



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**FARKLI ISI UYGULAMALARININ SÜTTEKİ BAZI
MAKROSİKLİK LAKTON YAPILI ANTİPARAZİTER İLAÇ
KALINTILARINA ETKİSİ**

Burcu AVCI

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ**

2019- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ISI UYGULAMALARININ SÜTTEKİ BAZI
MAKROSİKLİK LAKTON YAPILI ANTİPARAZİTER İLAÇ
KALINTILARINA ETKİSİ

Burcu AVCI

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ

2019- ANKARA

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Farklı Isı Uygulamalarının Sütteki Bazı Makrosiklik Lakton Yapılı Antiparaziter İlaç Kalıntılarına Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Burcu AVCI

Tarih: 16.01.2019

İmza

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında Burcu AVCI tarafından hazırlanan “Farklı Isı Uygulamalarının Sütteki Bazı Makrosiklik Lakton Yapılı Antiparaziter İlaç Kalıntılarına Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16.01.2019



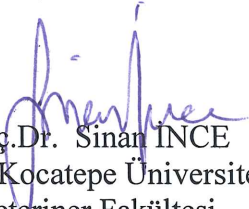
Prof.Dr. Ayhan FİLAZİ
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı
(Danışman)



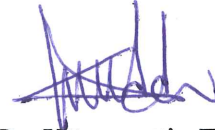
Prof.Dr.U.Tansel ŞİRELİ
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim
Dalı



Doç .Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim
Dalı



Doç.Dr. Sinan İNCE
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim
Dalı



Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ
Kırıkkale Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim
Dalı
(Raportör)

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof.Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Hayvanlarda Kullanılan Makrosiklik Yapılı Antiparaziter İlaçlar	2
1.3. Sütlerde İlaç Kalıntısı Bulunmasının Nedenleri	2
1.4. Sütlerde İlaç Kalıntısı Bulunmasının Sakıncaları	3
1.5.Sütlerdeki Antiparaziter Kalıntılarının Kontrolü	4
1.6.Çalışmanın Amacı ve Önemi	6
2. GEREÇ VE YÖNTEM	9
2.1. Standart Maddeler ve Kimyasallar	9
2.2. Araçlar ve Cihaz	9
2.3. Standartların Hazırlanması	10
2.4. Çözeltilerin Hazırlanması	10
2.5. Çalışma Planı ve Örneklerin Hazırlanması	10
2.5.1.Isının Sütteki Makrosiklik Lakton Yapılı Antiparaziterlere Etkisinin Belirlenmesi	11
2.5.2.Kalıntıların Süt Kremasına Geçiş Düzeyinin Belirlenmesi	12
2.6. Analitik Yöntem	12
2.7. Kullanılan Cihaz ve Çalışma Koşulları	13
2.8. Yöntemin Geçerli Kılınması İçin Spike Numunelerin Hazırlanması	13
2.9. Yöntemin Geçerli Kılınması	14
2.10. İstatistik	15
3. BULGULAR	16
3.1.Yöntemin Geçerli Kılınması	16
3.2.Isıl İşlemin İnek Sütündeki Makrosiklik Lakton Kalıntılarının Stabilitesi Üzerine Etkisi	20
4. TARTIŞMA	23
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
ÖZET	31
SUMMARY	32
KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	38

ÖNSÖZ

Farklı ısı uygulamalarının sütteki bazı makrosiklik lakton yapılı antiparaziter ilaç kalıntılarına etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, doktora öğrenimim süresince bana yön veren, yol gösteren, motivasyonumun düştüğü zamanlarda ilham veren, her türlü yardımı benden esirgemeyen Danışman Hocam Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarımda benden manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım süresince, laboratuvardan verimli bir şekilde faydalanmamı sağlayan Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ender YARSAN'a, doktora öğrenimim boyunca eğitimimde bana yardımcı olan Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı hocalarıma, Doç.Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN'e, benden yardım ve desteğini esirgemeyen Araştırma Görevlisi Sedat SEVİN'e, laboratuvar çalışmaları sırasında bana yol gösteren Kimyager Süreyya KARAASLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Kalıntı İzleme Laboratuvarında aldığım “*Avermektin Grubu İlaçların Analizi*” eğitimi ile tezimde yaptığım analizleri daha sağlıklı yorumlamamı sağlayan Enstitüdeki meslektaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
USFDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
dk	Dakika
kg	Kilogram
LOD	Limit of Detection (Ölçüm Limiti)
LOQ	Limit of Quantification (Tespit Limiti)
L	Litre
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
RSD	Nisbi Standart Sapma
sn	Saniye
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometri Sistemi
NaCl	Sodyum Klorür
TOB	Tarım ve Orman Bakanlığı
TEA	Trietilamin
UHT	Ultra High Temperature - Ultra Yüksek Isı

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.	İvermektin Kromotogramı	17
Şekil 3.2.	Moksidektin Kromotogramı	17
Şekil 3.3.	Eprinomektin Kromotogramı	18
Şekil 3.4.	Doramektin Kromotogramı	18
Şekil 3.5.	Abamektin Kromotogramı	19



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Süte Katılan Makrosiklik lakton türevi antiparaziterler ve miktarları	11
Çizelge 3.1. Makrosiklik lakton yapıli bileşikler için sıvı kromatografisi sıralı kütle spektrometresinde belirlenen çalışma parametreleri	16
Çizelge 3.2. Yöntemin geçerli kılınması verilerinin özeti	19
Çizelge 3.3. Isıl İşlemin İnek Sütündeki Makrosiklik Lakton Kalıntılarının Stabilitesi Üzerine Etkisi ve kremadaki dağılımı	21

1.GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Hızla artan dünya nüfusunun yeterince beslenebilmesi, sağlıklı beslenme ve dengeli gıda tüketimi sonucunda bedensel ve ruhsal yönden daha sağlıklı nesillerin yetişmesi için ciddi çabalar gösterilmektedir. Bu nedenle gıda değeri olan hayvanlarda korunma veya tedavi amaçlı kullanılan ilaçların sayısı ve potansiyel kullanımı devamlı gelişmektedir (Filazi, 2012). Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığına bağlı Gıda Güvenliği ve Gözlem Servisi (FSIS), tamamı veteriner ilacı olmamakla birlikte hayvansal gıda üretiminde yaklaşık 400 farklı maddenin kullanıldığını belirtmektedir (Botsoglou ve Fleutouris, 2001). Gıda değeri olan hayvanlarda veteriner ilaç ve yetiştiricilik ürünlerinin kullanımı devam ettikçe bu hayvanlardan elde edilen et, süt ve yumurta gibi hayvansal ürünlerin kimyasal madde kalıntılarıyla kirlenmesi de bir sorun olarak güncelliğini koruyacaktır. Bu nedenle özellikle gelişmiş ülkeler ulusal ve uluslararası kuruluşlar tarafından bilimsel veriler çerçevesinde belirlenen ürün kriterleriyle, üretim, test, kontrol, örnekleme ve istatistik yöntemler gibi kurallar çerçevesinde gıda kontrol sistemlerini kurdukları gibi, ithalat yapacakları ülkelere de bu kurallara uygun bir gıda kontrol sisteminin bulunması koşulunu aramaktadırlar. Böylece etkin bir gıda kontrol sisteminin kurulması, tüketici ve toplum sağlığının korunması yanında ekonomik açıdan da önem taşımaktadır (Kaya ve ark., 1992; Kaya ve Unsal., 2013).

Hayvanlarda başlıca mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonlar nedeniyle hayvanları hastalıklara karşı korumak, tedavisini sağlamak veya yemden yararlanmayı artırmak için büyütme faktörü olarak ve üretimi artırmak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılan başta antibiyotikler olmak üzere kemoterapötiklerin kalıntılarına en sık rastlanan grup olduğu bildirilmiştir (Gustafson ve Bowen, 1997). Hayvansal gıdalarda bulunabilen özellikle antimikrobiyal ilaç kalıntıları başlıca süt ve peynir gibi fermente süt ürünlerinin işlenmesini önemli bir şekilde

etkileyebilmekte ve endüstrinin ekonomik kaybına yol açabilmektedir (Cogan, 1972). Bunun dışında parazitlerin kontrolü için de antiparaziter kullanımının yaygın olduğu bildirilmiştir (McKellar ve Benchaoui 1996). Özellikle süt veren hayvanlardaki antelmentik uygulamasının süt verimini önemli bir düzeyde artırdığına yönelik araştırmalar bulunmaktadır (Fthenakis ve ark., 2000; Nødtvedt ve ark., 2002).

1.2. Hayvanlarda Kullanılan Makrosiklik Lakton Yapılı Antiparaziter İlaçlar

Antiparaziter olarak makrosiklik laktonların hem iç hem de dış parazitlere etkili olması nedeniyle hayvan yetiştiriciliğinde parazitlerin kontrolü amacıyla oldukça fazla tercih edilen ilaçlar olduğu bildirilmiştir. Makrosiklik laktonlar (avermektinler ve milbemisinerler), Streptomyces cinsine ait toprak mikroorganizmalarının kimyasal türevleri ve ürünleridir. Günümüzde ticari olarak kullanılan avermektinlerin ivermektin, abamektin, doramektin, eprinomektin ve selamektin, milbemisinerlerin ise milbemisiner oksim ile moksidektin olduğu bildirilmiştir. Makrosiklik laktonların düşük doz düzeylerinde bile güçlü ve geniş antiparazitik spektruma sahip oldukları gösterilmiştir. Birçok olgunlaşmamış nematodlar (hipobiotik larvalar dahil) ve artropodlara karşı etkili olabilirler. Bu bileşiklerle ilgili yayınlanmış bilimsel çalışmalarda değişik konakçılarda bulunabilen 300'den fazla iç ve dış parazite karşı etkili olabilecekleri belirtilmektedir. Ayrıca herhangi bir bileşiğin tek bir tedavi dozunun bile uygulandıktan sonra vücutta uzun süre boyunca yeni nematod enfeksiyonlarına karşı etkili olabilecek konsantrasyonlarda kalabileceği ifade edilmiştir (Kaya, 2013).

1.3. Sütlerde İlaç Kalıntısı Bulunmasının Nedenleri

Et ve süt gibi hayvansal gıdalarda yapılan uygulama yanlışlıklarından kaynaklanan ve ilaçlarda kalıntıya neden olan birçok etken bulunduğu bildirilmiştir.

Bunlar şu şekilde özetlenebilir (Kaya ve nsal, 2007; WHO, 1999; Yarsan ve Kaya, 2005);

- İlacın yüksek dozda ve sürede kullanılması,
- Her ilacın formülasyonuna ve uygulama şekline göre değişen ilaç kalıntı arınma süresine uyulmaması,
- Gıda değeri olan hayvanlarda kullanılmasına izin verilmeyen ilaçların kullanılması,
- İlacın kullanma talimatına veya veteriner hekimin önerilerine uyulmaması,
- Yanlış ilaç uygulama şekli, müstahzar veya formülasyonun seçilip kullanılması,
- Yemlerde karıştırma hataları ve ilacın homojen bir şekilde karışmaması nedeniyle ilacın yemin bir bölümünde daha fazla bulunması ve bu tür yemlerin hayvanlara uzun süre yedirilmesi.

1.4.Sütlerde İlaç Kalıntısı Bulunmasının Sakıncaları

Hayvanlarda performansın artırılması ve hastalıkların kontrolü, tedavisi ve önlenmesi amacıyla ilaçların ve diğer kimyasal maddelerin kullanılması söz konusu olabilir. Bu durumda hayvanların yenilebilir dokularında ve bunlardan elde edilen ürünlerde (bal, yumurta, et, süt vb.) kimyasal maddelerin kalıntılarına rastlanması olasılığı bulunmaktadır. Kalıntı, Avrupa Birliği (AB) ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Gıda ve İlaç İdaresi (USFDA) tarafından veteriner tıbbi ürün uygulanan hayvanlardan elde edilen gıda maddelerinde kalan farmakolojik olarak etkin maddeler (etkin maddelerin kendisi veya parçalanma ürünleri) ve onların metabolitleri şeklinde tanımlanmıştır (Beyene, 2016; WHO 1988). Türkiye'deki mevzuatta ise kalıntı *“hayvansal birincil ürünlere geçen ve halk sağlığına zararlı olabilecek farmakolojik tesire sahip maddelerin, onların metabolitlerinin veya diğer maddelerin kalıntısını ifade eder”* şeklinde tanımlanmaktadır (Anon, 2011).

Hayvansal gıdalardaki kalıntıların, bunları tüketen insanlarda hafıf alerjiden başlayarak farklı doku ve organlarda hasara ve anafilaktik çok ile başlayan ve lme

kadar değişen şiddette etkilere yol açabilecekleri bildirilmiştir. Bununla birlikte cinsiyet özelliklerinde ve davranışlarda değişimlere, üremede bozukluklara, yoğurt, peynir ve sucuk imalatı başta olmak üzere gıda endüstrisinde üretim hatalarının meydana gelmesine, tüketicilerin sindirim sistemindeki bakteri florasının değişikliğe uğramasına neden olabilecekleri kabul edilmektedir (Bilici, 2008; Doyran, 2000). Beklenmeyen ve istenmeyen bu etki ve durumlara maruz kalmamak için gıdalardaki ilaç ve kimyasal madde kalıntılarını ve seviyelerini tespit edebilecek son derece duyarlı, güvenilir ve tekrarlanabilir analiz yöntemleri geliştirilmiştir (WHO, 2005). Türkiye’deki Tarım ve Orman Bakanlığı, ABD’deki Gıda ve İlaç İdaresi ile Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım rgt, Dünya Sağlık rgt, Avrupa Birliği gibi kuruluşlar tüketicici sağlığını korumak amacıyla mevzuat veya standartlarında farklı düzenlemeler yapmışlardır. Böylece ilaç birikimlerinin neden olabilecekleri ekonomik ve sosyal yönlü olumsuzlukların önüne geçilmesi için veteriner ilaçlarının kullanımında etkili bir denetimin ve kontrolün sağlanması amaçlamaktadırlar (Gökçen ve Atalay, 2012; Güvenç, 2008; Kaya ve nsal, 2007).

Tez konusunu ilgilendiren bileşiklerden ivermektin’in memelilerde kan-beyin engelini zor geçmesi nedeniyle sağaltım indeksinin oldukça geniş olduğu belirtilmektedir. Bununla beraber Collie ırkı köpeklerde kan beyin engelindeki genetik noksanlık nedeniyle ilacın beyne girişi engellenemediği için bu ırk köpekler ilaca duyarlıdır. Benzeri duyarlılık Murray Gray ırkı sığırlar için de geçerlidir. Abamektin ile doz aşımında ise ataksi, parezis, yere uzanma, göz kapağı ve dilin tonusunda azalma, pupillerde genişleme, koma ve ölüm oluşur (Kaya, 2013).

1.5. Sütlerdeki Antiparaziter Kalıntılarının Kontrolü

Türkiye’de AB mevzuatına uyum programı çerçevesinde başlayan gıda maddelerindeki kalıntı izleme eylem planları Tarım ve Orman Bakanlığı (TOB) ve bağlı birimleri aracılığıyla yapılmakta ve uygulanmaktadır. Bununla bağlantılı olarak Ulusal Kalıntı İzleme Planı, hayvan türlerine göre tespit edilen madde ve ürün grupları ile söz konusu maddelerin kalıntılarının varlığının tespit edilmesi için

alınacak tedbirleri kapsamaktadır. Söz konusu programların uygulanmasında AB mevzuatı (96/23/EC ve 96/22/EC sayılı Konsey Yönergeleri ve 98/179/EC sayılı Konsey Kararı) ve uyumlaştırılması tamamlanan Türkiye mevzuatı dikkate alınmaktadır. Bu doğrultuda ulusal kalıntı kontrolü “*Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik*” (Anon, 2011) ve bu Yönetmeliğe bağlı “*2013/09 sayılı Canlı Hayvan ve Hayvansal Ürünlerde Kalıntı İzleme Genelgesi*”nde belirtilen kurallara göre hazırlanan Ulusal Kalıntı İzleme Planı çerçevesinde yürütülmektedir. Bu kapsamda sütlerdeki makrosiklik lakton yapılı antiparaziterlerin izlemesi de yapılmaktadır (Anon, 2018a).

Türkiye’de veteriner sağlık ürünlerinin imalatı, ithalatı, ihracatı, pazarlanması ve kontrolünden sorumlu olan Tarım ve Orman Bakanlığının resmi verilerine göre günümüzde gıda değeri olan hayvanlarda kullanılmak üzere izin almış makrosiklik yapılı antiparaziter ilaçlardan 54 ivermektin, 4 eprinomektin, 1 abamektin, 1 doramektin ve 2 moksidektin müstahzarı bulunmaktadır. Makrosiklik laktonların diğer bileşikleri olan selamektin’in sadece kedi ve köpeklerde kullanılmak üzere 2 müstahzarı bulunmakta, milbemis oksim’in ise kedi ve köpeklerde kullanımı için Avrupa ülkelerinde müstahzarı varken Türkiye’de izinli bir müstahzarı bulunmamaktadır (Anon, 2018b). Ayrıca AB mevzuatının uyumlaştırılması ile ülkemizde kabul edilen Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği’ne göre ivermektin, abamektin, doramektin ve enjeksiyonluk moksidektinin insan tüketimi için süt elde edilen sığırlarda kullanılamayacağı belirtilmiştir. Bununla beraber haricen kullanılmaya özgü moksidektin için sütte 40 µg/kg, eprinomektin içinse sütte 20 µg/kg’lık bir maksimum kalıntı limiti (MRL) belirlenmiştir (Anon, 2012). Kodeks Alimentarius komisyonu ise sütteki ivermektin, doramektin ve eprinomektin kalıntıları için sırasıyla 10, 15 ve 20 µg/kg’lık bir tolerans düzeyi belirlemiş, abamektin ve moksidektin içinse herhangi bir değer önerilmemiştir (Codex Alimentarius, 2014).

1.6. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Gelişmiş ülkelerin hemen hepsinde ve gelişmekte olan ülkelerin de önemli bir kısmında olduğu sanılan gıdaların kontrolü ve bazı istenmeyen maddelerin kullanılmasını yasaklayan uygulamalar ve önlemlere rağmen, sütlerde makrosiklik laktonların kalıntılarının bulunabileceği bazı çalışmalarla ortaya konulmuştur (Danaher ve ark., 2006; Furlani ve ark., 2014; Lobato ve ark., 2006). Antiparaziter ilaçların yaygın kullanımı nedeniyle oluşan kalıntılar gerek insan sağlığı ve gerekse endüstri için önemli bir riski de beraberinde getirmiştir. Bilgilerimize göre Türkiye’de kalıntılarının varlığına yönelik herhangi bir araştırmaya rastlanmamasına rağmen, diğer ülkelerde sütlerde bulunan kalıntılara bakıldığında makrosiklik lakton yapılı antiparaziterlerden abamektin, doramektin, ivermektin ile moksidektinin oldukça yaygın bir şekilde kullanıldığı görülmektedir (Souza ve ark., 2011). Türkiye’de ise ruhsatlı müstahzarlardan da görüleceği gibi en fazla ivermektinin kullanıldığı anlaşılmaktadır. Yapılan çalışmalar, yararlarına rağmen bu kimyasalların yavaş bir şekilde sığır vücudundan atıldıklarını (Danaher ve ark., 2006) ve çoğunlukla ilaç kalıntı arınma süresine uyulmadan sütün veya gıdanın insan tüketimine sunulduğunu, dolayısıyla veteriner hekimlikte rastgele kullanımları süt ve süt ürünlerinde kalıntılarının bulunabileceğini göstermektedir (Furlani ve ark., 2014). Süt, özellikle proteinler, mineraller ve yağ asitleri gibi besinlerin en önemli kaynakları olup, çocuk, kadın ve yaşlılar gibi tüketiciler için önem taşır (Souza ve ark., 2011). Bu nedenle makrosiklik laktonların sütteki kalıntılarının araştırılması oldukça önem taşımaktadır. Türkiye’de Tarım ve Orman Bakanlığı bu kalıntıların izlemesini yapmasına rağmen ne yazık ki sonuçlarını kamuoyuna açıklamamaktadır. Bu nedenle Türkiye’de bu kalıntıların sütteki varlığıyla ilgili bir değerlendirme yapmak oldukça güçtür.

Bilgilerimize göre her ne kadar bunların süt ve süt ürünlerindeki kalıntılarının araştırılmasına yönelik Türkiye’de yapılmış bir çalışmaya rastlanmasa da mevcut mevzuatın Avrupa Birliğinden alınması ve diğer gelişmiş ülkelerde de benzer mevzuat olması ve özellikle bu ülkelerde laktasyondaki ineklerde farklı endektosit bileşiklerin kullanılmasıyla sütte kalıntılarının görüldüğüne ilişkin yapılmış birçok

Çalışma (Alvinerie ve ark., 1999; Cerkenik ve ark., 2002; Imperiale ve ark., 2004; Imperiale ve ark., 2006; Macedo ve ark., 2015; Toutain ve ark., 1988), bunların Türkiye’de de bulunabileceğini göstermektedir. Örneğin, Brezilya’da inek sütlerinde yapılan bir çalışmada, 135 UHT süt, 103 pastörize süt ve 104 yoğurtta (toplam 342 numune), ivermektin, abamektin, doramektin, eprinomektin ve moksidektin yönünden analiz edildiklerinde bunlardan yalnızca bir pastörize süt numunesinde (2.2 mg/L) moksidektin kalıntısına rastlandığı, diğerlerinde ise rastlanmadığı bildirilmiştir (Furlani ve ark., 2014).

Bazı antiparazitik ilaçların kalıntıları üzerine pişirmenin (ısı uygulama) etkisini gösteren çalışmalar da vardır (Rose ve ark., 1995; Rose ve ark., 1997; Rose ve ark., 1998; Slanina ve ark., 1989). Bununla beraber kalıntı bulunan ürünlere tüketicinin maruz kalması durumunda meydana gelebilecek olumsuzlukların daha doğru tahmin edilebilmesi için kalıntılara yönelik sütü ısıtmanın etkilerini gösteren bilgilere oldukça fazla gereksinim duyulmaktadır (Waller ve Thamsborg., 2004). Ayrıca antiparazitik ilaçların çiğ sütlerdeki varlığının belirlenmesi, bunların peynir ve yoğurt üretiminde de kullanılması nedeniyle oldukça önem taşımaktadır (Haenlein., 2001). Örneğin ivermektin, moksidektin ve eprinomektin değişik konsantrasyonlarda koyun sütüne katıldıktan sonra bu süt 30 dk boyunca 65°C’de (pastörizasyon) veya 15 saniye 75°C’de (yüksek ısıda kısa süreli pastörizasyon) tutulmasına rağmen bu bileşiklerin halen stabil kaldığı bildirilmiştir (Imperiale ve ark., 2009). Bu çalışmayla belirtilen ürünlerin endüstride kullanılan sütün ısıtma işlemlerinden etkilenmediği iddia edilmiştir. Koyun sütlerinde yapılan başka bir çalışmada da ivermektin katılan sütlere 40 sn 74°C (pastörizasyon), 1 dk 80°C (yüksek pastörizasyon) ve 10 saniye 100°C’ ısı işlemi uygulandığında aynı şekilde kalıntıların stabil kaldığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada bir yıl boyunca -20°C’de muhafaza edilen sütteki kalıntıların da etkilenmediği ancak 2 yıl dondurulduktan sonra yaklaşık %25 oranında azalma gözlendiği bildirilmiştir (Cerkvenik ve ark., 2001). Böylece ısı işleminin ivermektine yönelik etkisi görülmezken uzun süreli dondurmanın ivermektin üzerine çok az etki ettiği ileri sürülmüştür. Bununla beraber sütteki abamektin ve doramektinle ilgili bilgilere ulaşılamamıştır. O nedenle bu çalışmada öncelikle inek sütlerinde bulunabilecek antiparaziter etkili makrosiklik

lakton yapılı antiparaziterler olan ivermektin, moksidektin, eprinomektin, doramektin ve abamektin kalıntıları üzerine ısı uygulamasının etkilerini belirlemek amaçlanmıştır ve bunun için de yaygın olarak kullanılan işleme tekniği olan pastörizasyon ve ev tipi kaynatma işlemleri seçilmiştir. Ayrıca hedef bileşiklerin sütün sıvı kısmı ile kreması arasındaki dağılımı da belirlenmeye çalışılacaktır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Standart Maddeler ve Kimyasallar

Çalışmada analitik standart olarak kullanılan İvermektin (%99,1 saflıkta), Eprinomektin (%99,0 saflıkta), Doramektin (%82,3 saflıkta), Moksidektin (%92,4 saflıkta), Abamektin (%92,1 saflıkta) ve Selamektin (%94,2 saflıkta, internal standart) ile HPLC saflığında asetonitril, sodyum sülfat, sodyum klorür (NaCl) ve trietilamin (TEA) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Deiyonize su ise Milli-Q water purification sistemden (Millipore, Molfheim, Fransa) elde edilmiştir.

2.2. Araçlar ve Cihaz

Hedef analitlerin sütün özütlenmesi için cam pipetler, mikropipet (Jencons Sealpette, 100-1000 µl, San Diego, CA, USA), plastik santrifüj tüpleri (50 mL), vialler (2mL), naylon filtreler (Syringe Filter Nylon, 25 mm× 0,45 µm, Sartorius, Goettingen, Almanya), plastik Pastör pipetleri, enjektör, cam tüpler, balon jojeler, mezürler, hassas terazi (KERN hassas terazi, 440-43, Balingen, Almanya), vorteks (Velp, Scientifica, Usmate, İtalya), santrifüj (Hettich Universal 320 R Masaüstü Soğutmalı Santrifüj Tuttlingen-Almanya), azot tankı (VLM, Bielefeld, Germany) kullanıldı.

Kromatografi için Sıvı Kromatografi–Sıralı Kütle Spektrometri Sistemi (LC-MS/MS, Thermo Finigan TSQ-San Joe, CA, ABD) kullanıldı.

2.3. Standartların Hazırlanması

Stok çözeltiler için ivermektin, eprinomektin, doramektin, moksidektin, abamektin ve selamektin analitik standartlarının her birinden 1 mL’de 1000 µg olacak şekilde (standartların saflık durumuna göre miktar ayarlandı) tartıldı ve ayrı olarak 10 mL’lik cam balonlara alındı. Her birinin üzerine 10 mL asetonytril eklendi ve çözününceye kadar vortekste karıştırıldı. Çalışma çözeltileri için her stok çözeltiliden (selamektin hariç) 100 µL alınıp 10 mL’lik cam balona konuldu ve asetonytril ile 10 mL’ye tamamlandı. Hazırlanan çalışma çözeltilerinin konsantrasyonu 10 µg/mL oldu. İnternal standart olarak kullanılan selamektin stok çözeltisinden ise 300 µL alınıp 100 mL’lik bir cam balona konuldu ve asetonytrille 100 mL’ye tamamlandı. Böylece internal standardın konsantrasyonu 3 µg/mL oldu. Stok çözeltiler -20°C’da, çalışma çözeltileri ise günlük olarak hazırlanarak +4°C’da muhafaza edildi.

2.4. Çözeltilerin Hazırlanması

Trietilamin (TEA)’den 1 mL alındı ve deiyonize suyla 1 L’ye tamamlandı. Böylece %0.1’lik TEA çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 99,9 ml asetonytril üzerine 100 µl %0,1 TEA çözeltisinden ilave edilerek 100 mL miktarında final çözeltisi hazırlandı. NaCl’den 175.5 g tartılarak 1 L deiyonize suda çözdürüldü. Böylece 3 M’lık NaCl çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler +4°C’da muhafaza edildi.

2.5. Çalışma Planı ve Örneklerin Hazırlanması

Süt numunelerinin konulacağı cam malzemeler önce su ve deterjanla yıkandı ve kurutmak için 40°C’lik etüvde yaklaşık 1 saat bekletildi. Analize başlamadan önce deiyonize sudan geçirildi. Çalışmada kullanılan çiğ inek sütleri doğrudan üreticiden satın alındı ve öncelikle antimikrobiyal kalıntı içerip içermediği belirlendi. Antimikrobiyal kalıntı içermediği belirlenen sütlere ivermektin, eprinomektin,

abamektin, doramektin ve moksidektin ayrı ayrı olarak Çizelge 2.1’de belirtilen 3 farklı konsantrasyonda eklenerek karıştırıldı ve bir süre homojen dağılıma uğramaları için beklendikten sonra ısıtma işlemlerine tabi tutuldu. Sütlere katılan bileşiklerin konsantrasyonları yapılan kalıntı izleme çalışmalarında kalıntısına rastlanabilme olasılığı olan konsantrasyonlardan ve MRL düzeyleri gözönüne alınarak seçilmiştir.

Çizelge 2.1. Süte Katılan makrosiklik lakton türevi antiparaziterler ve miktarları.

Süte Katılan Bileşik	Katılan Madde Miktarı (µg/kg)	AB ve Türk Kodeksine göre MRL (µg/kg)	Kodeks Alimentarius’a göre MRL (µg/kg)
İvermektin	10-20-30	-	10
Eprinomektin	20-40-60	20	20
Abamektin	10-20-30	-	-
Doramektin	15-30-45	-	15
Moksidektin	40-60-80	40	-

2.5.1. Isının Sütteki Makrosiklik Lakton Yapılı Antiparaziterlere Etkisinin Belirlenmesi

Bunun için çiğ inek sütlerinde hedef analitlerin her birinden Çizelge 2.1’de belirtilen konsantrasyonlarda katılarak, düşük ısı ve yüksek ısı pastörizasyonu ile kaynatma işlemleri uygulandı. Bunlar en az 3 tekrar yapılmak suretiyle ortalaması alındı. Pastörizasyon için antiparaziter katılan 1 kg süt, cam bir kavanoza konularak önceden ısıtılmış bir su banyosuna yerleştirildi ve düşük pastörizasyon (74°C’de 40 saniye) ve yüksek pastörizasyon (80°C’de 1 dk) işlemine tabii tutuldu. Sütün ısısı bir süt termometresi ile ölçüldü. Kaynatma işleminde ise çelik bir tencereye konulan 1 kg süte yine belirtilen konsantrasyonda katılan analitler iyice karıştırıldıktan sonra kaynayana kadar ısıtıldı ve kaynama noktasına ulaştığında 10 dk daha kaynamaya bırakıldı. Kaynatma işlemi de her analit için 3 defa tekrarlanarak elde edilen sonuçların ortalaması alındı. Analiz için ekstraksiyonlar Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

Hazırlanan numuneler Tarım ve Orman Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğünde analiz edildi.

2.5.2. Kalıntıların Süt Kremasına Geçiş Düzeyinin Belirlenmesi

Çizelge 2.1’de belirtilen konsantrasyonlarda kalıntı içeren ve 100°C’de kaynatılan sütlerden, önce yüzeyde yağ globüllerinin toplanması ile biriken süt yağı (krema) toplandı, daha sonra süt soğutulup 2500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve böylece krema tamamen ayrıldı. Kremalar ile geri kalan kremasız sütün kalıntı konsantrasyonu ayrı ayrı belirlendi. Böylece kalıntıların süt ile kremalar arasındaki dağılımı belirlendi. Elde edilen kremanın içerdiği yağ oranı belirlendi. Bu işlem de her seferinde 1 kg çiğ inek sütü kullanılmak üzere en az 3 defa tekrarlandı.

2.6. Analitik Yöntem

Sütlerdeki makrosiklik laktonların analizi, konuyla ilgili Ulusal Kalıntı Eylem Planında Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yürütülen Standart Operasyon Prosedürü (Teşhiste Metot Birliği, 2016) ve benzer yöntemi kullanan Ozdemir ve Kahraman (2016)’a göre yapıldı. Buna göre homojen hale getirilen süt numunesinden 5 g alındı ve 50 mL’lik santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 10 mL asetonitril katılarak 15 dk vortekste karıştırıldı. Bunun da üzerine 5 mL 3 M NaCl ilave edildi ve 5 dk vortekste karıştırıldı. Karışım 10 dk 4000 rpm devirde +4°C’de santrifüj edilerek üst fazdan 5 mL alındı ve 40°C’de azot gazı altında uçuruldu. Kuru kalıntı 500 µL final çözeltisi (asetonitril+%0.1 TEA) ilave edilerek 15 dk karıştırıldı, injektör filtrelerden geçirilerek insört viyallere aktarıldı ve LC-MS/MS cihazına enjekte edildi.

2.7. Kullanılan Cihaz ve Çalışma Koşulları

Kromatografik analizler Xcalibur 1.4 Software ile kontrol edilen Sıvı Kromatografi –Sıralı Kütle Spektrometri Sistemi (LC-MS/MS-Thermo Finigan TSQ-San Joe, CA, ABD) ile analiz edildi. Kromatografik ayırım C18 guard kolonla korunmuş C18 kolonla (100 mm × 2.0 mm boyut × 5 µm film kalınlığında) (Agilent Technologies, Palo Alto, California, ABD) gerçekleştirildi. İzokratik mobil faz için %0.1'lik TEA (%15) ve asetonitril (%85) kullanıldı ve akış hızı 0.3 mL/dk'ya ayarlandı. Analitlerin belirlenmesi negatif ESI-MS-MS modunda yapıldı. Her bir bileşiğin MS/MS parametreleri ve prekürsör-ürün iyonu seçici reaksiyon izleme modunda doğrudan infüzyonla ayarlandı. Desolvasyon ısısı 350°C, spray voltaj 5100 V, kılıf gaz basıncı (hava) 50 (isteğe bağlı birim), yardımcı gaz basıncı (hava) 10 (isteğe bağlı birim), çarpışma gaz basıncı 10 (isteğe bağlı birim) ve çarpışmaya bağlı dissosiyasyon kaynak voltajı 5 eV olarak belirlendi. Çarpışma gazı olarak argon ve desolvasyon gazı olarak azot kullanıldı. Her bir bileşiğin MS/MS parametreleri ve prekürsör ürün iyonları Çizelge 3.1'de verildi.

2.8. Yöntemin Geçerli Kılınması İçin Spike Numunelerin Hazırlanması

Süt spike çözeltileri için önce stok çözeltilerden abamektin, doramektin ve ivermektin için 0,05 µg/mL, eprinomektin için 0,5 µg/mL ve moksidektin için 1 µg/mL içerecek şekilde asetonitril ile 100 mL'lik çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla, abamektin, doramektin ve ivermektin çalışma çözeltilerinden 0,5 mL eprinomektin çalışma çözeltilisinden 5 mL ve moksidektin çalışma çözeltilisinden 10 mL alınarak asetonitril ile 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra makrosiklik lakton kalıntısı içermediği tespit edilen 5 g'lık sütlere hazırlanan spike çözeltilerinden ayrı ayrı 50, 100 ve 150 µL eklendi. İyiye homojenize edildikten ve homojen bir karışım sağlamak için yaklaşık 15 dk beklendikten sonra hepsine internal standart olarak 100 µl Selamektin çalışma çözeltilisi eklenip yeniden homojenizasyon işlemine tabi tutuldu.

2.9. Yöntemin Geçerli Kılınması

Yöntem Eurachem Rehberine göre (Magnusson ve Ornemark., 2014) seçicilik (selektivite), doğrusallık (linearite), doğruluk, kesinlik, tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) parametrelerine uyularak geçerli kılındı. Yöntemin geçerli kılınması için çiğ sütler kullanıldı. Daha sonra kremadaki muhtemel matriks etkisini belirlemek için sadece geri alım oranları ve nisbi standart sapma (RSD) değerleri belirlendi. İçinde standart olmadığı daha önceden belirlenen boş örnekler ile hedef analitlerin çalışma standartlarından eklenerek hazırlanan pozitif örnekler analize alındı. Sonuçta elde edilen kromatogramlar incelenerek boş örnekte hedef analit standartları ile yakın alıkonma zamanında çıkan herhangi bir pik olmadığı görülerek seçicilik belirlendi. Doğrusallık 5 farklı konsantrasyonda yapıldı. Abamektin, doramektin ve ivermektin için 1; 2,5; 5; 7,5 ve 10 µg/L, eprinomektin için 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/L ve moksidektin için 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/L olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda cihaza uygulandı. Elde edilen sonuçlarla kalibrasyon eğrisi çizildi. Belirlenen konsantrasyonlarda doğrusallık elde edilerek çalışma aralığı belirlendi. Her bir bileşik için matriks/solvent eğrisinin oranı matriks etkisini tahmin etmek için hesaplandı. Tüm hedef analitlerin tespit sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ) miktarları hesaplandı (sırasıyla standart eğrinin 3 ve 10 katı). Kesinlik tekrarlanabilirlik ve intermediate kesinlik olarak hesaplandı. Bunlar 4 gün boyunca 5 farklı konsantrasyonda ve 6 tekrarla doğrulandı. Sonuçlar %RSD (nisbi standart sapma) olarak verildi. % RSD aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{Ortalama Standart Sapma}}{\text{Ortalama Değer}} \times 100$$

Doğruluk 3 farklı konsantrasyonda geri alım olarak belirlendi. Her düzeyde 10 tekrar yapıldı. İçerisinde makrosiklik lakton kalıntısı olmadığı belirlenen süt numunelerine 3 farklı konsantrasyonda (abamektin, doramektin ve ivermektin için 5, 10 ve 15 µg/kg, eprinomektin için 10, 20 ve 30 µg/kg ve moksidektin için 20, 40 ve 60 µg/kg) numuneler hazırlandı ve her bir konsantrasyon için 3 paralel çalışma

yapılıp, cihaza uygulandı. Geri kazanım, standart çözeltileri ile çizilen kalibrasyon eğrileri yardımıyla hesaplandı. Hesaplamada şu formül kullanıldı;

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan derişim}}{\text{Gerçek derişim}} \times 100$$

2.10. İstatistik

Sütlere uygulanan işlemlerden sonra elde edilen veriler SPSS 14.0 istatistik paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi (SPSS, Chicago, IL, USA). Grupların aldıkları değerler birbirine çok yakın değerler olduğundan, gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları belirlemek için tek yönlü varyans analizi (one-way anova test) uygulandı. 0.05'in altındaki olasılık anlamlı kabul edildi ($P < 0.05$).

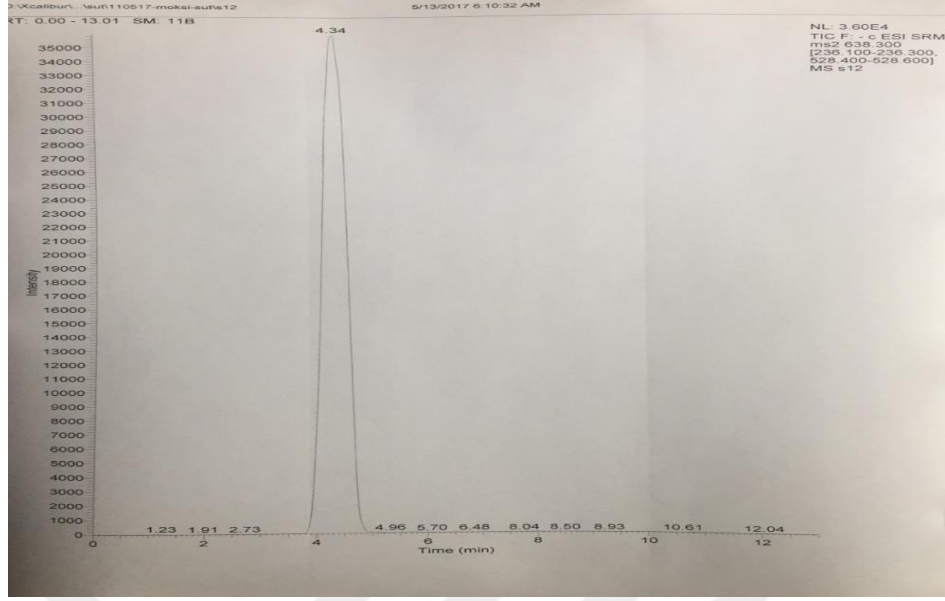
3. BULGULAR

3.1. Yöntemin Geçerli Kılınması

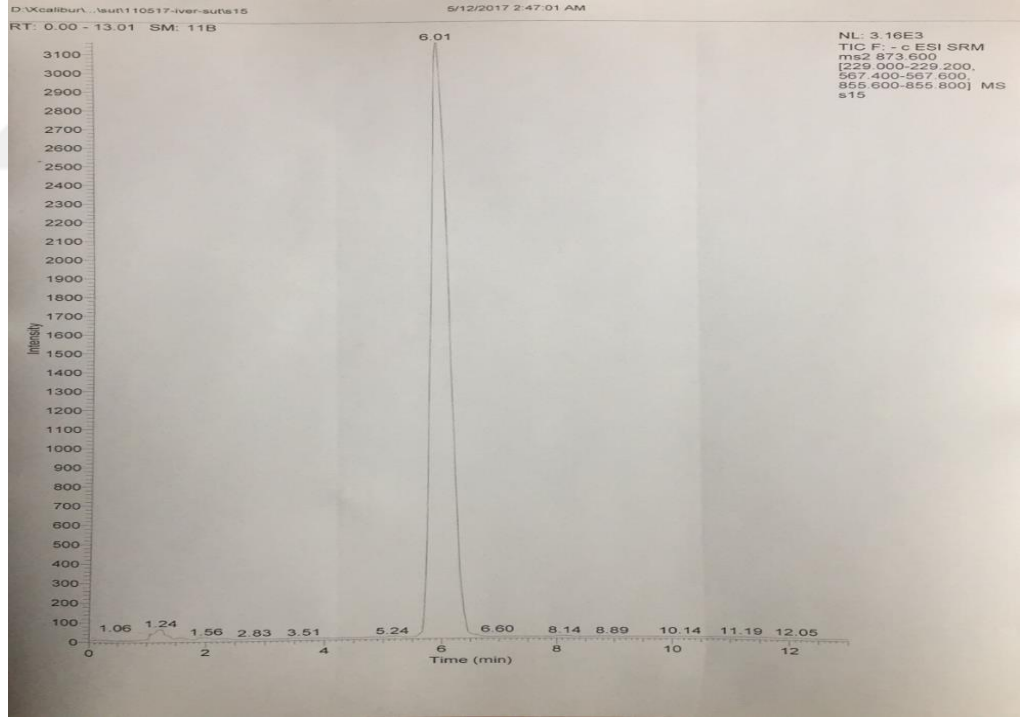
Yöntemin seçiciliği hedef analitlerin standartlarıyla ayrı ayrı takviye edilmiş boş matriks örneklerinin analizi ile değerlendirilerek öncü iyon, üretim iyonları ve belirlenen çarpışma enerjileriyle elde edilen geri alınma zamanları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Aynı şekilde ivermektin, moksidektin, eprinomektin, doramektin ve abamektin için elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Makrosiklik lakton yapıli bileşikler için sıvı kromatografisi sıralı kütle spektrometresinde belirlenen çalışma parametreleri

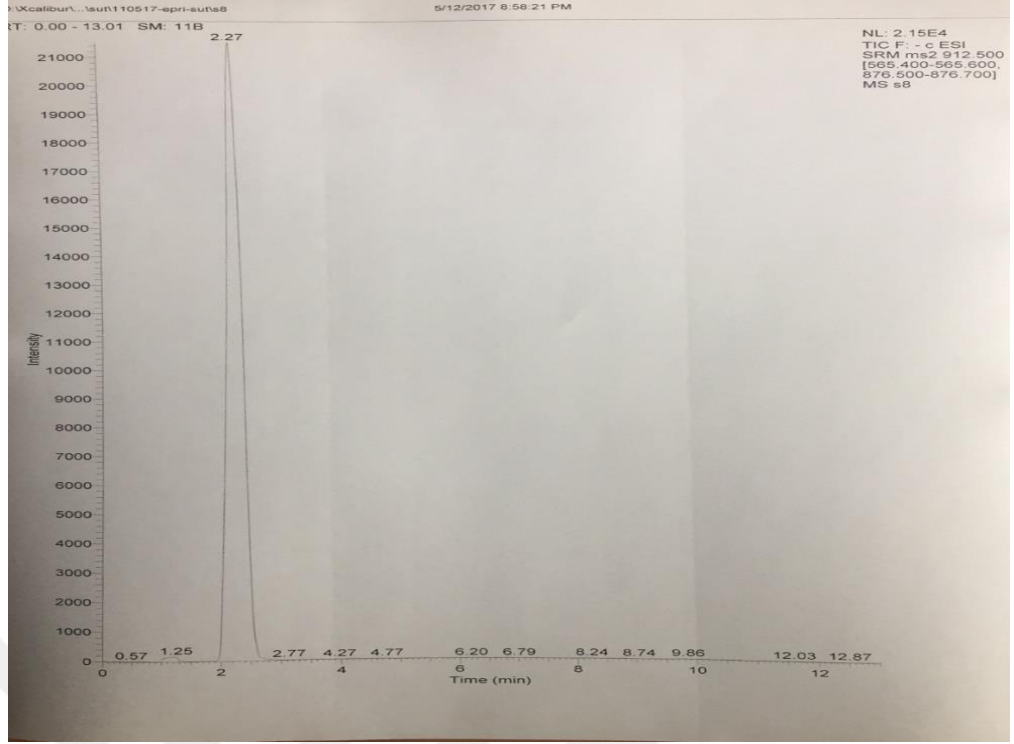
Bileşikler	Ana iyon m/z	Üretim iyonları m/z	Çarpışma Enerjisi	Geri alınma zamanı (dk)
Abamektin	871.4	565.2* 229.1	26 36	2.92
Doramektin	897.5	591.3* 229.1	26 30	3.86
İvermektin	873.5	567.3* 228.7	20 30	4.34
Eprinomektin	912.5	565.4* 269.9	26 30	2.27
Moksidektin	638.5	528.3* 236.1	26 35	6.01
Selamektin	768.4	750.2* 722.2	24 24	5.51
*doğrulayıcı iyon				



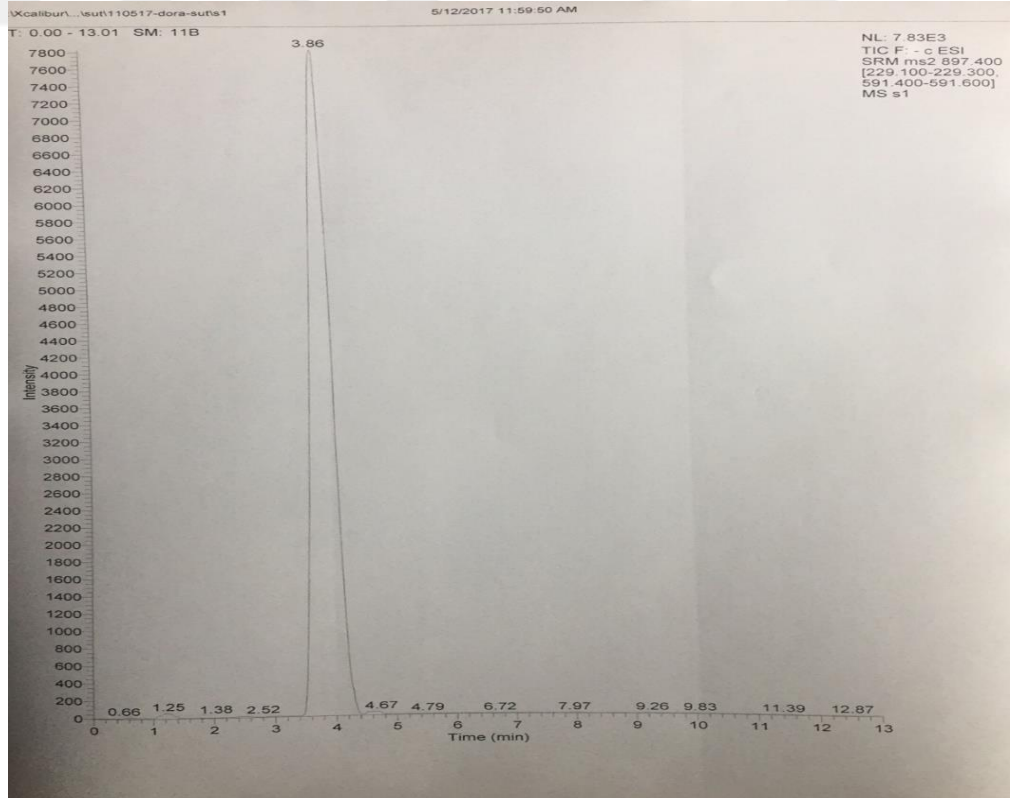
Şekil 3.1. İvermektin (1 µg/mL) Kromatogramı.



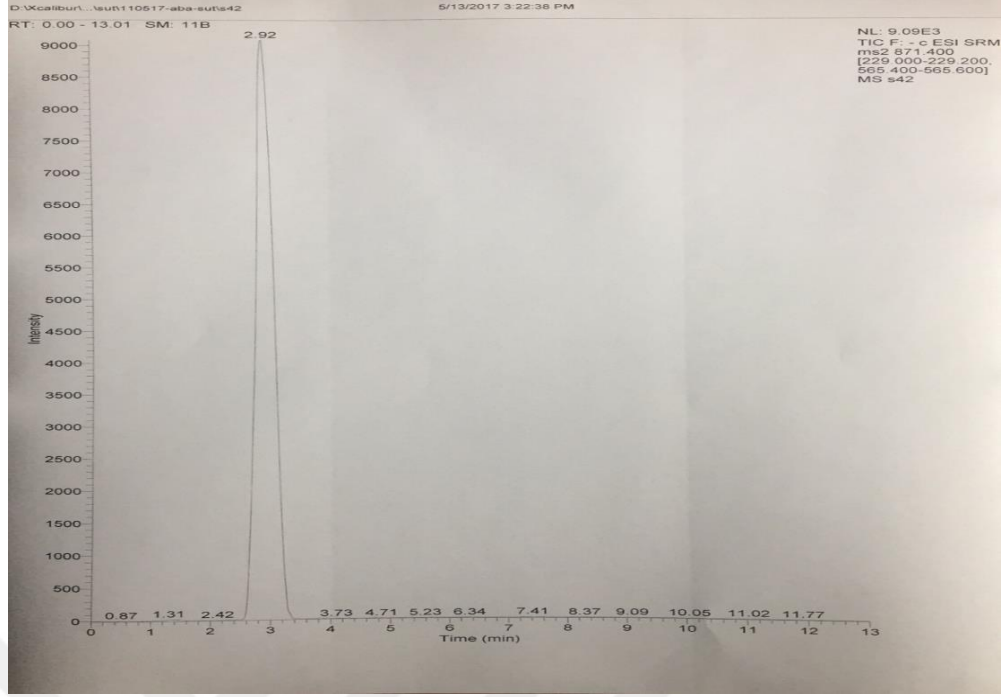
Şekil 3.2. Moksidektin (20 µg/mL) Kromatogramı.



Şekil 3.3. Eprinomektin(10 µg/mL) Kromatogramı.



Şekil 3.4. Doramektin (1 µg/mL) Kromatogramı.



Şekil 3.5. Abamektin(1 µg/mL) Kromatogramı.

Yöntemi geçerli kılmak için elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2’de verilmiştir. 5 farklı konsantrasyonda yapılan doğrusalılık tüm analitler için 0.97’nin üzerinde ölçüldü. LOD ve LOQ değerleri µg/kg olarak ve hepsi MRL’nin altında sırasıyla abamektin için 1.17 ve 1.55, doramektin için 1.17 ve 1.58, ivermektin için 1.35 ve 2.16, eprinomektin için 11.77 ve 15.89, moksidektin için 24.86 ve 36.21 olarak belirlendi.

Çizelge 3.2. Yöntemin geçerli kılınması verilerinin özeti

Analit	Kalibrasyon aralığı (µg/L)	Doğrusallık (r^2)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Geri Kazanım	Ara Kesinlik (%RSD)	Tekrarlanabilirlik (%RSD)
Abamektin	1-10	0,9883	1.17	1.55	%98	7.5	6.6
Doramektin	1-10	0,9744	1.17	1.58	%93	9.8	4.9
İvermektin	1-10	0,9827	1.35	2.16	%87	8.6	7.9
Eprinomektin	10-50	0,9978	11.77	15.89	%95	8.1	2.2
Moksidektin	20-100	0,9983	24.86	36.21	%91	7.2	7.7

RSD: Nisbi standart sapma, LOD:tespit limiti, LOQ: ölçüm limiti (LOQ)

3.2. Isıl İşlemin İnek Sütündeki Makrosiklik Lakton Kalıntılarının Stabilitesi Üzerine Etkisi

Yöntem geçerli kılındıktan sonra süt örneklerine sırasıyla düşük, yüksek pastörizasyon ve kaynatma işlemi yapıldı ve daha sonra analize alındı. Elde edilen sonuçlara göre sütteki makrosiklik laktonların kalıntılarına ısının etkisi ve %11 oranında yağ içerdiği belirlenen krema ile sütün sıvı kısmı arasındaki dağılım Çizelge 3.3'te verilmiştir.



Çizelge 3.3. Isıl İşlemin İnek Sütündeki Makrosiklik Lakton Kalıntılarının Stabilitesi Üzerine Etkisi ve Kremadaki Dağılımı.

Analit	Spike (µg/kg)	Isıtma öncesi (µg/kg)	Düşük Pastör. (µg/kg)	Yüksek Pastör. (µg/kg)	Kaynatma (µg/kg)	Sütün sıvı kısım(µg/kg)	Krema (µg/kg)	P değeri
Abamektin	10	9.8±0.07 ^a	8.8±0.1 ^{ab}	8.5±0.08 ^b	8.3±0.4 ^b	8.5±0.45 ^b	8.8±0.3 ^{ab}	0.038
	20	19.6±0.13 ^a	17.6±0.2 ^b	17.0±0.15 ^b	16.7±0.8 ^b	16.3±1.2 ^b	16.9±0.6 ^b	0.02
	30	29.7±0.2 ^a	26.5±0.3 ^b	25.6±0.2 ^b	25.4±1.2 ^b	24.6±1.5 ^b	26.4±0.9 ^b	0.04
Doramektin	15	13.9±0.15	13.3±0.14	12.6±0.08	13.0±0.33	12.6±0.69	13.6±0.14	>0.05
	30	28.1±0.3	25.5±0.27	25.1±0.16	25.9±0.67	25.7±0.83	27.3±0.27	>0.05
	45	41.9±0.45	39.8±0.4	37.67±0.25	38.9±1.0	38.6±1.16	40.9±0.39	>0.05
İvermektin	10	8.8±0.08	8.9±0.05	8.6±0.05	8.7±0.1	8.2±0.3	8.9±0.08	>0.05
	20	17.5±0.2	17.7±0.1	17.1±0.1	17.0±0.2	17.3±0.2	17.8±0.2	>0.05
	30	26.4±0.2	26.6±0.2	25.7±0.2	26.1±0.3	25.0±1.0	26.8±0.2	>0.05
Eprinomektin	20	19.1±0.25 ^a	17.4±0.06 ^b	14.6±0.04 ^c	14.0±0.4 ^c	14.0±0.4 ^c	15.5±0.5 ^c	<0.001
	40	38.3±0.5 ^a	34.8±0.12 ^b	29.2±0.08 ^c	28.0±0.8 ^c	27.9±0.74 ^c	29.1±1.0 ^c	<0.001
	60	57.2±0.75 ^a	52.2±0.18 ^b	51.8±0.12 ^b	50.1±0.1.2 ^b	49.9.2±4.2 ^b	50.6±1.5 ^b	<0.001
Moksidektin	40	36.4±0.4 ^a	36.5±0.8 ^a	35.5±0.6 ^a	32.5±0.1 ^b	31.3±0.5 ^b	34.9±0.2 ^a	<0.001
	60	54.5±0.6 ^a	54.2±1.2 ^a	53.8±0.9 ^a	47.0±0.4 ^b	46.1±0.9 ^b	47.8±0.3 ^b	<0.001
	80	72.9±0.8 ^a	72.1±1.7 ^a	71.8±1.2 ^a	62.7±0.6 ^b	62.2±0.6 ^b	63.8±0.4 ^b	<0.001

abc: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel yönden farklıdır.

Çizelge 3.3'te görüldüğü gibi sütlerde bulunan abamektin, eprinomektin ve moksidektin kalıntılarının ısı işlemlerinden etkilendiği ve böylece konsantrasyonlarında istatistiksel yönden önemli oranda düşme olduğu belirlenmiştir. Sütün kaynatma işleminin moksidektin konsantrasyonlarında pastörizasyon işleminden daha fazla azalmaya neden olduğu, yüksek pastörizasyon ve kaynatma işleminin ise eprinomektin kalıntılarında düşük pastörizasyon işleminden daha çok azalmaya neden olduğu görülmektedir. Abamektinde ise kaynatma ile pastörizasyon işlemi arasında önemli bir fark tespit edilememiştir. Bununla beraber doramektin ve ivermektinin pastörizasyon ve kaynatma işlemlerinden etkilenmediği görülmektedir. Kalıntıların yağ içeriği %11 olarak belirlenen krema ile sütün sıvı kısmındaki dağılımına bakıldığında ise sadece süte 30 µg/kg oranında katılan doramektinin kremaya daha yüksek oranda geçtiği belirlenmiştir. Bununla beraber süte katılan ne doramektinin diğer konsantrasyonlarında ve ne de diğer bileşiklerin sütün sıvı kısmı ile krema arasında önemli bir dağılıma uğramadığı görülmektedir.

4.TARTIŞMA

Bu çalışmada matriks olarak seçilen ve çalışılması zor olan süt için özütleme yönteminin belirlenmesi en önemli basamaklardan bir tanesidir. Bunun için analiz yöntemi olarak Ulusal Kalıntı İzleme Planında Tarım ve Orman Bakanlığı yetkili laboratuvarlarının kullandığı resmi yöntem (Teşhiste Metot Birliği, 2016) ve bunu kullanan Özdemir ve Kahraman (2016) tarafından bildirilen yöntem tercih edilmiştir. Yöntemin geçerli kılınmasında elde edilen parametreler Ozdemir ve Kahraman (2016) tarafından bildirilen validasyon parametrelerine benzer olup, Eurachem rehberine (Magnusson ve Ornemark., 2014) uygundur.

Sütte bulunan makrosiklik lakton yapılı antiparaziterlerin kalıntılarına ısı işlemlerinin etkisinin ve sütün sıvı kısmı ile krema arasında dağılımının araştırıldığı bu çalışmada abamektin, eprinomektin ve moksidektin kalıntılarının ısı işlemlerinden etkilendiği ve ısı uygulanmamış sütlerle ısı işlemine tabi tutulan sütlerde istatistiksel yönden önemli bir fark olmasına rağmen, kalıntıların tamamen parçalanması olan asıl amaca hizmet etmediği görülmektedir (Çizelge 3.3). Ayrıca doramektin ve ivermektin'in etkilenmediği ve sütte oldukça stabil kaldığı belirlenmiştir. Imperiale ve ark. (2009), tarafından yapılan çalışmada da koyun sütüne farklı konsantrasyonlardakı ivermektin, moksidektin ve eprinomektinin düşük (65°C'de 30 dk) ve yüksek (75°C'de 15 sn) pastörizasyondan etkilenmediği bildirilmiştir. Cerken ve ark. (2001), tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, ivermektinin laktasyondaki koyunlara deri altı uygulamasından sonra belirli aralıklarla topladıkları sütlerde 74°C'de 40 sn ve 80°C'de 1 dk olarak uyguladıkları pastörizasyon işlemlerinden kalıntıların etkilenmedikleri ve benzer olarak ivermektinin stabil kaldığı belirtilmiştir. Aynı şekilde Hakk ve ark. (2016), tarafından yapılan çalışmada da koyun sütlerindeki ivermektin kalıntılarının yüksek pastörizasyon (80°C'de 1 dk) ve kaynatma (100°C'de 10 sn) işlemlerinden etkilenmediği ifade edilmiştir.

Kas ve karaciğer gibi farklı hayvan dokularındaki ivermektin kalıntılarının uygulanan mikrodalga ısıtma, kızartma, kaynatma gibi farklı pişirme işlemlerinin de kalıntıları etkilemediği, böylece çiğ dokulardaki ivermektin konsantrasyonlarının pişmiş dokularda da aynı düzeyde bulunabileceği bildirilmiştir (Rose ve ark., 1998). Ancak Rose ve ark. (1998) ile Slanina ve ark. (1989), kaynatma ve kızartma işlemini uygulamadan önce sığır kaslarını kıyma haline getirdiklerinde ivermektin kalıntılarında %50'ye varan bir kayıp gözlemlemişlerdir. Bununla beraber Rose ve ark. (1998), kaslardaki kalıntılarının pişirme suyuna geçtiğini tespit etmiş ama Slanina ve ark. (1989), pişirme sularını analiz etmemişlerdir. Benzer olarak Cooper ve ark. (2011), da ivermektin kalıntısı bulunan sığır kas ve karaciğerlerini kavurma (190°C'de 40 dk) ve az yağda kavurma (kas için 8-12 dk, karaciğer için 14-19 dk) işlemine tabi tuttuklarında kalıntıların stabil kaldığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada ivermektin dışında başka antelmantikler de çalışan Cooper ve ark. (2011), gıdalardaki veteriner ilaç kalıntılarının, geleneksel pişirme altında bozulmaya karşı dirençli olduğunu ve hem tüketicinin sağlığını hem de gıda üreticilerinin karlılığını korumak için veteriner ilaçlarının kaynakta kullanımını en aza indirmenin ve kontrol etmenin desteklenmesi gerektiği bir kez daha vurgulamışlardır.

Ulaşılabilen kaynakların hepsinde lipofilik nitelikli makrosiklik lakton yapıları antiparaziter ilaçların ruminantlarda sütle atılabildiği ifade edilmektedir (Cerkvenik ve ark., 2004; Imperiale ve ark., 2004). Bu tür bileşiklerin süt-plazma konsantrasyon oranı 1'den büyük olup, bu oranın antiparaziter ilaçların süt ve süt yağı içeriğinde dağılımını pozitif yönde etkileyebileceği ileri sürülmüştür (Cerkvenik ve ark., 2004). Ayrıca peynirlerin olgunlaşma döneminde belirlenen ivermektin (Cerkvenik ve ark., 2004), moksidektin (Imperiale ve ark., 2004) ve eprinomektin (Imperiale ve ark., 2006) kalıntılarının akıbetinin su kaybı, toplam katılar ve yağ içeriğiyle yakından ilişkili olabileceği ifade edilmektedir.

Makrosiklik lakton halkasının 13 numaralı karbon atomunda (C13), bir 2-deoksi şeker glikozit olan alfa-L oleandrosil-alfa-L oleandrosiloksi bağı bulunduğu ve bu haliyle esas olarak aglikonlar ve/veya monosakkaritleri üreten asit hidrolizine veya alkolize karşı nispeten duyarlı olduğu bilinmektedir. İvermektinin asidik

koşullara duyarlı olduğu bildirilmesine (Fisher ve Mrozik., 1989) rağmen, yoğurt yapımında laktik asit fermentasyonu sırasında pH'nın 4.0-4.6'ya ulaştığında bile sütteki ivermektin (Cerkvenik ve ark., 2004) ve moksidektin (Imperiale ve ark., 2002) kalıntılarının stabil kaldığı bildirilmiştir. Yoğurt yapımında pH değerini düşüren başlıca faktör zayıf bir asit olan ve makrosiklik laktonların hidrolizini gerçekleştiremeyen laktik asittir. Bununla beraber çok daha düşük pH değeri verebilen sülfürik asit gibi kuvvetli asitlerin bir veya iki şeker ünitesini ayırarak ivermektinin asit hidrolizine neden olabileceği ve bunun da ilacın monosakkarid veya aglikona transformasyonuna ve kısmen deaktivasyonuna yol açabileceği bildirilmiştir (FSIS, 1991). Mevcut çalışmada da makrosiklik lakton kalıntılarının süte ısı işlemi uygulanması sırasında nisbeten stabil kaldıkları görülmüştür. Bununla birlikte pH ve ısının yeteri kadar ve zamanda uygulanması durumunda makrosiklik laktonların aglikon moleküllerine dönüşebileceği iddia edilmekte ve böylece kromatografik analizlerde tespit edilemeyecekleri ileri sürülmektedir (Fisher ve Mrozik., 1989).

Bilgilerimize göre yukarıda belirtilen çalışmalar dışında makrosiklik lakton yapılı antiparaziter ilaçlara yönelik ısı işlemlerin etkilerini araştıran başka bir makaleye rastlanmamıştır. Bununla beraber diğer veteriner ilaçlarının kalıntılarının ısının etkisini bildiren birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Antibiyotiklerin kalıntılarına yönelik olarak uygulanan ısı işlemleriyle genellikle sulfonamidler (Baydan ve ark., 2002), oksasilin, kloramfenikol, aminoglikozidler, kinolonlar, klindamisin, novobiosin, trimetoprim, vankomisin ve azlosilinin ısıya dayanıklı (Traub ve Leonhard., 1995), eritromisin (Traub ve Leonhard., 1995) ve oksitetrasiklinin (Hassani ve ark., 2008) ısıya duyarlı olduğu bildirilmiştir. Öte yandan penisilin G, ampisilin ve amoksisilin gibi bazı beta-laktamların kısmen duyarlı oldukları belirtilmektedir. Ayrıca aynı sınıftan olsa bile bazı antibiyotiklerin ısı işleminin uygulandığı farklı matriks veya ısı işlemine yine farklı yanıtlar verebildiği belirtilmiştir (Franje ve ark., 2010). Örneğin yumurtanın kızartma, 1.5 ve 5 dk kaynatma ve +4 °C'de muhafaza edilmesiyle gentamisin kalıntılarının etkilenmediği, ancak oda ısısında muhafaza edilen yumurtaların gentamisin kalıntılarında 21. ve 28. günlerde önemli bir azalma olabileceği bildirilmektedir

(Sireli ve ark., 2006). Benzer sonuçlar yumurtadaki florfenikol ve metaboliti florfenikol amin için de elde edilmiş ama genelde florfenikol ve metabolitinin ısıya karşı oldukça dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Filazi ve ark., 2015). Tavuk dokularındaki enrofloksasin (Baydan ve ark., 2000a) ve danofloksasin'in (Baydan ve ark., 2000b) kalıntıları üzerine yapılan çalışmalarda kalıntıların ızgara işleminden etkilenmediği ama dokuları suyla haşlamanın kalıntıda azalmaya neden olduğu, ancak kalıntının haşlama suyuna geçtiği, -18 °C'de muhafaza edilen dokuların ise 5. güne kadar kalıntıda bir değişikliğe yol açmadığı, ancak 20. ve 30. günlerde önemli miktarda azaldığı rapor edilmiştir. Sülfakinoksalin, süfadimetoksin ve sülfadoksinin tavuk dokularındaki kalıntıları üzerine yapılan bir başka çalışmada dokulara uygulanan pişirme işlemlerinin (ızgara ve haşlama) kalıntıda azalmaya neden olduğu, derin dondurucuda muhafaza etmenin ise kalıntı miktarını etkilemediği belirtilmiştir. Siprofloksasin, norfloksasin ve flumequin'in de araştırıldığı aynı çalışmada ise sülfonamidlerin tersi olarak kinolonların pişirme işlemlerinden etkilenmediği, ancak derin dondurucuda muhafaza etmenin kalıntı miktarında düşmeye neden olduğu bildirilmiştir (Baydan ve ark., 2002).

Kellnerová ve ark. (2014), yaptıkları bir çalışmada sütteki oksitetrasiklin ve tetrasiklin kalıntılarının pastörizasyonla (85°C'de 3 sn) sırasıyla %15,3 ve %5,74 oranında kayba neden olduğunu ve böylece tetrasiklinin oksitetrasiklinden daha kararlı olduğunu bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada inek sütlerine değişik konsantrasyonlarda katılan makrolit (eritromisin, spiramisin ve tilosin) ve linkozamid (likomisin) kalıntılarının pastörizasyondan (60°C'de 30 dk) etkilenmediği ama makrolitlerin sterilizasyon (120 °C'de 20 dk) ve ultra yüksek sıcaklıklı (UHT) sterilizasyon (140°C'de 10 sn) işlemleri sonucunda önemli bir antimikrobiyal etkinlik kaybına uğradığı belirtilmiştir. Bununla beraber linkomisinin oldukça kararlı bir molekül olduğu ve uygulanan ısı işlemleri sonucunda antimikrobiyal aktivitesini neredeyse hiç kaybetmediği bildirilmiştir (Zorraquino ve ark., 2011).

Diğer antimikrobiyal maddelerle yapılan çalışmalarla da gösterildiği gibi hayvanlarda kullanılan bazı veteriner ilaç kalıntılarının gıdalara uygulanan ısı

işlemler sonucunda herhangi bir azalma göstermediği, ısıt işlemlere dirençli olduğu anlaşılmaktadır.

Makrosiklik yapıli antiparaziter kalıntıların krema ile sütün sıvı kısmındaki dağılımına bakıldığında ise sadece süte 30 µg/kg oranında katılan doramektinin kremaya daha yüksek oranda geçtiği, ama diğerlerinde önemli bir fark olmadığı ortaya konulmuştur. Doramektinin sadece tek bir konsantrasyonda kremaya daha çok dağılması, ama bu dağılımın diğer konsantrasyonlarda ve ayrıca diğer bileşiklerde görülmemesinin nedeni çalışılan örnek sayısının azlığıyla açıklanabilmektedir. Çünkü yapılan diğer çalışmalar bu türden lipofilik bileşiklerin yağa daha fazla dağılabildiğini göstermektedir. Örneğin Anastasio ve ark. (2002) ile İmperiale ve ark. (2004), peynir üretimi sırasında makrosiklik laktonların en yüksek konsantrasyonlarının pıhtıda ölçüldüğü, koyun ve manda peynirlerindeki konsantrasyonlarının ise diğer sütlerden sırasıyla 3 veya 4 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Buna göre araştırmacılar makrosiklik laktonların sütteki varlığının yağ içeriğiyle pozitif bir ilişki içinde olduğunu iddia etmişlerdir. Moksidektin ve İvermektin, lipofilik özellikleri nedeniyle sütün sıvı kısmı ve peyniraltı suyuna kıyasla süt kaymağında daha fazla birikim göstermektedirler. Hakk ve ark. (2016), tarafından yapılan araştırmada da ivermektin'in lipofilik özelliğinden dolayı sütün yağlı kısmında daha çok biriktiği bildirilmiştir.

Macedo ve ark. (2015), tarafından Brezilya'da Haziran-Eylül 2013 yıllarında inek sütlerinden yapılmış 38 ticari tereyağında abamektin, doramektin, ivermektin ve moksidektin kalıntıları yönünden yapılan bir araştırmada, numunelerin %89.5'unda 0.3-119.4 µg/kg ivermektin, %76.3'ünde 0.6-64.7 µg/kg doramektin ve %55.2'sinde 0.7-4.5 µg/kg abamektin kalıntısı bulunduğı, ayrıca numunelerin %76.3'ünde bir makrosiklik laktondan daha fazlasına rastlandığını, bununla beraber moksidektin kalıntısı tespit edilmediğı bildirilmiştir. Bunun nedeni de tereyağının, minimum %80 yağ içeriğiyle (Codex Alimentarius., 2010), süttten elde edilen yağlı bir ürün olması ve bu nedenle lipofilik nitelikteki bileşikleri daha fazla tutma kapasitesine sahip olması sanılmaktadır. Bununla beraber mevcut çalışmada sütün kaynatılmasından

sonra kremanın alınması ve kremada ölçülen düşük yağ içeriği nedeniyle bu dağılımın yeterince gerçekleşmediği sanılmaktadır.

Yukarıda yapılan çalışmalarda makrosiklik laktonların gerek süte katılma şekli ve miktarı, gerek kullanılan analiz yöntemi gerekse de değerlendirilen cihazın farklılığından kaynaklanan değişkenlikler gözükse de özünde çalışmalar birbirlerini destekler niteliktedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı ısı uygulamalarının sütteki antiparaziter ilaçlardan ivermektin, moksidektin, doramektin, eprinomectin ve abamektin kalıntılarına etkisini araştıran bu çalışmada, uygulanan düşük ve yüksek pastörizasyon ve kaynatma işlemleri sonunda seçilen antiparaziter ilaçların varlığını koruyup korumadığı ve sütün sıvı kısmı ile kreması arasındaki dağılımı tespit edilmiştir. Böylece elde edilen sonuçlar Türkiye’de ve diğer ülkelerde süt üretiminde yararlanılan hayvanlar için kullanımı yasak olan veya belli bir miktarda bulunmasına izin verilen antiparaziter ilaçların, uygulanan ısı işlemler neticesinde değişkenlik gösterse de tamamen yok olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca lipofilik özelliklerine göre de kremada varlıklarını aynı şekilde sürdürmeye devam etmişlerdir.

Hayvanlarda kullanılan antiparaziterler, hayvan refahına, hayvansal ürünlerin üretiminde artışa ve zoonoz hastalıkları önleyerek halk sağlığına katkı yaparken, bir yandan da organizmalarda direnç problemlerinin gelişmesine ve kalıntıları aracılığıyla halk sağlığına yönelik istenmeyen etkilere neden olabilirler. Bu anlamda iki ucu keskin bir bıçağa benzetilen antiparaziterlerin neden olduğu kalıntıları en az maliyetle ve etkili bir şekilde önlemek için bunların hayvanlarda akılcı ve kontrollü bir şekilde kullanılmasının sağlanması gerektiği ifade edilmektedir. Sorunun yetkili otoriteler, veteriner hekimler ve hayvan yetiştiricileri/bakıcıları arasında çözülebileceği göz önüne alınarak, veteriner hekim reçetesi veya önerisi olmadan kemoterapötiklerin hayvanlarda kullanılmasının engellenmesi, özellikle hayvan yetiştiricilerinin ilaç kalıntı arınma süresine uymadan gıda üretimi yapmamaları ve yetkili otoritelerin bununla ilgili sürekli eğitim programları düzenlemesi son derece önem taşımaktadır. Ayrıca yetkili otoriteler tarafından tüketici sağlığının korunması açısından hayvan kaynaklı gıdaların antiparaziter ilaç kalıntıları yönünden sürekli izlenmesi ve kontrol edilmesi göz ardı edilmemelidir.

Elde ettiğimiz sonuçlar açısından yetkili otoriteler tarafından yürütülen antiparaziter ilaç kullanımına ilişkin denetim sıklığının artırılması, yetiştiricilerin bu

konuda bilinçlendirilmesinin, bunun için çeşitli eğitsel faaliyetlerin yapılmasının halk sağlığı açısından faydalı olacağına inanılmaktadır. Çünkü antiparaziter ilaç kullanımı halk sağlığına katkı sağlarken, aynı zamanda parazitlerde direncin gelişmesine ve kalıntıları ile halk sağlığına yönelik istemeyen etkilere neden olabilirler.



ÖZET

Farklı Isı Uygulamalarının Sütteki Bazı Makrosiklik Lakton Yapılı Antiparaziter İlaç Kalıntılarına Etkisi

Bu çalışmada, inek sütlerinde bulunabilecek makrosiklik lakton yapılı antiparaziterler olan ivermektin, moksidektin, eprinomektin, doramektin ve abamektin kalıntıları üzerine ısı uygulamalarının etkilerini ve sütün sıvı kısmı ile kreması arasındaki dağılımlarını belirlemek amaçlanmıştır. Çiğ sütlere, ayrı ayrı olmak üzere ivermektin ve abamektin'den 10, 20 ve 30 µg/kg, doramektin'den 15, 30 ve 45 µg/kg, eprinomektin'den 20, 40 ve 60 µg/kg, moksidektin'den 40, 60 ve 80 µg/kg katılmış ve pastörizasyon (74°C'de 40 sn ve 80°C'de 1 dk) ile kaynatma (100°C'de 10 dk) işlemlerine tabi tutulmuşlardır. Ayrıca hedef analitlerden aynı konsantrasyonlarda katılan sütler kaynatıldıktan sonra sütün krema kısmı ayrılmıştır. Tüm işlemler her konsantrasyonda ve her hedef analit için 3 defa tekrar edilmiştir.

Analizler, validasyonu yapılan sıvı kromatografi-sıralı kütle spektrometri ile gerçekleştirilmiştir. Sütlerde bulunan abamektin, eprinomektin ve moksidektin kalıntılarının ısı işlemlerinden etkilendiği ve böylece konsantrasyonlarında istatistiksel yönden önemli oranda düşme olduğu belirlendi. Bununla beraber sütte önemli bir oranda varlıklarını sürdürmeye devam ettirmişlerdir. Sütün kaynatma işleminin moksidektin konsantrasyonlarında pastörizasyon işleminden daha fazla azalmaya neden olduğu, yüksek pastörizasyon ve kaynatma işleminin ise eprinomektin kalıntılarında düşük pastörizasyon işleminden daha çok azalmaya neden olduğu görüldü. Abamektinde ise kaynatma ile pastörizasyon işlemi arasında önemli bir fark tespit edilemedi. Bununla beraber doramektin ve ivermektinin pastörizasyon ve kaynatma işlemlerinden etkilenmediği görüldü. Kalıntıların yağ içeriği %11 olarak belirlenen krema ile sütün sıvı kısmındaki dağılımında, 30 µg/kg oranında katılan doramektinin kremaya daha yüksek oranda geçmesi haricinde önemli bir fark olmadığı görüldü. Böylece makrosiklik lakton yapılı antiparaziterlerin süte uygulanan geleneksel ısıtma işlemlerine karşı bozulmaya karşı dirençli olduğu belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Aivermektin, Kaynatma, Krema, Milbemisin, Pastörizasyon, Süt.

SUMMARY

The effect of different heat applications on some macrocyclic lactone-structured antiparasitic drug residues in the milk

In this study, it was aimed to evaluate the effect of heat applications over ivermectin, moxidectin, eprinomectin, doramectin and abamectin residues which are macrocyclic lacton structural antiparasitaries present in cow milk and to identify the distribution of liquid part and cream of the milk. Ivermectin and abamectin were added separately to raw milk in 10, 20 and 30 µg/kg, doramectin 15, 30 and 45 µg/kg, eprinomectin 20, 40 and 60 µg/kg and moxidectin 40, 60 and 80 µg/kg concentrations and raw milk was then pasteurized (40 seconds in 74°C and 1 minute in 80°C) and boiled (10 minutes in 100°C). Also after boiling the milk which included same concentrations of target analytes, cream part of milk separated. All procedures were repeated three times in all concentrations and for each target analyte.

Analyses were performed by validated liquid chromatography-sequential mass spectrometry. It was identified that, abamectin, eprinomectin and moxidectin residues present in milk were effected from heat application and there was statistically significant decrease in their concentrations. However, they presence still remained in significant rate in the milk. It was shown that boiling process produced more decrease in the moxidectin concentrations compared to pasteurization and high pasteurization and boiling process produced significantly more decrease in eprinomectin residues compared to low pasteurization process. There was no significant difference in abamectin levels between boiling and pasteurization process. Also, doramectin and ivermectin levels were not effected from pasteurization and boiling processes. With respect to the distribution of residues in the liquid and cream part of the milk that contained 11% fat, there was no significant difference expect 30 µg/kg doramectin had significantly higher concentration in cream compared to liquid part. In conclusion, it was shown that macrocyclic lacton structural antiparasitaries are resistant to traditional milk heating processes.

Keywords: Avermectin, Boiling, Cream, Milbemycin, Milk, Pasteurization.

KAYNAKLAR

- ALVINERIE M, SUTRA JF, GALTIER P, MAGE C (1999). Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following topical administration to lactating dairy cattle. *Res Vet Sci*, **67**:229–232.
- ANASTASIO A, ESPOSITO M, AMORENA M, CASTELLANI P, SERPE L, CORTESI ML (2002). Residue study of ivermectin in plasma, milk, and mozzarella cheese following subcutaneous administration to buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Agric. Food Che.*, **50**:5241–5245.
- ANON (2011). Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik. 17.12.2011 tarih ve 28145 Sayılı Resmi Gazete.
- ANON (2012). Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 04.05.2012 tarih ve 28282 sayılı Resmi Gazete.
- ANON (2018a). T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Ruhsatlı Veteriner Tıbbi Ürünler. Erişim Adresi: [<https://vtu.tarim.gov.tr/>]. Erişim tarihi: 07.09.2018.
- ANON (2018b). Ulusal Kalıntı İzleme Planı-2018. Erişim Adresi: [<https://www.tarim.gov.tr/Konular/Gida-Ve-Yem-Hizmetleri/Gida-Hizmetleri/Kalinti-Izleme>]. Erişim Tarihi: 07.09.2018.
- BAYDAN E, FİLAZİ A, KUM C, SEKKİN S (2000a). Etlik piliçlerde pişirme ve dondurma işlemlerinin ilaç kalıntıları üzerine etkileri: 1. Enrofloksasin üzerine pişirme ve farklı sürelerde soğukta depolamanın etkisi. *Vet Hek Der Derg*, **71**: 19-22.
- BAYDAN E, FİLAZİ A, KUM C, SEKKİN S (2000b). Etlik piliçlerde pişirme ve dondurma işlemlerinin ilaç kalıntıları üzerine etkileri: 2. Danofloksasin üzerine pişirme ve farklı sürelerde soğukta depolamanın etkisi. *Vet Hek Der Derg*, **71**:33-6.
- BAYDAN E, AKKAYA R, TRAŞ B, BİLGİLİ A, TANYILDIZI S, FİLAZİ A, YARSAN E, ÖZDEMİR M (2002). Etlik piliçlerde kullanılan çeşitli veteriner ilaçların kalıntıları üzerine pişirme, dondurma ve benzeri işlemlerin etkilerinin araştırılması: 1. Sülfonamid grubu bazı antibakteriyellerin incelenmesi, 2. Kinolon grubu bazı antibakteriyellerin incelenmesi. *Etlik Veteriner Mikrob Derg*, **13**: 56-76.
- BEYENE T, (2016). Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *J Veterinar Sci Technol*, **7**:285. doi:10.4172/2157-7579.1000285.

- BİLİCİ N, (2008). İstanbul'da tüketime sunulan kanatlı et ve yumurtalarında lasolosit ve salinomisin kalıntı düzeyleriyle farklı ısı işlemlerinin kalıntı düzeylerine etkisinin araştırılması. *Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bil. Enstitüsü, İstanbul*.
- BOTSOLOU NA, FLETOURIS DJ (2001). Residues in Food. Drug Residues in Food. Pharmacology, Food Safety and Analysis. *Basel, New York: Marcel Dekker, Inc.*; p.269-548.
- CERKVENIK V, DOGANOC DZ, SKUBIC V, BEEK WMJ, KEUKENS HJ (2001). Thermal and long-term freezing stability of ivermectin Residues in sheep milk. *Eur Food Res Technol*, **213**: 72–76.
- CERKVENIK V, GRABNAR I, SKUBIC V, DOGANOC DZ, BEEK WMJ, KEUKENS HJ, DROBNIC KOSOROK M, POGACNIK M (2002). Ivermectin pharmacokinetics in lactating sheep. *Vet Parasitol*. **104**:175–185.
- CERKVENIK V, PERKO B, ROGELJ I, DOGANOC D Z, SKUBIC V, BEEK W MJ, KEUKENS H J, (2004). Fate of ivermectin residues in ewes' milk and derived products. *Journal of Dairy Research*, **71**:39–45.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2010). Codex standard for butter. Codex Stan A-1–1971. Adopted in 1971. Revision 1999. Last amendment 2010. Erişim Adresi: http://www.codexalimentarius.org/download/standards/170/CXS_279e.pdf. Erişim Tarihi: 06.01.2016.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2014). Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CAC/MRL. 2e2014. Updated as at the 37th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2014).
- COGAN T (1972). Susceptibility of cheese and yoghurt starter bacteria to antibiotics. *J Appl Microbiol*. **23**: 960–965.
- COOPER K.M, WHELAN M, DANAHER M, KENNEDY D.G (2011). Stability during cooking of anthelmintic veterinary drug residues in beef. *Food Additives and Contaminants*, **Vol. 28, No. 2**, 155–165
- DANAHER, M, HOWELLS L. C, CROOKS S. R. H, CERKVENİK-FLAJS V, O'KEEFFE M(2006). Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. **844**:175–203.
- DOYRAN M (2000). Veteriner ilaçlarında sorunlar. *Bursa'da Tarım*, **(8)**:23-24.
- FİLAZİ, A (2012). Hayvansal gıdalardaki antibiyotik kalıntıları ve risklerinin değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, **3(3)**:1-7.
- FİLAZİ A, SİRELİ UT, YURDAKOK-DİKMEN B, AYDIN FG, KUCUKOSMANOĞLU AG (2015). The effect of cooking and storage on florfenicol and florfenicol amine residues in eggs. *Italian Journal of Food Science*, **27 (3)**: 351-356.
- FISHER MH, MROZİK H (1989). Chemistry. In: Ivermectin and abamectin. Ed: Campbell W, New York (NY): Springer. p. 1–23.

- FRANJE CA, CHANG SK, SHYU CL, DAVIS JL, LEE YW, LEE RJ, CHANG CC, CHOU CC (2010). Differential heat stability of amphenicols characterized by structural degradation, mass spectrometry and antimicrobial activity. *J Pharm Biomed Ana*, **153**:869-877.
- FSIS (1991). Ivermectin. In *Analytical Chemistry Laboratory Guidebook: Residue Chemistry*, pp. 1–38. Washington, DC: United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (FSIS).
- FTHENAKIS GC, PAPADOPOULOS E, HIMONAS C, LEONTIDES L, KRITAS S, PAPATSAS J(2000). Efficacy of moxidectin against sarcoptic mange and effects on milk yield of ewes and growth of lambs. *Veterinary Parasitol*, **87**:207–216.
- FURLANI RPZ, DIAS FFS, NOGUEIRA PM, GOMES FML, TFOUNI SAV, CAMARGO CMR (2014). Occurrence of macrocyclic lactones in milk and yogurt from Brazilian market. *Food Control*, **48**: 43-47.
- GÖKCEN A, ATALAY M (2012). Ette ve Sütte Paraziter İlaç Kalıntısı. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, **1(2)**:117-124.
- GUSTAFSON RH, BOWEN RE (1997). Antibiotic use in animal agriculture. *J Appl Microbiol*, **83 (5)**: 531-41.
- GÜVENÇ D (2008). Samsun yöresinden toplanan çiğ süt örneklerinde bazı pestisit kalıntılarının araştırılması, *Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun*.
- HAENLEIN G (2001). Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J Dairy Sci*. **84**: 2097–2115.
- HASSANI M, LAZARO R, PEREZ C, CONDON S, PAGAN R (2008). Thermostability of oxytetracycline, tetracyclines, and doxycycline at ultrahigh temperatures. *J Agric Food Chem*, **56**: 2676–2680.
- HAKK H, SHAPPELL N W, LUPTON S J, SHELVER W L, FANASELLE W, ORYANG D, YEUNG C Y, HOELZER K, MA Y, GAALSWYK D, POUÏLLOT R, VAN DOREN J M (2016). Distribution of Animal Drugs between Skim Milk and Milk Fat Fractions in Spiked Whole Milk: Understanding the Potential Impact on Commercial Milk Products, *J. Agric. Food Chem*, **64**: 326–335.
- ICH. (2005). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Current Step 4 Version. 2005, p: 17.
- IMPERIALE F, BUSETTI M, SUA' REZ V, LANUSSE C (2004). Milk excretion of ivermectin and moxidectin in dairy sheep: assessment of drug residues during cheese elaboration and ripening period. *J Agric Food Chem*, **52**: 6205–6211.
- IMPERIALE F, PIS A, SALLOVITZ J, LIFSCHITZ A, BUSETTI M, SUA' REZ V, LANUSSE C. (2006). Pattern of eprinomectin milk excretion in dairy sheep

unaffected by lactation stage: comparative residual profiles in dairy products. *J Food Prot.*, **69**: 2424–2429.

IMPERIALE F.A, FARIAS C, PIS A, SALLOVITZ J.M, LIFSCHITZ A, LANUSSE C (2009). Thermal stability of antiparasitic macrocyclic lactones milk Residues during industrial processing. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **26**:1, 57-62.

KAYA S, YAVUZ H, AKAR F, LİMAN BC, FİLAZİ A (1992). Mezbahadan sağlanan sığır et, karaciğer ve böbrek örneklerinde antibiyotik kalıntıları. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **39**(1-2):13-29.

KAYA S (2013). Antelmantikler. Ed: S. KAYA. In: *Veteriner Farmakoloji. Cilt 2. 5. Baskı Medisan Yayınevi, Seri No:75. Ankara*, s.469-525.

KAYA S, ÜNSAL A (2007). Besinlerdeki ilaç kalıntıları, *Uygulamalı Farmakoloji 3. Baskı, Editörler, Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Medisan Yayınevi, Ankara*, s.737-780.

KAYA S, ÜNSAL A. (2013). Besinlerdeki ilaç kalıntıları. Ed: S.KAYA. In: *Veteriner Farmakoloji. Cilt 2. 5.Baskı. Medisan Yayınevi, Seri No:75, Ankara*, s.701-728.

KELLNEROVÁ E, NAVRÁTILOVÁ P, BORKOVCOVÁ I, (2014). Effect of pasteurization on the residues of tetracyclines in milk, *ACTA VET. BRNO*, **83**: S21–S26.

LOBATO, V., S. RATH, AND F. G. REYES. (2006). Occurrence of ivermectin in bovine milk from the Brazilian retail market. *Food Addit. Contam.*, **23**: 668–673.

MACEDO F, MARSICO ET, CONTE-JÚNIOR CA, DE ALMEIDA FURTADO L. (2015). Short communication: Macrocyclic lactone residues in butter from Brazilian markets. *J. Dairy Sci.* **98**: 3695–3700.

MAGNUSSON, B., ORNEMARK, U. (2014). Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods—a laboratory guide to method validation and related topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978–91–87461-59-0.

MCKELLAR QA, BENCHAOUI HA. (1996). Avermectins and milbemycins. *J Vet Pharmacol Therap*, **19**: 331–351.

NØDTVEDT A, DOHOO I, SANCHEZ J, CONBOY G, DES COTEAUX L, KEEFE G. (2002). Increase in milk yield following eprinomectin treatment at calving in pastured dairy cattle. *Vet Parasitol*, **105**:191–206.

OZDEMİR N, KAHRAMAN T. (2016). Rapid confirmatory analysis of avermectin residues in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of food and drug analysis*, **24**: 90 e94.

ROSE MD, ARGENT LC, SHEARER G, FARRINGTON WH. (1995). The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 2. Levamisole. *Food Addit Contam.*, **12**: 185–194.

ROSE MD, SHEARER G, FARRINGTON WH. (1997). The effect of cooking on veterinary drug residues in food; 5. Oxfendazole. *Food Addit Contam.*, **14**:15–26.

- ROSE MD, FARRINGTON WH, SHEARER G. (1998). The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 7. Ivermectin. *Food Addit Contam.*, **15**: 157–161.
- SİRELİ UT, FİLAZİ A, CADİRCİ, O. (2006). Effect of cooking and storage times on gentamicin residues in eggs. *Ital J Food Sci*, **18**: 441-446.
- SLANINA P, KUIVINEN J, OHLSEN C, EKSTROM LG. (1989). Ivermectin residues in the edible tissues of swine and cattle: effect of cooking and toxicological evaluation. *Food Addit Contam.*, **6**: 475–481.
- SOUZA, S. S, CRUZ A. G, WALTER E. H. M, FARIA J. A. F, CELEGHINI R. M. S, FERREIRA M. M. C, GRANATO D, DE S. SANT'ANA A. (2011). Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. *Food Chem.*, **124**: 692–695.
- TEŞHİSTE METOT BİRLİĞİ (2016). Sütte Avermektin Grubu İlaç Kalıntılarının LC-MS/MS ile Analiz Metodu. *T.C.Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Yayınları*. Cilt 6. Sayfa:276-283.
- TOUTAIN PL, CAMPAN M, GALTIER P, ALVINERIE M. (1988). Kinetic and insecticidal properties of ivermectin residues in milk of dairy cows. *J Vet Pharmacol Therap*, **11**: 288–291.
- TRAUB, WH, LEONHARD B. (1995). Heat stability of the antimicrobial activity of sixty-two antibacterial agents. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1995; **35**: 149-154.
- WHO, 1988: Food Additives Series 23: Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, The 32nd Report Of The Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Additives, Cambridge University Press, Cambridge.
- WHO, 1999: Technical Report Series 888: Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fiftieth Report of The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO, Geneva.
- WHO, 2005: Guidelines on stiation analysis for public health pesticide management, World Health Organization, Genava.
- WALLER PJ, THAMSBORG SM. (2004). Nematode control in ‘green’ ruminant production systems. *Trends Parasitol*, **20**: 493–497.
- YARSAN E, KAYA S, (2005). Protozoon hastalıklarında kullanılan ilaçlar ve farmakolojik özellikleri, Editör: A.Burgu, Z.Karaer. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıklarında Tedavi. *Türkiye Parazitoloji Derneği*, Yayın No:19, İzmir, 321–400.
- ZORRAQUINO M. A., ALTHAUS R. L., ROCA M., MOLINA M. P., (2011). Heat reatment Effects on the Antimicrobial Activity of Macrolide and Lincosamide Antibiotics in Milk, *Journal of Food Protection*, Vol. 74, No. 2, Pages 311–315.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Burcu
Soyadı : AVCI
Doğum yeri ve tarihi : ANKARA - 1980
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
İletişim adresi ve telefonu : Gayret Mah. Ahmet Hikmet Sok. 3/10
Yenimahalle-Ankara

II- Eğitimi

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2005-2008)
Cerrahi ABD
Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (1998-2004)
Lise : Özel Arı Lisesi (1995-1998)
Ortaokul : Özel Arı Ortaokulu (1991-1995)
İlkokul : Gazi Osman Paşa İlkokulu (1986-1991)
Yabancı dili : İngilizce (YDS – 72.5, IELTS – 5.5)

III- Mesleki Deneyimi

Ankara Büyükşehir Belediyesi Kurtuluş Evcil Hayvan Barınağı (2006-2007)
Gıda Tarım ve Hayvancılık Bak. Rehberlik ve Teftiş Başkanlığı (2009-2013)
– Müfettiş Yardımcısı
Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü (2013- 2015)
Doping Kontrol Laboratuvarı – Veteriner Hekim
Tarım ve Orman Bakanlığı Rehberlik ve Teftiş Başkanlığı - Müfettiş
(2015-.....)

IV- Bilimsel Etkinlikleri

Makale: TÜZÜN B, SAĞLAM M. (2009). Kedilerin Yüksekten Düşme Sendromu, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **56**:193-199.

Makale: FILAZI, A., AVCI, B. (2018). Applications for the Prevention and Detoxification of Mycotoxins in the Food and Feed Industry, *International Journal of Scientific and Technological Research*, **Vol 4, No.10**: 26-31.

Tebliğ: AVCI, B., FILAZI, A.: Linking Endocrine Disrupters, Epigenetics and Biotechnology For Cancer In Animals, *First International Congress on Environment and Animal Health*, (2018)

Seminer: Türkiye’de ve Dünyada Doping Kontrolü

Kurul: Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Üyesi (2017-Halen)

Eğitimler: Temel İş Sağlığı ve Güvenliği Bilgilendirme Eğitimi (2013)

TS EN ISO/IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Yeterliliğinin Genel Şartları Eğitimi (2013)

Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Eğitimi (2013)

Avermektin Grubu İlaçların Analizi (2017)

GMP İyi Üretim Uygulamaları Temel Eğitimi (2018)

GMP Denetim Teknikleri Eğitimi (2018)

GMP’ye Uygun Temiz Oda Tasarımı ve HVAC Sistemleri Eğitimi (2018)