



## GÜNEY MARMARA BÖLGESİNDE SATIŞA SUNULAN HAYVAN YEMLERİNDEKİ ANTİBİYOTİK VE ANTİKOKSİDİOSTAT DÜZEYLERİNİN LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Ali ÖZCAN\* Mehmet Yılmaz KARACA\* Dilek BAYRAKTAR\*

### ÖZET

Bu çalışmada, Güney Marmara Bölgesinde satışa sunulmuş olan hayvansal yemlerde bulunan veteriner ilaç kalıntılarının düzeylerini tespit etmek için antikoksidostatlar, kloramfenikol ve tetrasiklin grubu antibiyotikler incelenmiştir. Avrupa Birliği, yemlerde antibiyotik kullanımını 1 Ocak 2006 tarihi itibarı ile yasaklamıştır. Ülkemizde de karma yemlere ilave edilen büyümeyi artırıcı maddelerden her türlü hormon ve hormon benzeri maddeler ile antibiyotiklerin kullanımı yasaklanmıştır. Önceleri kullanımına izin verilenler dahil antikoksidiyaller ve ilaç niteliğinde olan diğer maddelerin tamamı yasaklanmıştır.

Bu kapsamda bölgesel olarak yapılan çalışmada, antikoksidostat ve antibiyotik analizleri gerçekleştirilmiş ve yemlerde bu tür maddelerin yaygınlığı ortaya çıkmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Yem, Antibiyotik, Antikoksidostatlar, Kloramfenikol, Tetrasiklin, LC-MS/MS

### A STUDY ABOUT DETECTING THE RESIDUE LEVELS of ANTIBIOTICS AND ANTICOCCIDIOSTATS IN ANIMAL FEEDS BY LC/MS/MS METHOD WHICH ARE PUT UP SALE IN SOUTH MARMARA REGION

### ABSTRACT

In this study, animal feeds that put up for sale in the field of the South Marmara Region were searched to detect the veterinary drug residue levels of Chloramphenicol, Tetracyclin antibiotics and Anticoccidiostats. In the European Union, the usage of antibiotics has been prohibited since January 1<sup>th</sup>, 2006. In Türkiye, the usage of any hormones, hormone,-like substances and growth -promoting substances in compound feeds have been prohibited. Including the anticoccidiostats that are allowed to use, utilization of the substances as drug has also been prohibited.

In this context, regional usage of anticoccidiostats and antibiotics in feeds was carried out and the currency of such substances were investigated.

**Keywords:** Feed, antibiotic. antikoksidostatlar, cloramphenicols, tetracyclins, LC-MS/MS

## 1. GİRİŞ

Ülkemiz de dahil olmak üzere bir çok ülkede hayvansal protein açığı vardır ve gün geçtikçe hızlı nüfus artışına bağlı olarak bu açık büyümektedir. Dünya nüfusundaki artışa paralel olarak, ekonomideki gelişme bunun ne kadarının et için talebe dönüşeceğini belirleyecektir. Gelişmekte olan ülkelerde 776 milyon kişi (her 6 kişiden biri) açlık problemi ile karşı karşıyadır (Aynagöz, 1993., Swick, 2005). Halkımızın dengeli beslenebilmesi, başka bir ifade ile hayvansal protein açığının kapatılması hayvansal üretimin hızlı bir şekilde artırılmasına yönelik önlemlerin alınmasını zorunlu kılmaktadır (Aynagöz, 1993).

Hayvan beslemede antibiyotikler, yemler ve biyoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak yıllardır büyütme faktörü olarak kullanılmaktadır. Ancak antibiyotikler, bağırsak mikroflorasındaki yararlı mikroorganizmaların azalmasına neden olmaktadır. Antibiyotiklerin uzun süre kullanımlarında ise patojen mikroorganizmalar direnç kazanmakta ve zamanla antibiyotiklerin etkilerini azaltmaktadırlar (Jensen, 1998.). Türkiye'de karma yemlere ilave edilen büyütme artırıcı maddelerden her türlü hormon ve hormon benzeri maddeler ile antibiyotiklerin kullanımı yasaklanmıştır. Kullanımına izin verilenler hariç antikoksidiyaller ve ilaç niteliğinde olan diğer maddelerin kullanımı da yasaklanmıştır (Anon, 2002., Anon, 2005., Anon, 2006.).

Antibiyotiklerin dezavantajlarının yanı sıra, antibiyotik katkılı yemlerle beslenen hayvanların ürünlerinde kalıntı bırakması ve bu hayvanların ürünleriyle beslenen insanların sağlığını tehdit etmesi, tüketici hassasiyeti yaratmıştır. Özellikle insan sağlığını tehdit eden bu sonuçların paralelinde Avrupa Birliği yemlerde antibiyotik kullanımını 1 Ocak 2006 tarihinden itibaren yasaklamıştır.

Antibiyotikler, yaşayan bir organizma tarafından üretilip bir diğerinin yaşamasına ya da büyüüp çoğalmasına engel olan maddelerdir. Hastalıktan korunma ve tedavi amacıyla olduğu kadar yemden yararlanma ve büyüme oranını artırma amacıyla da kullanılabilir. (Coskun ve ark.1998, Küçükersan, 1999). Antibiyotiklerin yemlere katılmasının karşısında olanlar, sürekli antibiyotik kullanımı ile mikroorganizmalara karşı direnç ve hastalıklara karşı mücadelenin zorlaşacağını, hayvansal gıdalarda kalıntı bırakacağı ve insan sağlığını tehdit edeceğini, karsinogenik ve mutajenik özellikleri olduğunu savunmaktadır. Yemlere antibiyotik katılması özellikle iştahsız, yem tüketimi düşük, rasyonun enerji ve özellikle protein düzeyi yetersiz, sağlığı bozuk, kümes koşullarının hijyenik olmaması ve stres altındaki hayvanlarda antibiyotiğin olumlu etkileri görülmesine karşın yukarıda sözü edilen tüm olumsuz koşulların görülmediği sağlıklı hayvanlarda ve rasyonları tüm besin maddelerini kapsayacak şekilde dengeli hazırlanmış hayvanlarda yararı görülmemekte ve ekonomik olmamaktadır.(Coskun ve ark.1998, Küçükersan, 1999).

Antikoksidiyaller hayvanlarda çok yaygın ve maliyetli hastalıklardan biri olarak koksidiyozis, protozoon parazit olan *Eimeria spp* tarafından oluşturulmaktadır. Koksidiyozis, bağırsaklarda doku hasarına sebep olarak yemlerin sindirimi ve besin maddesi emilimine engel olarak ağırlık kaybı ve kanlı dışkı ile sonlanır. Enfeksiyon hızla yayılır, birçok hayvanın ölmesine sebep olabilir. Eğer hayvanlar koksidiyozisten yaşayabilirse *Clostridium perfringens* tarafından oluşturulan nekrotik enteritis gibi bir

Hastalığa eğilim gösterebilirler. Hijyen ve benimsenen yetiştirme önlemleri, kanatlıları koksidiyozisten korumak için yeterli değildir. Koksidiyozis yemle verilen antikoksidiyaller ile kontrol edilebilir. İlaçsız gıdalara olan talep ve Eimeriaların direnç gösterdiği antikoksidiyal ilaç problemi, antikoksidiyallerin etkinliğini azaltmıştır. Üreticilerin çoğunun koksidiyozisin kontrolünde alternatif metodlara bakmasına yol açmıştır (Paganini, 2005., Ziggers, 2002.)

Dünyada birçok farklı laboratuvarında yapılan çalışmalarda yüksek sıklıkta antikoksidiyallere karşı direnç olduğu doğrulanmıştır. Antikoksidiyal direnç performansı da bozar. Eimeria parazitinin ionoforlara olan hassasiyeti azalır ve bu ürünler önceden etkiledikleri kadar etkili olmazlar ve sonuçta koksidiyozisin kontrolünde optimal olmayan sonuçlara yol açar (Paganini, 2005.).

Avrupa Birliğinde, Koksidiostatlar ve Histomonostatların kullanımına 2012 yılına kadar izin verilmiştir. Antibiyotik orjinli Koksidiostatlar için ise katı önlemler alınacaktır. Koksidiostatların güvenilirliğini sağlamak için Avrupa Komisyonu, koksidiostatların ruhsatlandırılmasının dört yıllık periyotta incelenmesini ve insan sağlığını korumak için maksimum kalıntı seviyelerinin incelenmesine başlanmasını önermektedir (Ziggers, 2002., Anon, 2003.). Türkiye'de kullanılan antikoksidiyal etken maddeleri, decoquinate, monensin sodium, robenidine hydrochloride, lasocid A sodium, halofuginone hydrobromide, narasin, salinomycin sodium, maduramicin ammonium, diclazuril, nicarbazin ve semduramicin sodium dur. (Ziggers, 2002).

Bu çalışmada yem ve yem katkı maddelerinde antikoksidiyostatlar, kloramfenikol ve tetrasiklin grubu antibiyotikler incelenmiştir.

## **2.MATERYAL VE METOT**

### **2.1. Materyal**

Çalışmada materyal olarak Güney Marmara Bölgesinde satışı sunulmuş hayvansal yemler (sığır besi yemi, piliç besi yemi, sığır süt yemi) kullanılmıştır. Toplam 107 adet örnek 1 kg'lık naylon torbalarda tesadüfi örnekleme metodu ile alınmış ve analizler gerçekleştirilene kadar karanlık ve oda ısısında muhafaza edilmiştir.

### **2.2. Metot**

Analizlerde, farklı matrikslerde bulunan antikoksidiyostatlar, kloramfenikol ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerin her biri için geliştirilmiş 3 farklı LC-MS/MS kit yöntemi ile çalışılmıştır.

#### **2.2.1. Kloramfenikol**

Kloramfenikol'ün miktar tayini LC-MS/MS yöntemi ile yapılmaktadır. Miktarlandırma iç standart kalibrasyon yöntemine dayalıdır ve iç standart olarak dötoro kloramfenikol standardı kullanılmıştır. İç standart ilavesi, ekstraksiyon aşamalarından gelen hataları, sıcaklık farklarından kaynaklanan ekstraksiyon verim farklılıklarını ortadan kaldırmak için yapılmıştır. Miktarlandırma, standart ilaveler yöntemine göre veya kloramfenikol içermeyen kör matriks ile harici standart yöntemine göre de yapılabilir.

### 2.2.1.1. Deney

Bu çalışmada kullanılan LC MS/MS metotları, Zivak firmasının geliştirdiği, laboratuvar içi metotlardır.

5.00 g kloramfenikol içermeyen yem numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. 0,100 mL R1, 8,0 mL (2x4 mL) R2 eklenerek 5 dakika vortekste karıştırıldı. 6000 devir/dakika' de 5 dakika santrifüjlendi. Üst kısımdaki berrak çözeltiden 3 mL alınır (berrak değilse 3mL olacak şekilde filtrelenir) ve 15 mL' lik cam tüpte N<sub>2</sub> atmosferi altında, 45°C' de, 5psi' da kurutuldu (sarımtrak, viskoz yağsı kısım kalıncaya kadar). 1,200 mL (2x600 µL) R3 eklenerek 20 saniye vortekste karıştırıldı. 1,200 mL (2x600 µL) R4 eklenerek, vortekste kısa aralıklarla (5 sn), 15 saniye karıştırıldı. 2000 devir/dakika' de 2 dk. santrifüjlendi. Alt fazdan enjektörle numune alındı, 0,45 µm selüloz filtreden süzülerek HPLC flakonuna alındı. LC-MS/MS 'e 50µL enjeksiyon yapıldı.

### 2.2.1.2. Kalibrasyon

5.00 g kloramfenikol içermeyen yem numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. 0.5, 1, 1.5, 2 ppb kalibrasyon örnekleri hazırlamak için her bir tüpe sırasıyla 50, 100, 150, 200 µL ST (ana stok 50 ppb), 0,100 mL R1 ve 8,0 mL (2x4 mL) R2 eklenerek 5 dakika vortekste karıştırıldı. 2000 devir/dakika' de 5 dakika santrifüjlendi. Üst kısımdaki berrak çözeltiden 3 mL alındı (berrak değilse 3mL olacak şekilde filtrelenir) ve 15 mL' lik cam tüpte N<sub>2</sub> atmosferi altında, 45°C' de, 5psi' da kurutuldu (sarımtrak, viskoz yağsı kısım kalıncaya kadar). 1,200 mL (2x600 µL) R3 eklenerek 20 saniye vortekste karıştırıldı. 1,200 mL (2x600 µL) R4 eklenerek, vortekste kısa aralıklarla (5 s), 15 saniye vortekste karıştırıldı. 2000 devir/dakika' de 2 dk. santrifüjlendi. Alt fazdan enjektörle numune alındı, 0,45 µm selüloz filtreden süzülerek HPLC viyaline alındı. LC-MS/MS 'e 50µL enjeksiyon yapıldı.

### 2.2.2. Antikoksidostat

Antikoksidostatın miktar tayini LC-MS/MS yöntemi ile yapılmaktadır. Miktarlandırma dış standart kalibrasyon yöntemine dayalıdır. Miktarlandırma, standart ilaveler yöntemine göre veya antikoksidostat içermeyen kör matris ile harici standart yöntemine göre de yapılabilir.

#### 2.2.2.1. Deney

2.0 g öğütülmüş yem numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. 100 µL R1 ve 5 mL R2 ilave edilir. 15 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. 6 mL R3 ilave edildi. 2 dk vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. 4000 x g 'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, üstteki berrak çözeltiden enjektör ile alındı. 0.45 µm filtreden süzülerek aktarıldı. LC-MS/MS sistemine 10 µL enjeksiyon yapıldı.

#### 2.2.2.2. Kalibrasyon

2.0 g antikoksidostat içermeyen yem numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. 100, 200, 300, 400 ppb kalibrasyon örnekleri hazırlamak için her bir tüpe sırasıyla 50, 100, 150, 200 µL standart (ana stok 4000 ppb) eklenerek 10 s vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. 100 µL R1 ve 5 mL R2 ilave edildi. 15 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. 6 mL R3 ilave edildi. 2 dk vortekste karıştırıldı. 4000 x g 'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, üstteki berrak çözeltiden enjektör ile alındı. 0.45 µm filtreden süzülerek

aktarıldı. LC-MS/MS sistemine 10 µL enjeksiyon yapıldı.

### 2.2.3. Tetrasiklin

Tetrasiklin'in miktar tayini LC-MS/MS yöntemi ile yapılmaktadır. Miktarlandırma dış standart kalibrasyon yöntemine dayalıdır. Miktarlandırma, standart ilaveler yöntemine göre veya tetrasiklin içermeyen blank matriks ile harici standart yöntemine göre de yapılabilir.

#### 2.2.3.1. Deney Prosedürü

5.0 g öğütülmüş yem numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. 10 mL R1 ilave edilir, 2 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. 0,5 mL R2 ilave edildi, 2 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. 4000 devir/dakika de 5 dakika santrifüj edildi. Üst fazdan 3 mL alınarak 500 µL sarımtırak koyu kıvamlı sıvı kalana kadar uçuruldu. 600 mL R3 ilave edildi. 15 s kadar ultrasonik banyoda bekletildi. 1 dk vorteksde karıştırıldı. Örnek 2 mL lik enjektör ile çekilerek alındı ve 0.45 m selüloz filtreden filtrelenerek aktarıldı. LC-MS/MS sistemine 20 µL enjeksiyon yapıldı.

#### 2.2.3.2. Kalibrasyon

5.00 g tetrasiklin içermeyen yem numunesi 50 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. 50, 100, 150, 200 ppb kalibrasyon örnekleri hazırlamak için her bir tüpe sırasıyla 50, 100, 150, 200 µL standart (5000 ppb) eklenerek 10 s vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. 10 mL R1 ilave edildi, 2 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. 0,5 mL R2 ilave edildi, 2 dakika vorteksde karıştırıldı. 4000 devir/dakika de 5 dakika santrifüj edildi. Üst fazdan 3 mL alınarak 500 µL sarımtırak koyu kıvamlı sıvı kalana kadar uçuruldu. 600 µL R3 ilave edildi. 15 s kadar ultrasonik banyoda bekletildi. 1 dk vorteksde karıştırıldı. Örnek 2 mL lik enjektör ile çekilerek alındı ve 0.45 m selüloz filtreden filtrelenerek aktarıldı. LC-MS/MS sistemine 20 µL enjeksiyon yapıldı.

#### 2.2.4. LC-MS/MS Cihaz Parametreleri

HPLC, MS/MS cihaz ve MS/MS tarama parametreleri Çizelge 1, Çizelge 2 ve Çizelge3'de verilmiştir. Çizelge 1. Yemlerde LC-MS/MS ile antibiyotik ve antikoksidostat analizlerinde kullanılan HPLC parametreleri

HPLC PARAMETRELERİ						
Antibiyotikler	Zaman (dk)	%A	%B	Akış Hızı	Enjeksiyon Hacim	Yıkama Solventi
Kloramfenikol	0	70	30	0.2 mL/dk	50 µL	80:20 metanol:su (h/h)
	1	70	30			
	1.01	0	100			
	5	0	100			
	5.1	70	30			
	9	70	30			
A.Koksidiostat	0	70	30	0.5 mL/dk	10 µL	80:20 metanol:su (h/h)
	2	70	30			
	5.30	0	100			
	9.30	0	100			
	9.31	70	30			
	15	70	30			
Tetrasiklin	0	100	0	0.5 mL/dk	20 µL	80:20 metanol:su (h/h)
	3.55	100	0			
	4	15	85			
	6.50	15	85			
	7	0	0			
	10	0	0			

Çizelge 2. Yemlerde LC-MS/MS ile antibiyotik ve antikoksidostat analizlerinde kullanılan MS/MS Cihaz Parametreleri

Parametre	MS/MS CİHAZ PARAMETRELERİ		
	Kloramfenikol	Antikoksidostat	Tetrasiklin
Ionization mode	ESI -VE	ESI (+), ESI (-)	ESI +
API Nebulizing gas pressure	50psi	55 psi	50 psi
Drying gas temperature	400 C	250 °C	300 °C
Drying gas pressure	35 psi	32 psi	32 psi
Scan Time	0.4sec	0.90 sec	0.3 sec
SIM Width	1.5 amu	1.5 amu	1.5 amu
Needle	-4000V	+ 5000V	+ 5000V
Shield	-400V	+ 600V	+ 600V
Capillary	-55V	30V	60V
Detector	-1600V	+ 1600 V	+ 1600 V
CID gas pressure	2 mTorr	2.0 mTorr	2.25 mTorr
Spray chamber temp	60 C	65°C	60 °C
Mass peak width in amu	1.5	1,5	1,5
Quad 1	1.5	1.5	1.5
Quad 3	1.5	1.5	1.5

Çizelge 3. Yemlerde LC-MS/MS ile antibiyotik ve antikoksidostat analizlerinde kullanılan MS-MS tarama parametreleri

MS-MS TARAMA PARAMETRELERİ					
Analit	Capillary	MS (m/z)	MS/MS (m/z)	Parçalama Enerjisi	İyon tarama süresi (s)
<b>Kloramfenikol</b>					
Kloramfenikol	-55	321	151.6	16	0.1
Kloramfenikol D5	-55	326	261.6	11	0.1
<b>Antikoksidostat</b>					
Nicarbazin (-)	300,7	136,6	-30 V	10	0,15
Lasalocid A (-)	589	234.6	-30 V	35	0,15
Monensin	693	675	30 V	35	0,1
Salinomisin	773	431	30 V	45	0,1
Narasin	787	431	30 V	45	0,1
Semduramisin	890	629	30 V	25	0,1
Maduromisin	939	877	30 V	20	0,1
<b>Tetrasiklin</b>					
Tetrasiklin ve epimeri (TC)	444.4	60	445.00	410.00	-15
Doksisiklin (DC)	444.4	60	445.00	428.00	-15
Oksitetrasiklin ve epimeri (OTC)	460.4	60	461.00	426.00	-15
Klortetrasiklin ve epimeri (CTC)	478.9	60	479.00	444.00	-20

### 2.2.5. Metod Validasyon Parametreleri

Bu metodun validasyon yapılırken lineer ölçüm aralığı, tayin limiti /ölçüm limiti, kesinlik, geri kazanım, CC $\alpha$ , CC $\beta$ , spesifiklik/seçicilik, birleşik belirsizlik kriterleri incelenmiştir.

#### 2.2.5.1. Lineer Ölçüm Aralığı

Lineer ölçüm aralığını test etmek için 4 farklı konsantrasyonda 6'şar tekrarlı standart hazırlanarak enjeksiyon yapıldı. Elde edilen ve ölçüm aralığının belirlenmesinde kullanılan sonuçlar Çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. Antibiyotik ve antikoksidostat gruplarına ait lineer ölçüm aralıkları ve R<sup>2</sup> değerleri

<b>LİNEER ÖLÇÜM ARALIĞI DEĞERLERİ</b>					
<b>Kloramfenikol</b>					
	Lineer Ölçüm Aralığı (µg/L)				(R <sup>2</sup> )
Kloramfenikol	0,5	1	1,5	2	0,9968
<b>Tetrasiklin</b>					
	Lineer Ölçüm Aralığı (µg/L)				(R <sup>2</sup> )
Doksisiklin	50	100	150	200	0,9905
Klortetrasiklin	50	100	150	200	0,9944
Oksitetrasiklin	50	100	150	200	0,9982
Tetrasiklin	50	100	150	200	0,9986
<b>Antikoksidostat</b>					
	Lineer Ölçüm Aralığı (µg/L)				(R <sup>2</sup> )
Lasalocid A	100	200	300	400	0,9986
Maduromisin	100	200	300	400	0,9986
Monensin	100	200	300	400	0,9967
Narasin	100	200	300	400	0,9984
Nicarbazin	100	200	300	400	0,9982
Salinomisin	100	200	300	400	0,9995
Semduramisin	100	200	300	400	0,9950

### 2.2.5.2. Tayin Limiti / Ölçüm limiti

Lineer ölçüm aralığında oluşturulan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerleri Çizelge 5'te yer almaktadır.

$$\text{Tayin Limiti} = 3,3 \cdot \text{SD}/m$$

$$\text{Ölçüm Limiti} = 10 \cdot \text{SD}/m$$

SD = Kalibrasyon eğrisinin en düşük seviyesindeki standart hata

m = Kalibrasyon eğrisinin eğimi

Çizelge 5. Antibiyotiklere ve antikoksidostatlara ait tayin limiti ve ölçüm limiti değerler

<b>TAYİN/ ÖLÇÜM LİMİTİ DEĞERLERİ</b>		
	<b>LOD</b> (µg/kg)	<b>LOQ</b> (µg/kg)
<b>Kloramfenikol</b>		
Kloramfenikol	0,046	0,138
<b>Tetrasiklin</b>		
Doksisiklin	4,770	14,454
Klortetrasiklin	8,804	26,680
Oksitetrasiklin	10,147	30,748
Tetrasiklin	9,040	27,393
<b>Antikoksidostat</b>		
Lasalocid A	12,34	37,40
Maduromisin	15,51	47,01
Monensin	18,56	56,24
Narasin	14,77	44,76
Nicarbazin	26,36	79,89
Salinomisin	11,48	34,79
Semduramisin	34,84	105,58

### 2.2.5.3.Kesinlik

#### 2.2.5.3.1.Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışması üç farklı seviyede spike edilmiş örnekle, her seviye için 6 tekrar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6. Tekrar edilebilirlik çalışmasında elde edilen overall mean, overall SD ve overall CV değerleri

TEKRARLANABİLİRLİK DEĞERLERİ									
Kloramfenikol									
Konsantrasyon µg/kg	1	1,5	2	1	1,5	2	1	1,5	2
	Overall Mean			Overall SD			Overall CV		
Kloramfenikol	0,98	1,49	2,01	0,08	0,10	0,19	8	7	9,4
Tetrasiklin									
Konsantrasyon µg/kg	100	150	200	100	150	200	100	150	200
	Overall Mean			Overall SD			Overall CV		
Doksisiklin	95.94	145.48	198.40	7.29	12.48	12.69	7.6	8.6	6.4
Klortetrasiklin	99.22	149.30	199.16	8.22	12.01	12.68	8.3	8.0	6.4
Oksitetrasiklin	96.41	147.69	201.98	6.07	12.83	13.08	6.3	8.7	6.5
Tetrasiklin	99.11	145.44	206.89	6.05	14.65	16.19	6.1	10.1	7.8
Antikoksiostat									
Konsantrasyon µg/kg	200	300	400	200	300	400	200	300	400
	Overall Mean			Overall SD			Overall CV		
Lasalocid A	208.49	312.95	394.18	19.14	20.08	25.98	9.2	6.4	6.6
Maduromisin	215.88	312.43	407.61	18.58	25.14	32.30	8.6	8.0	7.9
Monensin	186.83	301.18	402.65	19.16	19.51	32.63	10.3	6.5	8.1
Narasin	197.72	318.09	396.56	21.69	26.19	25.90	11.0	8.2	6.5
Nicarbazin	206.15	295.35	393.94	18.11	35.09	25.63	8.8	11.9	6.5
Salinomisin	186.84	306.16	396.15	21.22	22.45	31.45	11.4	7.3	7.9
Semduramisin	225.28	317.73	385.22	29.42	36.85	27.75	13.1	11.6	7.2

#### 2.2.5.3.2.Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik çalışması 1 ppb (µg/kg) seviyesinde spike edilmiş örnekle 5 paralel olacak şekilde, 2 ayrı kişi tarafından 4 ayrı günde gerçekleştirilen 5 farklı çalışmadan oluşturulmuştur. Tekrar üretilebilirlik sonuçları Çizelge 7'de verilmiştir.

Çizelge 7. Tekrar üretilebilirlik çalışmasında elde edilen overall mean, overall SD ve overall CV değerleri

TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİK DEĞERLERİ			
Kloramfenikol			
Konsantrasyon	Overall Mean	Overall SD	Overall CV
1 µg/kg			
Kloramfenikol	1,03	0,05	4,6
Tetrasiklin			
Konsantrasyon	Overall Mean	Overall SD	Overall CV
100 µg/kg			
Doksisiklin	106.45	3.05	2.9
Klortetrasiklin	106.68	6.89	6.5
Oksitetrasiklin	106.98	4.99	4.7
Tetrasiklin	110.17	7.23	6.6
Antikoksiostat			
Konsantrasyon	Overall Mean	Overall SD	Overall CV
200 µg/kg			
Lasalocid A	210.36	14.06	6.7
Maduromisin	213.29	22.06	10.3
Monensin	202.97	14.94	7.4
Narasin	214.35	20.25	9.4
Nicarbazin	218.41	12.36	5.7
Salinomisin	196.43	16.08	8.2
Semduramisin	202.29	20.85	10.3



#### 2.2.5.4. Geri kazanım

Geri kazanım çalışması üç farklı seviyede spike edilmiş örnekle, her seviye için 6 tekrar yapılarak 3 farklı günde gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım sonuçları Çizelge 8'de verilmiştir. Geri kazanım her seviye için hazırlanan matriks standart kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır.

Çizelge 8. Geri kazanım çalışmasında 3 farklı konsantrasyon da elde edilen % geri kazanım değerleri

<b>GERİ KAZANIM DEĞERLERİ</b>			
<b>Kloramfenikol</b>			
Konsantrasyon µg/kg	1	1,5	2
(% Geri Kazanım)			
Kloramfenikol	87.4	92.5	95.4
<b>Tetrasiklin</b>			
Konsantrasyon µg/kg	100	150	200
(% Geri Kazanım)			
Doksisiklin	79.2	86.2	82.6
Klortetrasiklin	78.8	84.0	84.7
Oksitetrasiklin	85.1	90.2	91.9
Tetrasiklin	83.8	85.8	87.7
<b>Antikoksidostat</b>			
Konsantrasyon µg/kg	200	300	400
(% Geri Kazanım)			
Lasalocid A	66.2	71.4	70.8
Maduromisin	96.2	90.8	86.8
Monensin	78.3	80.9	80.7
Narasin	86.7	87.8	82.5
Nicarbazin	67.9	67.9	77.3
Salinomisin	83.8	85.3	82.1
Semduramisin	84.0	77.1	80.4

#### 2.2.5.5. CC $\alpha$ , CC $\beta$

Bu amaçla en düşük konsantrasyon seviyesinde farklı günlerde spike yapılmış 25 ayrı çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçları Çizelge 9'da verilmiştir.

Çizelge 9. Antibiyotiklere ve antikoksidostatlara ait CC $\alpha$  ve CC $\beta$  değerleri

<b>CC<math>\alpha</math> ve CC<math>\beta</math> DEĞERLERİ</b>		
<b>Kloramfenikol</b>		
	CC $\alpha$ µg/kg	CC $\beta$ µg/kg
Kloramfenikol	1.11	1.19
<b>Tetrasiklin</b>		
	CC $\alpha$ µg/kg	CC $\beta$ µg/kg
Doksisiklin	105.00	110.00
Klortetrasiklin	111.31	122.61
Oksitetrasiklin	108.19	116.38
Tetrasiklin	111.86	123.73
<b>Antikoksidostat</b>		
	CC $\alpha$ µg/kg	CC $\beta$ µg/kg
Lasalocid A	223.06	246.12
Maduromisin	236.17	272.35
Monensin	228.78	257.56
Narasin	234.96	269.92
Nicarbazin	226.92	253.84
Salinomisin	229.32	258.63
Semduramisin	234.19	268.38

### 2.2.5.6. Spesifiklik/Seçicilik

Spesifiklik için antibiyotik içermediği bilinen farklı yem örnekleri analiz edilerek piklerin çıkış zamanlarında herhangi bir sapma ve etkileşim olup olmadığına bakıldı. Sonuçta herhangi bir etkileşim gözlenmedi. Bu numuneler validasyon çalışmalarında kullanıldı ve tamamına yükleme yapılarak Kloramfenikol, Tetrasiklin ve Antikoksidiostat bileşiklerinin tanımlandığı görüldü.

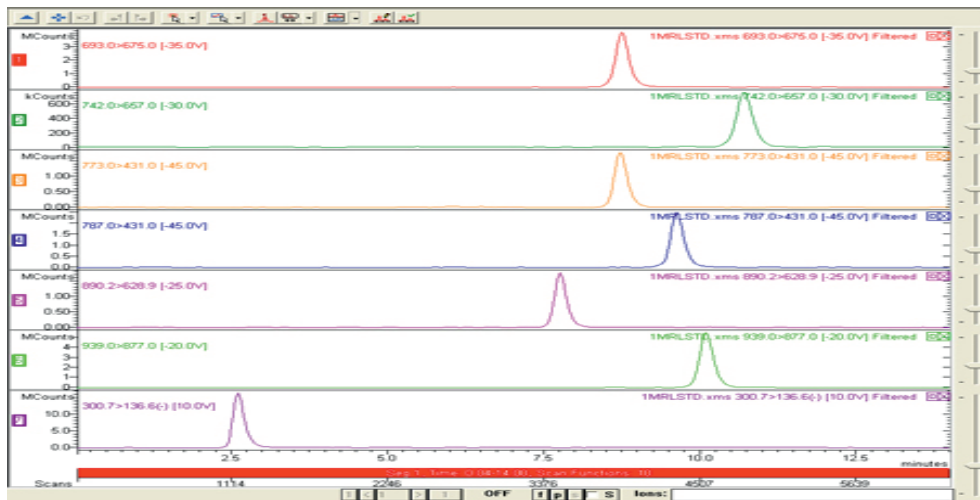
### 2.2.5.7. Birleşik Belirsizlik

Çizelge 10. Belirsizlik bileşenleri ile hesaplanan birleşik belirsizlik tablosu

BİREŞİK BELİRSİZLİK									
Etken madde	Standart hazırlama belirsizliği	Numune hazırlama belirsizliği	Kalibrasyon eğrisi belirsizliği	Tekrarlanabilirlik belirsizliği	Geri kazanım belirsizliği	Birleşik Rölatif belirsizliği	MRPL	Birleşik Belirsizlik	Genişletilmiş bel. (k=2)
<b>Kloramfenikol</b>									
Kloramfenikol	0.026	0.027	0.059	0.050	0.090	0.125	0.300	0.037	0.075
<b>Antikoksidiostat</b>									
Lasalocid A	0.0104	0.019	0.039	0.070	0.053	0.099	200	19.827	39.654
Monensin	0.0100	0.019	0.059	0.075	0.028	0.101	200	20.298	40.596
Narasin	0.0099	0.019	0.041	0.101	0.040	0.118	200	23.637	47.273
Salinomisin	0.0100	0.019	0.023	0.080	0.037	0.094	200	18.800	37.599
Maduromisin	0.0101	0.000	0.039	0.110	0.033	0.122	200	24.383	48.766
Semduramisin	0.0100	0.000	0.074	0.104	0.064	0.143	200	28.633	57.265
Nikarbazin	0.0000	0.000	0.045	0.062	0.071	0.104	200	20.798	41.596
<b>Tetrasiklin</b>									
Tetrasiklin	0.0142	0.008	0.039	0.072	0.059	0.102	100	10.245	20.489
Doksisiklin	0.0142	0.008	0.101	0.031	0.068	0.127	100	12.700	25.400
Oksitetrasiklin	0.0142	0.008	0.044	0.050	0.058	0.090	100	8.959	17.917
Klortetrasiklin	0.0141	0.008	0.078	0.069	0.075	0.129	100	12.880	25.760

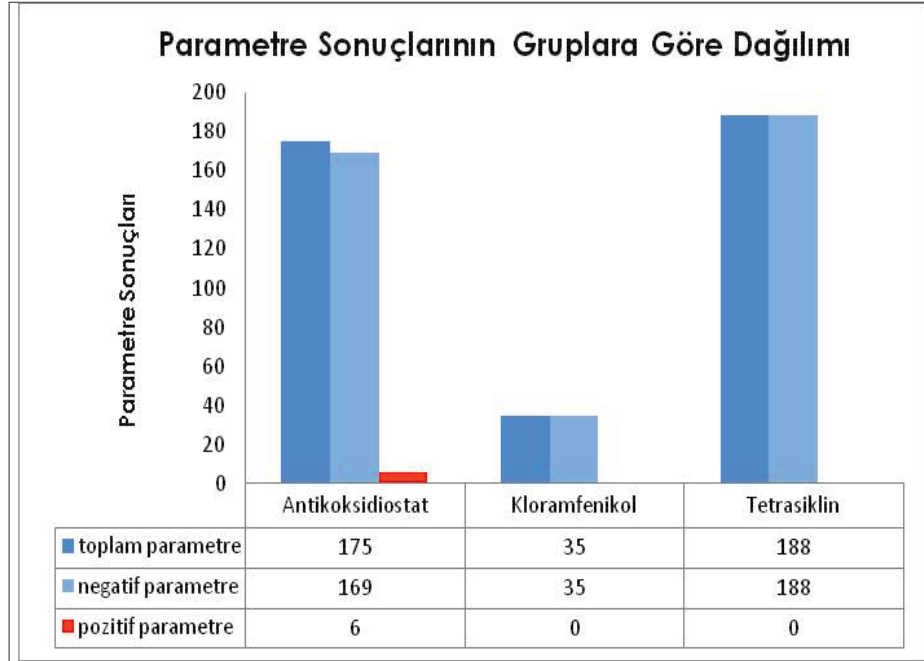
## 3. BULGULAR

Güney Marmara Bölgesinde satışa sunulmuş hayvansal yemlerde (sığır besi yemi, piliç besi yemi, sığır süt yemi) tetrasiklin, kloramfenikol ve antikoksidiostat, standartları (Şekil 1) kullanılarak kalibrasyon grafikleri elde edilmiş ve toplamda 107 adet numunede 12 parametreye bakılarak 398 analiz

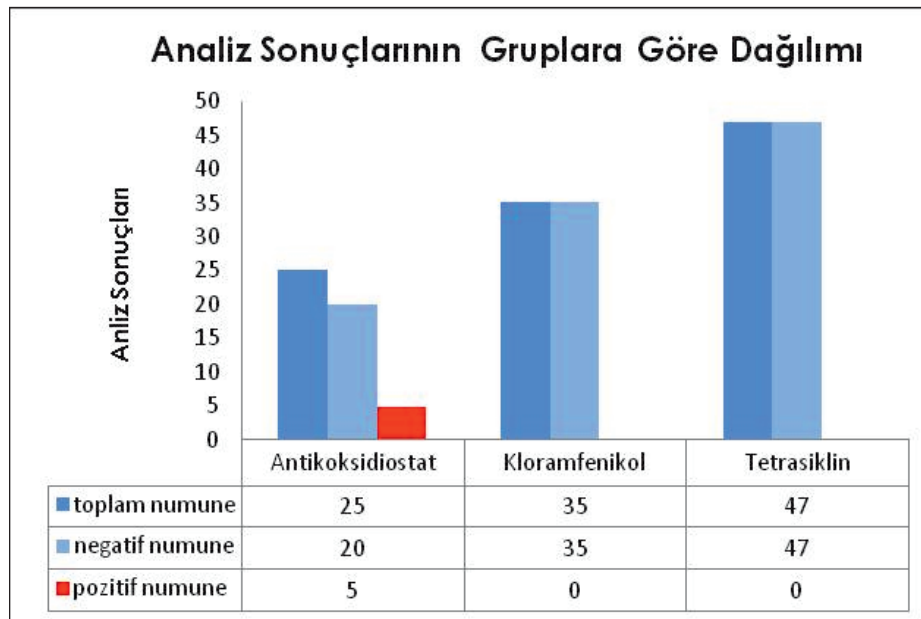


Şekil 1: Antikoksidiostatların LC-MS/MS'de kromotogram görüntüsü.

gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). 107 adet numunenin 5 adedin de pozitif sonuç elde edilmiştir (Şekil 3). Pozitif sonuçlar antikoksidostat grubuna ait monensin, lasolosit A ve salinomisin alt gruplarında gözlenmiştir (Şekil 4), (Şekil 5).

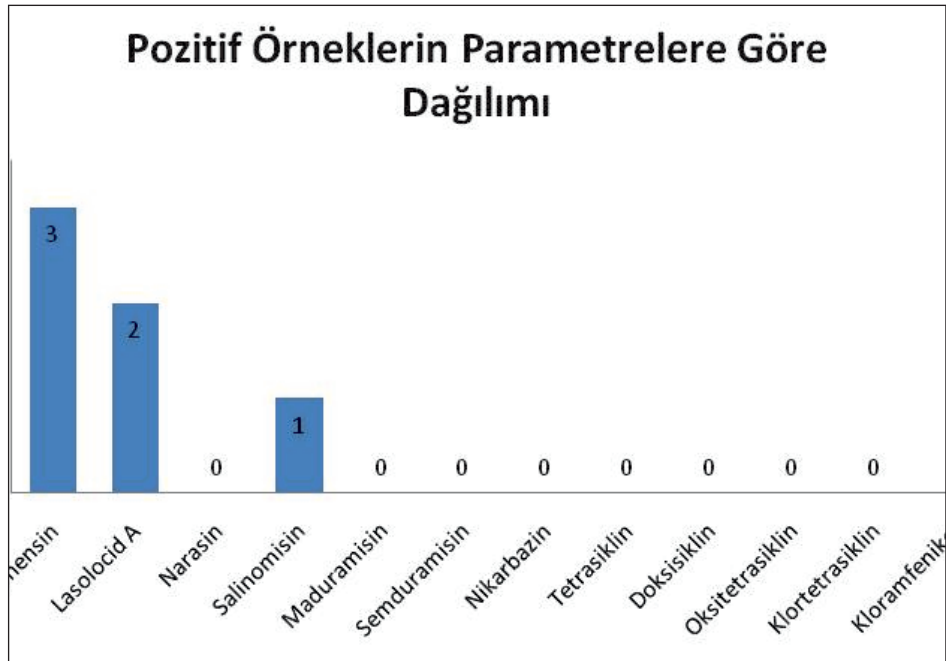


Şekil 2: Analizi yapılan örneklerin gruplara göre parametre sayısının dağılımı

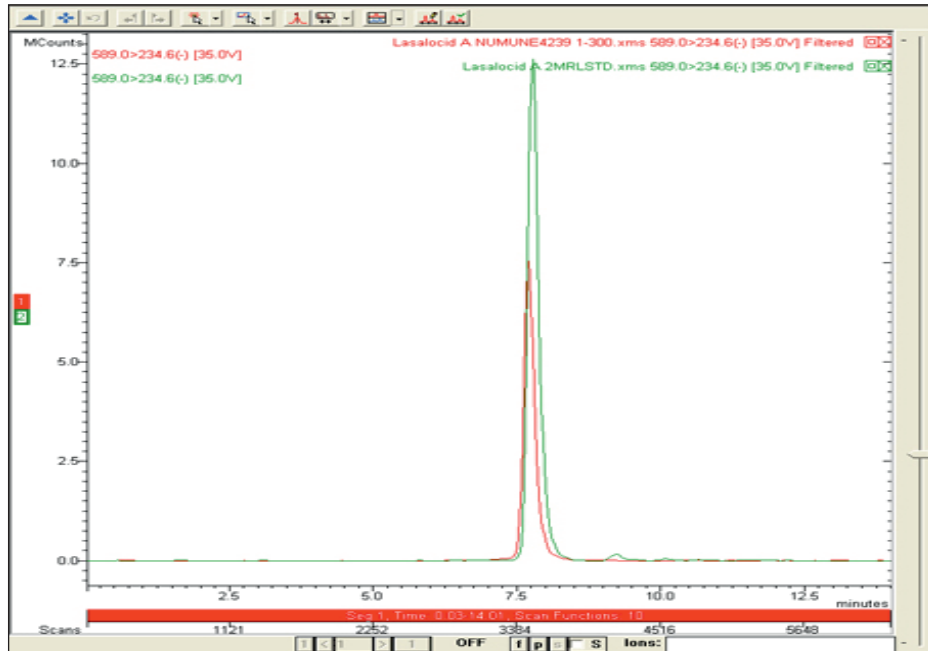


Şekil 3: Analizi yapılan örneklerin gruplara göre sonuçlarının dağılımı

Şekil 4: Analizi yapılan örneklerin gruplara göre pozitif sonuçlarının dağılımı.



Şekil 5. Pozitif çıkan Lasalocid A antikoksidiosdatının kromotogram görüntüsü



#### 4. SONUÇ

Numunelerin % 4,67'sinde antikoksidiosat etken maddelerinin kullanıldığı, % 95,33'ünde ise kloramfenikol, tetrasiklin ve diğer antikoksidiosat etken maddelerine rastlanmadığı gözlenmiştir. Analizi yapılan parametre bazında incelendiğinde %1,58'nde etken maddeye rastlanmıştır. Bu sonuçlar ışığında

bakılırsa Güney Marmara Bölgesinde satışa sunulmuş olan hayvansal yemlerde kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotiği açısından bir risk olmadığı, antikoksidostat açısından ise % 4,67 gibi bir düzeyde riskin olduğu gözlenmiştir. Bu durum; daha çok kanatlı yetiştiriciliğinde kullanılan yemlerde rastlanması açısından bakıldığından büyük baş yetiştiriciliği için kullanılan yemlerde risk olmadığı, kanatlı yetiştiriciliği için kullanılan yemlerde ise risk oluşturduğu görülmüştür. Kanatlı yemdeki bu riskin nedeni, ya yem üretiminde kullanılan yem katkı maddeleri ya da direkt olarak bu etken maddeleri yeme katılması ile olmuş olabilir. Yem ham maddelerinin kontaminasyon riskleri de unutulmamalıdır. Bu açıdan bakıldığında yem rasyonları hazırlanırken çok dikkat edilmeli, menşeyi bilinmeyen hem ham madde hem de katkı maddeleri kullanılmamalıdır. Kontaminasyon ve hammaddeden kaynaklanan üretici maduriyetlerinin önüne geçmek için üretici firmaların kendi içlerinde kalite kontrol mekanizmaları geliştirmeleri gerekmektedir. Bir işletme için ideal olan uygulama ham madde ve katkı maddelerinin rasyonda kullanılmadan önce analizlerinin yapılması ve ondan sonra üretime geçilmesidir.

## 5. KAYNAKLAR

- Aynagöz, Z. 1993. Hormon ve benzeri maddelerin Hayvan Beslemede kullanılması, *Doktora Semineri*. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Swick, R.A., 2005. Ingredient supply and global demand beyond 2010. *Feed Tech*, 9(7) s. 28-31.
- Anon, 2002. Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Teblig. Tarım ve Köyisleri Bakanlığından. 18 Aralık 2002. Sayı: 24967. Teblig No: 2002/66 Resmi Gazete.
- Anon, 2005. Karma Yemlere Katılması ve Hayvanlara Yedirilmesi Yasak Olan Maddeler Hakkında Teblig. Tarım ve Köyisleri Bakanlığından. 16 Haziran 2005. Sayı:25847 Teblig No:2005/24. Resmi Gazete.
- Anon, 2006. Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, ithalatı, ihracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebligde Değişiklik Yapılmasına Dair Teblig. Tarım ve Köyisleri Bakanlığından. 21 Ocak 2006. Sayı: 26056 Teblig No: 2006/1 Resmi Gazete.
- Jensen, B.B., 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *Journal Animal Feed Science* 7, s.45–64.
- Çoskun, B., Seker, E., İnal, F., 1998. *Yemler ve Teknolojisi*. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya.
- Küçükersan, K., 1999. Yem katkı maddeleri. *Ders Notları*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi.
- Paganini, F., 2005. Controlling coccidiosis in drug-free production. Facing the challenge of Drug – free production. *World Poultry*, 12(21). Advertorial.
- Ziggers, D., 2002. Growth promoting antibiotics finished in the EU. *Feed Tech*, 6(3) s.8-9.
- Anon, 2003. EU prohibits antibiotics as growth promoters. *Feed Tech*, 7(7) s. 6.