri altı ve kas içi şıringadan sonra, güç sarfetmiş ve güç sarfetmemiş atlardan alınan kan örneklerinde, çıkış zamanının 15. dakikanın sonu, kayboluş zamanının ise 8. saatin sonu olduğu kanısına varıldı.

S U M M A R Y

We studied on the determination of appearance and disappearance time of the amphetamine and methylamphetamine in the blood after injection of high doses. Those agents are commonly used as doping material for race horses.

For this purpose we used amphetamine sulphat and methylamphetamine hydrochloride which are the water soluble salts of those agents

We have taken bloods from two horses at limited hours.

In these study we have used thinlayer Chromatographic Technique.

We analyzed 560 samples of bloods totally.

As a result we found that appearance time of the agents inoculated to the forced and nonforced horses both intradermal and intramuscular was after 15 minites and disappearance time was 8 hours.

TABLO : I

Deri altı ve kas içi enjeksiyondan sonra, Amfetamin ve Metilamfetamin'in, kanda tespit edilebildiği zamanlar :

	S. Kutan GÜÇ SARFETMEMİŞ		S. Kutan GÜÇ SARFETMİŞ		İntra Musk. GÜÇ SARFETMEMİŞ		İntra Musk. GÜÇ SARFETMİŞ	
	A.S.	M.A.	A.S.	M.A.	A.S.	M.A.	A.S.	M.A.
10 dakika	—	—	—	—	—	—	—	—
15 dakika	+	+	+	+	+	+	+	+
30 dakika	+	+	+	+	+	+	+	+
1 saat	+	+	+	+	+	+	+	+
2 saat	+	+	+	+	+	+	+	+
3,5 saat	+	+	+	+	+	+	+	+
5 saat	+	+	+	+	+	+	+	+
8 saat	+	+	+	±	+	+	±	±

		Subkutan enjeksiyondan sonra GÜÇ SARFETMEMİŞ atların kan örneklerinde...		Subkutan enjeksiyondan sonra GÜÇ SARFETMİŞ atların kan örneklerinde...		İntramusküler enjeksiyondan sonra GÜÇ SARFETMEMİŞ atların kan örneklerinde...		İntramusküler enjeksiyondan sonra GÜÇ SARFETMİŞ atların kan örneklerinde...	
Amfetamin Sülfat'ın	Metil Amfetamin'in	Amfetamin Sülfat'ın	Metil Amfetamin'in	Amfetamin Sülfat'ın	Metil Amfetamin'in	Amfetamin Sülfat'ın	Metil Amfetamin'in	Amfetamin Sülfat'ın	Metil Amfetamin'in
15. dakika sonu		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI	
30. dakika - 1 saat arası		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME	
8. saatin sonu		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI	
15. dakika sonu		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI	
30. dakika - 1 saat arası		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME	
8. saatin sonu		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI	
15. dakika sonu		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI	
30. dakika - 1 saat arası		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME	
8. saatin sonu		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI	
15. dakika sonu		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI	
30. dakika - 1 saat arası		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME	
8. saatin sonu		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI	
15. dakika sonu		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI		ÇIKIŞ ZAMANI	
30. dakika - 1 saat arası		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME		EN ŞİDDETLİ TEPKİME	
8. saatin sonu		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI		KAYBOLUŞ ZAMANI	

ETİKEN MADDELERİN ATLARIN KAN ÖRNEKLERİNDE ÇIKIŞ VE KAYBOLUŞ ZAMANLARI

TABLO : II

L İ T E R A T Ü R

- 1 — AKGÜN, N. (1958) : «Sportif Dopingler Problemi». A.Ü. Tıp Fak. Mecmuası. Cilt XI, Sayı: 3-4.
- 2 — ALP, F., KALAYCI, S. (1967) : «Amfetamin ve Benzeri Maddeleri Kâğıt Kromatografisi Yardımı ile Birbirinden Ayırmaya Yarayacak Ayıraçların Bulunması.» Etlik Vet. Bakt. Enst. Dergisi Cilt:3, Sayı: 3-4.
- 3 — ALP, F. (1971) : «Doping». Etlik Vet. Bakt. Enst. Dergisi Cilt: 3, Sayı: 11-12.
- 4 — BUSCHER. (1974) : «Horse Doping». 5-32 Hannover.
- 5 — CLARKE, E.G.C. (1962) : «The Doping of Race Horses». The Medico-Legal Journal Vol: XXX, Part: IV.
- 6 — CLARKE, E.G.C. (1969) : «Isolation and Identification of Drug». The Pharmaceutical Press. 17 Bloomsbury Square WCI London Page: 192-193 and 420-421. XXI+870.
- 7 — CURRY, A.S., POWEL, H. (1954) : «Nature». 173. 1143.
- 8 — DEBACKERE, M., MASSART-LEEN, A.M. (1965) : Identification and Metabolism of Amphetamine in Some Domestic Animals. Arch. Inst. Pharmacodyn 155 No. 2 450.
- 9 — KALAYCI, S., KERMAN, M. (1988) : Bazı Amfetamin Maddelerinin At İdrarlarında Aranması. Etlik Vet. Mikrob. Dergisi Sayı: 2, Cilt: 6.
- 10 — SWITH, I. (1960) : «Chromatographic and Electrophoretic Techniques» Vol. 1 Printed in Great Britain by the Pitman Press Bath. 394-403 XVII+617.
- 11 — STOLMAN, A., STEWART, C.P. (1965) : «Nerve Stimulating Drug» Propress in Chem. Toxic Vol: 2 Academic Press. New York - London. Page: 93 X+415.