

KLORAMFENİKOLÜN YUMURTA TAVUKLARINDA VERİM
ÜZERİNE ETKİSİ ve YUMURTADA KLORAMFENİKOL
REZİDÜLERİNİN ARANMASI (*)

*The effect of chloramphenicol on production of laying hens and
determination of chloramphenicol residues in eggs.*

Ahmet ACET¹
Şakir D. TUNCER²
Behiç COŞKUN³
Ömer DEMET⁴
Bünyamin TRAŞ⁵
Erol BAYTOK⁶

Summary : This study was conducted to the effect of chloramphenicol on the egg production of the laying hens and the residue levels in the eggs. Laying hens in four groups of 30 were fed on a diet containing chloramphenicol 0 ppm (group I), 20 ppm (group II) and 40 ppm (group III) for two months and 400 ppm (group IV) as a therapeutic dose for 5 days.

Chloramphenicol did not effect on egg yield, egg weight, feed intake, and feed efficiency ratio.

The residue of the chloramphenicol in the eggs were determined by using HPLC. Residues of the chloramphenicol can be routinely quantitated by this method at 2 ppb with 80-90 % recovery.

No residue of chloramphenicol in the eggs from the group II was detected. But 5-20 ppb residue were found in the eggs from group III. Increasing level of residues (58-197) were in the eggs from group IV in

(*) Bu çalışma S. Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

- (1) Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fak. Farmakoloji - Toksikoloji Anabilim Dalı.
- (2) Prof. Dr., S. Ü. Veteriner Fak. Hay. Bes. ve Bes. Hast. Anabilim Dalı.
- (3) Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fak. Hay. Bes. ve Bes. Hast. Anabilim Dalı.
- (4) Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Vet. Fak. Farmakoloji - Toksikoloji Anabilim Dalı.
- (5) Arş. Gör., S. Ü. Veteriner Fak. Farmakoloji - Toksikoloji Anabilim Dalı.
- (6) Arş. Gör., Y. Y. Ü. Vet. Fak. Hay. Bes. ve Bes. Hast. Anabilim Dalı.

the first five days. Then the levels of residues decreased and were not detected on the day 30 after withdrawal of the drug.

Özet : Bu çalışma her grupta 30 yumurta tavuğu bulunan 4 grup hayvan üzerinde yapıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak ayrıldı. İkinci ve üçüncü gruplara sırasıyla 20 ve 40 mg/kg kloramfenikol ihtiva eden yemler 2 ay süreyle verildi. Dördüncü gruba tedavi dozu olarak 400 mg/kg kloramfenikol içeren rasyon 5 gün süreyle yedirildi.

Yumurtalarda kloramfenikol residülerinin tesbiti likit Kromatografi (HPLC) metodu ile yapıldı. Kloramfenikol residülerinin HPLC metoduyla 2 ppb yoğunluğunda, % 80-90 lık bir geri kazançla tesbit edilebileceği görüldü. Çeşitli yoğunlukta kloramfenikol verilen tavuklarda yumurta verimi, yem tüketimi, yumurta ağırlığı ve yemin etkinlik derecesi bakımından bir fark görülmedi.

Yemlerinde 20 mg/kg kloramfenikol bulunan gruba ait yumurtalarda kloramfenikol residüsüne rastlanmadı. Buna karşılık 40 mg/kg kloramfenikol yedirilen tavukların yumurtalarında 5-20 ppb düzeyinde residü tesbit edildi. Tedavi dozu olarak 400 mg/kg kloramfenikollü yem 5 gün süreyle verilen dördüncü gruba ait yumurtalarda ilk beş günde giderek artan miktarlarda (58-197 ppb) residü bulunmuş ilacın kesilmesini müteakip 5 nci günde 7,25 ppb olan residü miktarı giderek düşmüş ve 30 ncu günden itibaren tesbit edilememiştir.

Giriş

Antibiyotikler günümüzde terapötik ve profilaktik etkileri yanında hayvansal ürünlerin artırılması amacıyla da yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda tedavide kullanılan antibiyotiklerin hayvanlarda verim artırıcı olarak rasyonlara katılmasının mahsurları üzerinde önemle durulmaktadır. Bu mahsurlardan başta gelenleri; hayvansal ürünlerde insan sağlığı açısından zararlı antibiyotik residülerine rastlanması, direk toksik etkilerini göstermeleri ve bakterilerin bu maddelere karşı direnç kazanmalarıdır.

Kloramfenikol geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılır.

Kloramfenikolün gerek oral, gerekse parenteral verilmesini müteakip çeşitli doku ve ürünlerde residü bıraktığı birçok araştırma ile ortaya konulmuştur (3, 4, 10, 13, 14, 17, 18, 19). Dünya Sağlık Teşkilatı yumurta, et ve süt gibi hayvansal gıdalarda kloramfenikol residülerinin bulunmasını sakıncalı görmektedir (11, 22). Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Almanya gibi bazı ülkelerde kloramfenikolün yem katkı madde-

si olarak kullanılması yasaklanmıştır (2, 16). Tavuklar üzerinde yapılan bir çalışmada (18) hayvanlara 40 mg/kg yoğunluğunda kloramfenikol 5 gün süreyle verilmiş ve ilaçlı yemin verilmesini takip eden 80. saatten itibaren alınan yumurta örneklerinde kloramfenikol yoğunluğunun yumurta sarısında 0,33 ppm. yumurta akında ise 0.17 ppm düzeylerinde olduğu tesbit edilmiştir.

İçerisinde 40 ppm kloramfenikol bulunan içme suları 7 haftalık broyler piliçlerine 5 gün süreyle verilmiş ve dokulardaki kloramfenikol düzeylerinin kas, karaciğer, deni ve yağ dokularında yaklaşık 40.2 ppm, böbrekte ise 0.6 ppm olduğu görülmüştür (17).

Petz (16) kloramfenikolü 400 mg/kg dozunda yeme katarak yumurta tavuklarına 6 gün süreyle vermiş ve ilaçlı yemi hayvanlara verdikten bir gün sonra yumurta'da 0.2-0.5 mg/kg yoğunluğunda kloramfenikol kalıntısını tespit etmiştir. Araştırmacı hayvanlara verilen kloramfenikollü yemin durdurulmasından 8 gün sonra yumurtada ilaç kalıntılarının tesbit edilemediğini belirtmektedir.

Hayvansal ürünlerde kloramfenikol residülerinin tayininde diğer metotlara göre daha üstün olduğu kabul edilen (1, 6, 16, 21). Yüksek Performans Likid Kromatografi (HPLC) sistemi tercih edilmiştir.

Ülkemizde çeşitli antibiyotiklerle tedavi edilemeyen kronik solunum yolları ve non-spesifik sindirim sistemi hastalıklarının tedavisinde kloramfenikollü preparatlar yaygın olarak kullanılmasına rağmen hayvansal ürünlerimizde insan sağlığı açısından zararlı olabilecek kloramfenikol residülerinin olup olmadığı üzerinde bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışma yumurta tavukları rasyonlarına verimi artırmak amacıyla katılan düşük düzeydeki (20 ve 40 mg/kg) kloramfenikolün yumurta verimi üzerine etkisini incelemek ve yumurtalarda kloramfenikol residülerinin bulunup bulunmadığını tesbit amacı ile yapılmıştır. Ayrıca yine bu çalışmada tedavi dozu olarak yüksek düzeyde (400 mg/kg) kloramfenikol ihtiva eden yemlerin tavuklara kısa süreli (5 gün) olarak yedirilmesi sonunda yumurtalardaki residü düzeylerinin araştırılması da planlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Araştırmada hayvan materyali olarak S.Ü. Veteriner Fakültesi Deneme Hayvanları Ünitesinden temin edilen 120 adet yumurta tavuğu kullanıldı.

Çalışmada gerek yemlere katılan gerekse ilaç residülerinin tayininde standart madde olarak kullanılan, saf kloramfenikol Sigma firmasından temin edildi.

Kloramfenikol rasmol yada mermer tozu gibi bir taşıyıcı ile homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra belirli miktarlarda rasyonlara ilave edildi.

Metot

Araştırma her grupta 30 yumurta tavuğu bulunan 4 grup hayvan üzerinde yürütüldü. Birinci grup kontrol grubu olarak ayrıldı. İkinci ve üçüncü gruplara 20 ve 40 mg/kg kloranfenikol ihtiva eden yemler 2 ay süreyle dördüncü gruba tedavi dozu olarak kabul edilen 400 mg/kg kloranfenikol katılan rasyon 5 gün süreyle verildi.

Düşük dozda kloramfenikol verilen 2 nci ve 3 cü gruptaki hayvanlarda kloranfenikolün yumurta verimi, yem tüketimi, yumurta ağırlığı ve yemin değerlendirilme derecesi üzerine etkisi araştırıldı. Ayrıca kontrol grubu da dahil olmak üzere ilk 3 gruptan haftada bir alınan üçer yumurta örneğinde menfi sonuç alınıncaya kadar kloranfenikol residü analizi çalışmaları sürdürüldü. Dördüncü grupta yemin hayvanlara verilmesini izleyen ilk 10 günde her gün, ikinci 10 günde 3 günde bir sonra her 5 günde bir alınan yumurta örneklerinin kloramfenikol bakımından analizleri yapıldı.

Numunelerin Hazırlanması

Homojenize edilmiş 25 g yumurta içeriğinin pH'sı fosfatlı tampon çözeltisi ile 6 ya ayarlanıp ultratoraksta karıştırıldı. Üzerine 50 ml asetonitril ilave edilerek 5 dakika daha karıştırılıp 40 ml asetonitrille yıkılarak 4000 devir/dk. da 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım 50 ml diklormetan ile karıştırılarak içerisinde 3 g sodyum klorür bulunan 250 ml'lik ayırma hunisine konuldu. Yaklaşık 5 dakika çalkalandı. Alttaki faz atıldı ve diğer faza 5 g anhidroz Na_2SO_4 katılarak erlenmayere konuldu. Üzerinde cam pamuk bulunan huni yardımı ile süzüldü ve diklormetanla tekrar muamele edildi. Rotary Evaporatörde 45 °C de kuruyana kadar uçuruldu. Üzerine 1 ml metanol ve 0.5 ml n-hekzan katılarak tüpe alındı. Bulanık olan sıvı pastör pipeti ile 8 ml'lik tüpe konularak üzerine 1 ml mobil fay ilave edildi. İki üç dakika santrifüj edildikten sonra alttaki açık saydam tabaka numune şişelerine konuldu. Bu numunenin 20 si HPLC de analiz edildi.

Numunelerin okunması

Grafik 1'de görüldüğü gibi kloramfenikol için kalibrasyon eğrisi ha-

zırlandı. Bu kalibrasyon eğrisi metanolde değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış kloramfenikolün, HPLC ye enjeksiyonu sonucu elde edilen piklerin alanlarına göre (Area Normalizasyon Metodu) hesaplanarak belirlendi. Yumurta ekstraktlarında bulunabilecek kloramfenikol kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak tesbit edildi.

İstatistiksel hesaplar

Araştırmadan elde edilen veriler Snedecor (20) tarafından bildirilen Chi kare (χ^2) metodu ile değerlendirildi.

Bulgular

Yapısında 20 ve 40 mg/kg kloramfenikol bulunan rasyonlarla 2 ay süreyle beslenen yumurta tavuklarında ve yine 400 mg/kg kloramfenikol içeren rasyonla beslenen tavuklarda belirlenen yumurta verimi, yem tüketimi, yumurta ağırlığı ve yemin etkinlik derecesi tablo 1 de gösterilmiştir.

Yumurtalarda kloramfenikol residü tayini için kullanılan kolon kromatografisinde (HPLC) su + metanol (65 + 35) mobil fazının uygun solvent olduğu şekil 1 ve 2 de gösterilmiştir. Grafik 1 de standart kloramfenikol eğrisi, grafik 2 de ise 40 ve 400 mg/kg kloramfenikol ihtiva eden rasyon yedirilen tavukların yumurtalarına ait residü yoğunlukları verilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Tablo 1 de görüldüğü gibi 20, 40 ve 400 mg/kg miktarlarında yeme katılan kloramfenikolün yumurta tavuklarında yumurta verimi yem tüketimi yumurta ağırlığı ve yemin etkinlik derecesi üzerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir. Bu konuda yapılmış benzer bir çalışma bulunmadığından elde edilen değerler karşılaştırmak mümkün olamamıştır.

Hayvansal dokularda bulunan kloramfenikol rezidü düzeylerinin tesbiti mikrobiyolojik ve kromatografi esasına dayanan yöntemlerle yapılmaktadır (12, 14). Bunlar arasında son zamanlarda fazlaca tercih edilen yüksek performans likit kromatografisi (HPLC) kloramfenikol rezidü analizlerinde duyarlı ve güvenli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (2, 6, 12).

Kloramfenikollü yemle beslenen tavukların yumurtalarında residü analizleri likit kromatografi metodu ile yapılmıştır. Numune ekstraksiyonu temizleme aşaması ve sonuçların okunmasında Petz (16) in belirttiği metot uygulanmıştır. Ancak kromatografi şartlarından mobilfaz

(Su + Metanol) 65 + 35 oranında ve 1,5 ml/dk hızında daha uygun bulunmuştur. Böylece kloramfenikol residülerinin ekstraktan daha iyi separe olduğu ve duyarlılık limitinin 2 ng arttığı kaydedilmiştir (Şekil 1, 2).

Hapke ve Grahwit (12) 25, 100, 200 ve 400 mg/kg gün düzeylerinde kloramfenikol içeren rasyonla beslenen tavukların yumurtalarında 9. güne kadar sırayla 0.5 - 0.8, 3 - 6, 6 - 20 ve 12 - 60 mg/kg yoğunluklarında kloramfenikol kalıntısı tesbit etmişlerdir. İlaçlı yemin kesilmesinden sonra 8, 9, 10 ve 11. günlerde ise herhangi bir kalıntıya rastlanılmamıştır. Sunulan çalışmada 20 mg/kg kloramfenikol içeren yemle beslenen gruba ait yumurtalarda kloramfenikol kalıntısı bulunmamıştır. Buna karşılık 40 mg/kg ve 400 mg/kg kloramfenikol içeren rasyonla beslenen gruplarda küçümsenemeyecek düzeyde ilaç kalıntısı tesbit edilmiştir. İlaçlı yemin hayvanlara verilmesinin sona erdirilmesinden sonra 25. güne kadar yumurtalarda kalıntı görülmüştür. Öte yandan Hapke ve Grahwit (12) aynı düzeylerde ve sürede verilen yemin kesilmesinden sonra 10. günde yumurtalarda kloramfenikol rezidüsüne rastladığını belirtmektedirler. Bu durumun kullanılan metotlar arasındaki duyarlılık farklılıklarından ileri geldiği düşünülmektedir.

Benzer diğer bir çalışmada (18) da 40 mg/kg kloramfenikol içeren rasyonla 5 gün süreyle beslenen tavukların yumurtalarında yemin sona erdirilmesini müteakip 80. saatte yumurta sarısında 0.33 ppm, yumurta akında ise 0.17 ppm düzeyinde ilaç kalıntısının tesbit edildiği belirtilmektedir.

Boisseau (4) üç gün süreyle günde 100 mg/kg düzeyinde kloramfenikol içeren rasyonla beslenen tavukların yumurtalarında 5. günde 8000 mg/kg, 10. günde 15 mg/kg ve 15. günde 3 mg/kg ilaç kalıntısı tesbit ederken, bu oranın yumurta sarısında 1. günde 1500 mg/kg ve 7. günde ise 1 mg/kg'dan az olduğunu bildirmektedir.

Petz (16) ise, 400 mg/kg oranında kloramfenikol içeren yemlerle 6 gün süreyle beslenen tavukların yumurtalarında yemin kesilmesini müteakip 1. günde 0.2 - 0.5 mg/kg düzeyinde ilaç kalıntısı belirlemiştir. Maksimum kloramfenikol yoğunluğunun 0.9 mg/kg olduğunu ve ilaçlı yemin kesilmesinden sonra 9. güne kadar yumurtalarda kloramfenikol kalıntısının bulunduğunu öne sürmektedir.

Yukarıda değinilen benzer çalışmalar sonucunda elde edilen veriler göz önünde tutulduğunda gerek profilaktik ve gerekse tedavi dozunda kloramfenikol uygulanmasından sonra yumurtalarda rezidü bulunma sürelerinde farklılıklar gözlenmektedir.

Yapılan bu çalışmada 20 mg/kg kloramfenikol kapsayan yemlerle 2

ay beslenen yumurta tavuklarında kloramfenikol verilmesinin kesilmesini müteakip yapılan yumurta analizlerinde kloramfenikol residüsüne rastlanılmamıştır. Yemlerinde 40 mg/kg kloramfenikol bulunan tavukların yumurtalarında ise grafik 3 de görüldüğü 5-20 ppb düzeyinde kloramfenikol kalıntısı tesbit edilmiştir. Yine aynı grafiğin incelenmesinden anlaşılacağı gibi tedavi dozu olan 400 mg/kg kloramfenikol içeren rasyonun tavuklara 5 gün yedirilmesinden bir gün sonra başlayarak yumurtada 5 nci güne kadar artan miktarlarda (58 - 197 ppb) kloramfenikol tesbit edilmiştir. İlacın kesilmesini müteakip 5 nci günde 7,25 ppb olan residü miktarı giderek düşmüş ve 30 ncu günden itibaren yumurtalarda residü tesbit edilememiştir.

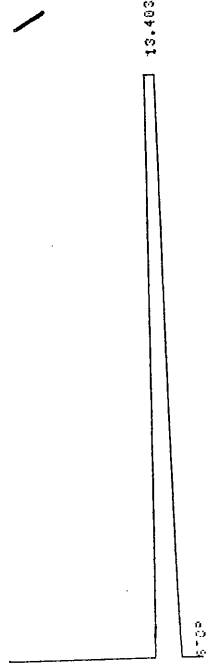
Sonuç olarak, kloramfenikolün tavuklarda yumurta verimi arttırmaya yönelik bir amaçla kullanılmasının ekonomik olmadığı, rasyonlarda bulunmasının beklenen etkiyi sağlamadığı görülmüştür. Ayrıca bazı spesifik hastalıklarda terapötik dozda yemlerle birlikte kullanıldığında son ilaç uygulanmasından sonra 25. güne kadar yumurtalarda ilaç kalıntısının bulunabileceği göz önüne alınarak böyle yumurtalar insanlarda özellikle çocuklarda olumsuz etkilere yol açacağı için bu süre içerisinde yumurtaların insan tüketimine sunulmaması gerektiği kanısına varılmıştır.

Tablo 1. Farklı düzeylerde kloramfenikol verilen gruplarda yumurta verimi, yem tüketimi ve yumurta ağırlıkları.

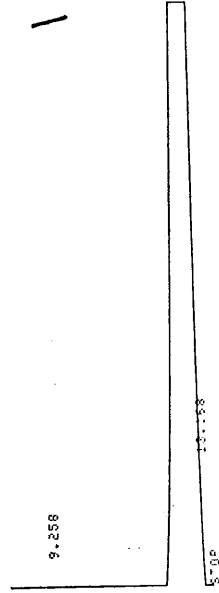
	Kloramfenikol Düzeyleri			
	I Kontrol	II 20 mg/kg	III 40 mg/kg	IV 400 mg/kg
Tavuk sayısı	30	30	30	30
Yumurta verimi (*), %	96.61	95.36	96.73	95.54
Yem tüketimi, g/gün	132.62	139.18	135.74	132.56
Yumurta ağırlığı, g	59.98	58.92	59.17	58.91
Yemin etkinlik derecesi (**)	2.29	2.48	2.37	2.36

(*) Gruplar arasında farklılık tespit edilememiştir ($\chi^2 = 0.035$).

(**) 1 kg yumurta için tüketilen yem, kg.

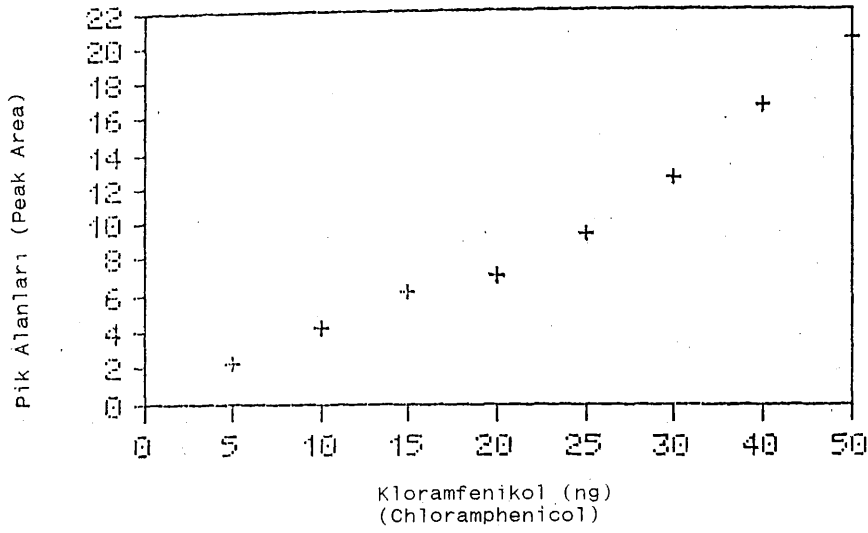


Şekil 1: Standart Kloramfenikol Kromatogramı (100 ng)

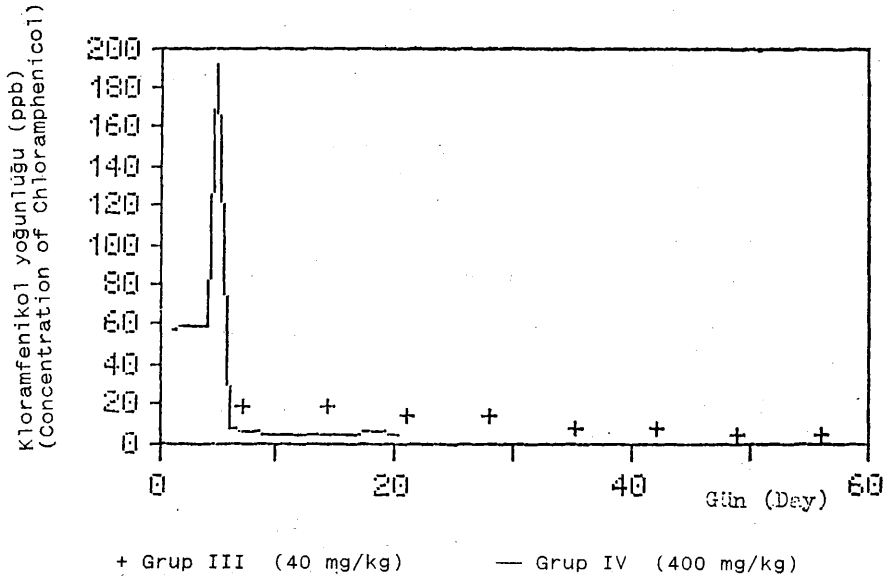


Şekil 2: Numürede Kloramfenikol Kromatogramı

(X 1000)



Grafik 1. Standart Kloramfenikol Eğrisi.
(Curve of Standards Chloramphenicol)



Grafik 2. Yumurtadaki Kloramfenikol Yoğunlukları.
(Chloramphenicol Concentration in Eggs)

Kaynaklar

1. Abou-Khalil, W. H., Yunis, A. A., and Abou-Khalil, S. (1988). Stability of chloramphenicol metabolites in human blood and liver as determined by HPLC. *Pharmacology*, 36, 272-278.
2. Allen, E. H. (1985). Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs and tissues from food producing animals. *J.A.O.A.C.*, 68, 990-999.
3. Becheiraz, M., Maldemann, A. und Etter, R. (1983). Bestimmung von chloramphenicol in tierischen lebensmitteln. *Mitt. Gebiete. Lebensm. Hyg.*, 74, 147-155.
4. Boisseau, J. (1987). Chloramphenicol, cinetiques plasmatiques, lactee et tisulaire, dosage par chromatographie phase liquid haute. (Unpublished report).
5. Booth, N. H., McDonald, L. E. (1982). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. The Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.
6. Bories, G. F., Pelerau, J. C., Wal, J. M. (1983). Liquid chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of chloramphenicol residues in animal tissues. *J.A.O.A.C.*, 66, 1521-1526.
7. Brander, G. C. and Pugh, D. M. (1982). *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*. Baillere and Tindall, London, England.
8. Brown, G. P., Kelly, R. H., Gronwall, R. R. and Stover, S. M. (1984). Chloramphenicol sodium succinat in the horse: serum, synovial, peritoneal and urine concentration after single dose intravenous administration. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 578-580.
9. Burrows, G. E., Barto, P. B., Martin, B., Trip M. L. (1983). Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: chloramphenicol, lincomycin and tylosin. *Am. J. Vet. Res.*, 44, 1053-1057.
10. Epstein, R. L., Ashworth, R. B., and Simpson, R. M. (1988). Chloramphenicol concentrations in calf muscle tissue. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 2075-2077.
11. FAO (1988). Residues of some veterinary drugs in animals and foods. *Food and Nutrition Paper*, 41, Roma.
12. Hapke, H. J. and Grahwit, G. (1987). Residues of Veterinary Drugs, Feed Additives and Environmental Chemicals. *Animal Production and Environmental Health*, 7, 219-244.
13. Johnston, R. W., Reawer, R. H., Harris, E. W., Fugote, H. G., and Shchwob, B. (1981). A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. *Journal of Food Protection*, 44, 825-831.
14. Mercer, H. D. (1980). Drug residues in food animals: 1. Plasma and tissue kinetics of chloramphenicol in young cross-bred swine. *J. Anim. Vet. Med. Assoc.*, 176, 923-924.

15. Nouws, J. F. M., and Zav, (1978). A study of chloramphenicol distribution and residues in dairy cows. *Tijdscher Diergeneesk.*, 103, 725-735.
16. Petz, M. (1984). Ruchstande im ei nach behandlung von legennen mit chloramphenicol und furazolidon. *Archiv for Lebensmittelhygiene*, 35, 49-72.
17. Sisodia, C. S., Dunlop, R. H. (1972 a). Chloramphenicol residues in tissues of broiler chickens, *Can. Vet. J.*, 13, 263-265.
18. Sisodia, C. S. and Dunlop, R. H. (1972 b). Chloramphenicol residue in eggs. *Can. Vet. J.*, 13, 279-282.
19. Sisodia, C. S., Dunlop, R. H., Gupta, V. S., and Teksas, L. (1973). A pharmacological study of chloramphenicol in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 84, 1147-1151.
20. Snedocor, G. W. (1957). *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
21. Wal, J. M., Peleran, J. C. and Bories, G. F. (1980). High Performance Liquid Chromatographic Determination of Chloramphenicol in Milk. *J.A.O A.C.*, 63, 1044-1048.
22. WHO (1969). *Who Report*, No: 430.

