

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE  
TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ALABALIKLARDA HASAT ÖNCESİ VE HASAT  
DÖNEMİNDE YENİLEBİLİR DOKU  
ÖRNEKLERİNDE FLORFENİKOL  
KALINTILARININ ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sedat GÖKMEN**

**2013**

## ONAY SAYFASI

Doç.Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

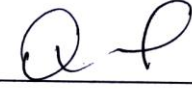


Prof.Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Gürdal DAĞOĞLU



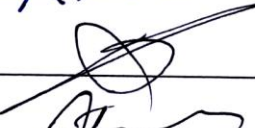
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Kadir SERVİ



Prof.Dr. Sadettin TANYILDIZI



Prof.Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN



Prof.Dr. Engin ŞAHNA



Prof.Dr. Gürdal DAĞOĞLU



# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo Listesi</b>	<b>i</b>
<b>Şekil Listesi</b>	<b>ii</b>
<b>Kısaltmalar Listesi</b>	<b>iii</b>
<b>Teşekkür</b>	<b>iv</b>
<b>1. Özet</b>	<b>v</b>
<b>2. Abstract</b>	<b>vi</b>
<b>3. Giriş</b>	<b>1</b>
3.1. Kimyasal Yapısı	<b>3</b>
3.2. Etki Spektrumu ve Antimikrobiyal Etkinliği	<b>4</b>
3.3. Etki Şekli	<b>5</b>
3.4. Farmakokinetik Özellikleri	<b>5</b>
3.4.1. Emilim ve Dağılımı	<b>5</b>
3.4.2. Metabolizma ve Atılımı	<b>5</b>
3.5. Kullanım Şekli ve Dozu	<b>6</b>
3.6. İstenmeyen Etkileri	<b>6</b>
3.7. İlaç Etkileşimleri	<b>6</b>
3.8. İlaç Kalıntı Arınma Süresi	<b>7</b>

<b>4. Gereç ve Yöntem</b>	<b>8</b>
4.1. Gereç	8
4.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	8
4.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	8
4.1.3. Hayvan Materyali	9
4.2. Yöntem	9
4.2.1. Standart Hazırlama	9
4.2.2. Ekstraksiyon ve Yıkama İşlemi	10
4.2.3. HPLC Sistem	10
4.3. İstatistiksel Analizler	11
<b>5. Bulgular</b>	<b>12</b>
<b>6. Tartışma</b>	<b>16</b>
<b>7. Kaynaklar</b>	<b>20</b>
<b>8. Özgeçmiş</b>	<b>23</b>

## Tablo Listesi

### Sayfa No

<b>Tablo 1:</b> Hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıklarda doku florfenikol miktarları ( $\mu\text{g/g}$ )	<b>13</b>
<b>Tablo 2:</b> İşletmelerdeki hasat öncesi dönem alabalık dokularında belirlenen florfenikol miktarının en alt ve en üst düzeyleri ( $\mu\text{g/g}$ ).	<b>14</b>
<b>Tablo 3:</b> İşletmelerdeki hasat dönemi alabalık dokularında belirlenen florfenikol miktarının en alt ve en üst düzeyleri ( $\mu\text{g/g}$ ).	<b>14</b>

## Şekil Listesi

### Sayfa No

<b>Şekil 1:</b> Florfenikolün kimyasal yapısı.	<b>4</b>
<b>Şekil 2:</b> Hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıklarda doku florfenikol miktarları ( $\mu\text{g/g}$ ).	<b>12</b>
<b>Şekil 3:</b> İşletmelerdeki hasat öncesi dönem alabalıkların yenilebilir dokularındaki florfenikol miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ).	<b>15</b>
<b>Şekil 4:</b> İşletmelerdeki hasat dönemi alabalıkların yenilebilir dokularındaki florfenikol miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ).	<b>15</b>

## **Kısaltmalar Listesi**

HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
FÜBAP	Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

## **Teşekkür**

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve hoşgörüsünü eksik etmeyen ve her türlü yardımını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU' na, analizlerin yapılmasında laboratuvar imkânı sağlayan ve bilimsel olarak yardımlarını esirgemeyen Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, deneysel çalışmalarım sırasında emeği geçen Dr. Burcu GÜL BAYKALIR' a ve beni bugünlere getiren aileme, sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını VF.12.02 no' lu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimi' ne teşekkür ederim.



## 1. ÖZET

Hayvanlarda bakteriyel hastalıkların sağaltımı amacıyla kullanılan amfenikoller grubunda yer alan florfenikolün alabalıklarda yenilebilir dokularındaki (deri, kas ve karaciğer) kalıntı miktarının araştırıldığı bu çalışmada; Elazığ' daki beş farklı alabalık işletmesinden 25 adet hasat öncesi ve 25 adet hasat dönemine ait toplam 50 adet alabalık kullanılmıştır. Numunelerdeki florfenikol düzeyleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Analizler sonucunda hasat öncesi dönemdeki alabalıkların deri dokusunun %44' ünde, kas dokusunun %32' sinde ve karaciğer dokusunun %16' sında florfenikol saptanmıştır. Ayrıca hasat dönemindeki alabalıkların deri dokusunun %40' unda, kas dokusunun %36' sında ve karaciğer dokusunun %32' sinde florfenikol saptanmıştır. Hasat öncesi kas dokusundaki florfenikol miktarının ( $3,52 \pm 0,89$ ) hasat dönemindeki kas dokusundan ( $0,69 \pm 0,21$ ) istatistiksel olarak daha yüksek olduğu ( $p < 0,05$ ), deri ile karaciğer dokularında ise istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ). Hasat öncesi alabalıkların deri, kas ve karaciğer dokularındaki florfenikol miktarı ile hasat dönemindeki alabalıkların deri, kas ve karaciğer dokularındaki florfenikol miktarı arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ).

Çalışma sonucunda gerek hasat öncesi ve gerekse hasat dönemindeki alabalıkların yenilebilir dokularındaki (deri, kas ve karaciğer) florfenikol ortalama miktarlarının Türk Gıda Kodeksi Tebliğindeki kalıntı limitinin ( $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) üzerinde olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Florfenikol, alabalık, kalıntı, HPLC.

## 2. ABSTRACT

### Florfenicol Residue Investigation on Edible Trout Samples at Preharvest and Harvest Period

In this study that investigated florfenicol residues from amfenicols drug group used for bacterial disease treatment on edible trout tissues (skin, muscle and liver tissue) were used 25 pieces of trout at harvest period and 25 pieces of trout at preharvest period total of 50 trout different five trout facilities at Elazığ. Florfenicol residue of the samples were examined by high performance liquid chromatography (HPLC).

As a result of analysis of, florfenicol was detected in 44% of skin tissue, 32% of muscle tissue and 16% of liver tissue of the preharvest period trout. In addition, as a result of analysis of the harvest period trout florfenicol was detected in 40% of skin tissue, 36% of muscle tissue and 32% of liver tissue samples. Florfenicol residue of muscle tissue at pre-harvest found to be significantly higher ( $3,52 \pm 0,89$ ) comparing to at harvest period ( $0,69 \pm 0,21$ ) ( $p < 0.05$ ) and there was no statistically significant difference in skin and liver tissues. Between residue of florfenicol at skin, muscle and liver tissue samples collected from trout at preharvest period and skin, residue of florfenicol at muscle and liver tissue samples collected from trout at harvest period no statistically significant difference was found ( $p > 0.05$ ).

As a result of study mean florfenicol residue at edible tissue samples (skin, muscle and liver) collected from trout at preharvest period as well as edible tissue

samples collected from trout at harvest period found to be over according to Turkish Food Codex Communique residue limit (1000 µg/kg).

**Keywords:** Florfenicol, trout, residue, HPLC.

### 3. GİRİŞ

Bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de beyaz et olarak balık ve tavuk eti tüketimi daha sağlıklı ve ucuz olmaları nedeniyle kırmızı ete tercih edilir bir duruma gelmiştir. Gerek düşük miktarda yağ ve yağ doku içermesi ve gerekse de A, D vitaminleri ile demir, fosfor ve kalsiyum bakımından zengin olması balığın besin değerini artırmaktadır. Başta alabalık olmak üzere birçok balık türü yüksek oranda (%60-80) doymamış yağ asitleri ve omega 3 ile kanın pıhtılaşmasını önleyen tromboksan içermesinden dolayı insanlarda kalp-damar hastalıklarının oluşma riskini azaltmaktadır. Kişi başına tüketilen balık miktarları Avrupa'da ortalama 22 kg ve dünyada 14 kg olmasına karşın ülkemizde bu miktar henüz 8,5 kg olarak oldukça düşük seviyelerde kalmaktadır (1-4).

Dört etrafı sularla çevrili ülkemizde gerek denizlerimizde gerekse de iç sularımızda yeterli düzeyde balık üretimi yapılamamaktadır. Ülkemizin bir çok bölgesi iklimsel, ekolojik ve teknik özellikleri bakımından başta iç su balıkçılığı olmak üzere büyük bir potansiyele sahiptir ve çeşitli üretim alanlarını geliştirme kapsamında balık üretimine ve dolayısıyla tüketiminin artırılmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır (5).

Balık yetiştiriciliğinde sularda meydana gelen kirliliğe bağlı olarak su kalitesinde azalma ve hatalı besleme bir çok hastalığın görülmesine neden olabilmektedir. Yakın geçmişe kadar balıklar için sadece 15-20 bakteri türü patojen özellik gösterirken, son yıllarda enfekte balıklarda 70' e yakın patojen bakteri türü izole edilmiştir. Çeşitli nedenlerle ortaya çıkan bu hastalıklarla mücadelede antibakteriyel ilaç kullanımı kaçınılmaz olmuştur (6-8).

Antibiyotiklerin yetiştiricilikte kullanılması başta hayvansal gıdalar olmak üzere, insan sağlığı açısından da ciddi tehlikeleri ortaya çıkarabilmektedir. Uygulanan ilaçlar başta böbrek, karaciğer ve kas olmak üzere çeşitli organ ve dokularda birikebilmektedir. Böylece ilaç kalıntısı içeren gıdaları tüketen insanlarda alerjik reaksiyonlar, toksik belirtiler, üreme bozuklukları, bağırsak florasında değişiklikler ile dirençli bakterilerin gelişimi gözlenebilmektedir. Dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olan antibiyotiğin etkinliği azalmakta, buna bağlı olarak ilaç kullanımını daha da artmaktadır (9).

Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)' nin balıklarda kullanılmak üzere onayladığı çok az sayıda antibakteriyel ilaç bulunmaktadır. Balık hastalıklarında kullanılmak üzere onay verilen başlıca antibiyotikler; penisilinler, oksitetrasiklin, kotrimaksazol ve sülfamerazindir. Ancak, farklı ülkelerde bakteriyel balık hastalıklarında bunlara ek olarak kullanılmasına izin verilen antibiyotikler içerisinde florfenikol, kloramfenikol, eritromisin ve ampisilin bulunmaktadır (3, 10).

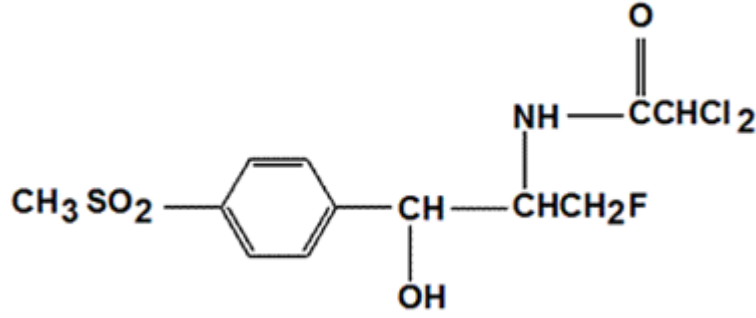
Florfenikol geniş antibakteriyel spektruma sahip, amfenikol grubuna bağlı bir antibiyotiktir. Bu grupta florfenikol, kloramfenikol, tiamfenikol ve azidamfenikol bulunmaktadır (11-13). Yapısal olarak kloramfenikole benzemesine karşın, antibakteriyel etkinliği kloramfenikolden daha üstündür. Ayrıca, kloramfenikole dirençli bakterilere etkili olması ve istenmeyen etkilerinin az olmasından dolayı hayvan hastalıklarının tedavisinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Kloramfenikol ve florfenikol arasında kimyasal yapı yönünden önemli iki farklılık vardır. Bunlardan ilki, kloramfenikolde bulunan para-nitro yerine florfenikolde p-metil sülfonil grubunun olması, ikincisi ise hidroksil

grubundaki 3. karbon atomunda birincil alkol yerine flor atomunun bulunmasıdır. Molekül yapısında flor atomu olması nedeniyle ilaca karşı bakterilerde daha zor direnç şekillenmekte ve kemik iliği baskılanmamaktadır. Bu nedenle de besin değeri olan hayvanlarda güvenle kullanılmaktadır (14-16).

Gıdalardaki veteriner ilaç kalıntılarına bağlı olarak, bakteriler arasında çoklu direnç özelliğinin gelişmesi ve bu direncin patojen bakterilere aktarılması sonucu, insanlarda çoğu kez antibiyotik tedavisine cevap alınamamaktadır. Bu durum, daha fazla antibiyotik kullanımına yol açarak, hem toplum sağlığını hem de ülke ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir. Bunun için, ilaç verilen hayvanlarda ilacın vücuttan arınma süresine uyularak kesimlerin yapılması sağlanmalı ve beraberinde bilimsel bir kalıntı izleme planının geliştirilerek, etkili bir biçimde uygulanması için devletin sıkı kontrol önlemleri alması gerekmektedir. İlaç verilmiş hayvanların gıda üretiminde kullanılma durumu, veteriner hekimler tarafından ilgili kanunlara uygunluk yönünden izlenerek, hayvan yetiştiricilerinin de bu konuda bilinçlendirilmesi sağlanmalıdır (17-19).

### **3.1. Kimyasal Yapısı**

Florfenikol *Streptomyces venezuela'* nın fermantasyonuyla üretilen kloramfenikolden sentez edilmiştir. Molekül ağırlığı 358.21 olan florfenikolün kimyasal formülü  $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$ ' dir ve açık formülü **Şekil 1'** de gösterilmiştir. (11-13, 20).



Şekil 1: Florfenikol' ün kimyasal yapısı (20).

### 3.2. Etki Spektrumu ve Antimikrobiyal Etkinliği

Bakteriyostatik etkili ve geniş etki spektrumuna sahip olan florfenikol hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere ve özellikle anerob bakterilere karşı etkilidir (11, 20, 21). Özellikle alabalıklarda kızıl ağız hastalığı (*Yersinia ruckeri*), Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*), ülser hastalığı (*Haemophilus piscium*), bakteriyel hemorajik septisemi (*A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. sobria*, *Pseudomonas spp.*), soğuk su vibriozisi (*Vibrio salmonicida*), yavru gökkuşağı alabalık sendromu (*Cytophaga psycrophila*), kolumnaris hastalığı (*Flexibacter columnaris*), *Lactococcus spp.*' lerin neden olduğu hastalıklarda; çipura ve levreklerde; Vibriozis (*Vibrio anguillarum*, *V. Alginolyticus*, *V. Ordalii*; *V. Vulnificus*) Pasteurellosis (*Photobacterium damsela subsp.*, *Piscidida*), Myxobacter septisemi (*Flexibacter spp.*, *Cytophaga spp.*) gibi hastalıklarda kullanılmaktadır. En küçük etkili yoğunluğu (EKEY)  $\leq 2$  µg/ml olan bakteriler florfenikole duyarlı olarak kabul edilmektedir ve bu yönden hem kloramfenikolden hem de tiamfenikolden daha etkindir (11, 15, 20-22).

### **3.3. Etki Şekli**

Duyarlı bakterilerin 50S ribozomal alt ünitelerine bağlanmakta ve peptidil transferazın inhibisyonuna yol açmaktadır. Böylece aminoasitlerin peptid zincirlerine bağlanmasını engellemekte ve sonuçta bakteriyel protein sentezini önleyerek bakteriostatik etki göstermektedir (14, 23).

### **3.4. Farmakokinetik Özellikleri**

#### **3.4.1. Emilim ve Dağılım**

Florfenikol 5-15°C' lik sıcaklıktaki suda yaşayan balıklara oral yolla uygulandığında iyi emilir (oral biyoyararlanımı %96.5), yarı ömrü 12 saat, plazma proteinlerine bağlanma oranı ise düşüktür (%10-20). Dokulara iyi geçebilen bir antibiyotik olmasından dolayı alabalıkların sistemik enfeksiyonlarında güvenilir bir şekilde kullanılabilir. Yağda çözünürlüğü düşük olduğundan kas içi uygulamalarda emilim daha yavaştır. Kas içi veya deri altı yolla verildikten sonra vücutta beyin omurilik sıvısı da dahil tüm kesimlere iyi girer ve etkili yoğunluk sağlar. 10°C' lik sıcaklıktaki suda yaşayan balıklara 10 mg/kg dozda oral yolla verildiğinde 10.3 saat içerisinde 4 µg/L' lik maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır (3, 5, 12, 15, 22, 24-26).

#### **3.4.2. Metabolizma ve Atılımı**

Oral yolla uygulandığında sindirim kanalından hızla emilerek, kan dolaşımı ile vücut dokularına yayılmaktadır. Hızla metabolize edilerek büyük ölçüde (%65) değişmemiş halde, kalanı da florfenikolalkol ve monokloroflorfenikol metabolitlerine dönüşmekte ve daha sonra bu iki metabolit florfenikolamin şeklinde vücuttan atılmaktadır. Atılımın %60-70' i idrarla, %20-



30' u safra yoluyla olmaktadır. Atılma yarı ömrü 18-20 saat arasındadır; bu sebeple, sağaltım dozlarının 36-48 saat arayla tekrarlanması etkili plazma ilaç yoğunluğunun sürdürülmesi için yeterli olabilmektedir. İdrarda değişmemiş ilaç oranının yüksek olması idrar yolları hastalıklarında oldukça etkili olmasını sağlamaktadır. Etkili yoğunluklarda süte geçebilmektedir ve sistemik olarak meme hastalıklarının sağaltımında kullanılabilir (11, 12, 15, 20, 24, 25, 27, 28).

### **3.5. Kullanım Şekli ve Dozu**

İlaçlı yemin oranı suyun sıcaklığı ve balıkların canlı ağırlığına göre değişebilmektedir. Alabalıklardaki farmakolojik dozu 10 mg/kg canlı ağırlık olup 10 gün süre ile balık yemlerine katılarak uygulanmaktadır (12, 26, 29, 30).

### **3.6. İstenmeyen Etkileri**

Balıklara terapötik dozun 1, 5 ve 10 katı dozlarda 10 gün süreyle verilmesi iyi tolere edebilmektedirler (26).

### **3.7. İlaç Etkileşimleri**

Amfenikoller, linkozamidler (linkomisin, klindamisin, pirlimisin), makrolidlerle (eritromisin, tilozin, tilmikosin, tulatromisin) ve beta-laktamlar (penisilinler, sefalosporinler) ile birlikte kullanılmaları durumunda antagonizmaya yol açmaktadırlar. Aminoglikozidler (amikasin, gentamisin, kanamisin, neomisin), kinolonlar (danofloksasin, difloksasin, enrofloksasin), nitrofuranlar (furazolidon, nitrofurantoin) polipeptitler (basitrasin), rifamisinler (rifalsamin,

rifampin) ve sülfonamidler (sülfadimidin, sülfadiazin) ile birlikte kullanılabilir (27, 31-33).

### **3.8. İlaç Kalıntı Arınma Süresi**

Su ürünlerinde kalıntı kontrolü yapılacak antibiyotikler içerisinde florfenikol yer almaktadır. Florfenikol ve florfenikolamin olarak bilinen metabolitlerinin toplamı hedef organdaki (deri ve kas doğal oranlarında) maksimum kalıntı limiti 1000 µg/kg' dır (34). Balıklarda bekletme süresi 500 derece gün birimi dikkate alınarak, ortam ısısına bölünerek balığın bekletme süresi belirlenmektedir. Su ısısı arttığında ilacın vücuttan atılımı hızlanmaktadır. 5°C' den daha düşük sıcaklıklarda bekleme süresi 15 gün, 10°C' de 7 gündür (34-36).

Bu çalışma Elazığ' daki 5 farklı alabalık işletmesindeki alabalıkların yenilebilir dokularındaki (deri, kas ve karaciğer) florfenikol kalıntı miktarlarını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

## 4. GEREÇ ve YÖNTEM

### 4.1. Gereç

#### 4.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetonitril (Sigma-Aldrich, Fransa)

Diklorometan (Sigma-Aldrich, Fransa)

Florfenikol (Indukern, Hong Kong)

Hekzan (Merck, Almanya)

Metanol (Sigma-Aldrich, Fransa)

Potasyum fosfat monobazik (Merck, Almaya)

Sodyum fosfat dibazik (Merck, Almaya)

#### 4.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Balon joje (Isolab)

Beher (Isolab)

Bidistile su cihazı (GFL 2104)

Cam tüp 16x100mm (Isolab)

Erlen (Isolab)

Hassas terazi (Denver Instrument Apx-153)

Kolon C18 Nucleosil 100-5C18, 25 cm x 3.2 mm, 5µm (Supelco)

Mavi ve sarı pipet ucu (Isolab)

Mikro enjektör 1-10 µl (Hamilton)

Otomatik pipet (Introlab)

Sıvı kromatograf viyalleri 2 ml (Chromacol)

Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 320AR)

Soğutucu -20°C (Arçelik 2553 D)

Su banyosu (Nüve NB9)

Vortex (Velp Scientifica 10.0176)

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi LC-20 AT (Schimadzu)

#### **4.1.3. Hayvan Materyali**

Elazığ' daki 5 farklı alabalık işletmesinden 25' er adet hasat öncesi (yaklaşık 100 g ağırlığında) ve hasat dönemi sırasında (yaklaşık 250 g ağırlığında) toplam 50 adet alabalık toplandı. Toplanan bu alabalıklar analiz edilinceye kadar - 20 °C' de muhafaza edildi.

#### **4.2. Yöntem**

##### **4.2.1. Standart Hazırlama**

Standart florfenikolden aseton/su (40/60 oranında) çözücüleri kullanılarak hazırlanan 4 µg/ml' lik stok solüsyonundan 0.8, 10, 40 ve 80 ng/ml olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlandı.

#### 4.2.2. Ekstraksiyon ve Yıkama İşlemi

Dokularda florfenikol ekstraksiyon ve yıkama işlemleri Jeffery ve ark. (24) tarafından önerilen metoda göre yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda yöntemin saptama limitinin 0.1 ng/g doku, geri kazanımının ise yaklaşık %80 olduğu bulunmuştur.

Her alabalıktan 2 g deri, 2 g kas ve 200 mg karaciğer dokusu numuneleri alındı. Santifüj tüpü içerisindeki doku numunelerinin her 2 g numune için 2.8 ml distile su ilave edilerek homojenize edildi. Bu homojenata 3.2 ml aseton eklenerek vortekslendi. Daha sonra numuneler + 4°C' de 1500 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttan 4 ml alınarak başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 3 ml diklorometan ilave edilerek vortekslendi. + 4°C' de 1000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası diklorometanlı tabaka 45 °C' de yaklaşık 40 dk kurutulmaya bırakıldı. Kuruyan analite 1 ml 0.1' lik asetik asit solüsyonu ilave edildi ve 2 ml hekzan ile ekstrakte edildi. Daha sonra + 4°C' de 1000 rpm 5 dk santrifüj edilerek hekzan tabakası atıldı. Bu işlem tamamlandıktan sonra HPLC viyaline aktarılıp 20 µl HPLC' ye enjekte edildi.

#### 4.2.3. HPLC sistem

Florfenikol için Pouliquen ve ark (12) çalışmasındaki mobil faz kullanıldı. Bu mobil faz karışımı; 820 ml fosfat buffer (0,05 M, pH 7.3) ve 180 ml metanol' den oluşmaktadır. Mobil fazın akış hızı dakikada 0.8 ml ve kolon fırını 27°C olacak şekilde ayarlanarak numuneler sisteme pompalandı. Analizler eksitasyon dalga boyu 265 nm, emisyon dalga boyu 295 nm olarak ayarlanan floresan

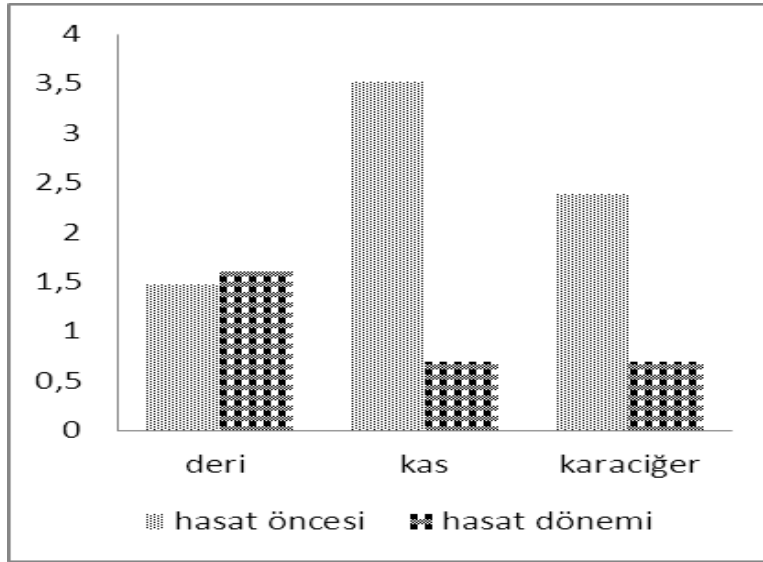
dedektörlü HPLC' ye 20 µl enjekte edilerek standart ve numunelerdeki pikler ile geliş zamanlarına ait kromotogram görüntüleri kaydedildi.

### **4.3. İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel değerlendirmeler 'SPSS for Windows 11.5' paket programı kullanılarak yapıldı. Hasat öncesi ve hasat dönemi balıkların doku florfenikol değerleri parametrik olmayan test varsayımlarını karşıladığı için Mann Witney U testi yapıldı. Ayrıca, her grup kendi içerisinde dokular arasındaki farklılıklar için Kruskal Wallis testi yapıldı. Sonuçlar  $\pm$  standart hata (SH) olarak ifade edildi ve  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak farklı kabul edildi.

## 5. BULGULAR

Analizler sonucunda hasat öncesi dönemdeki alabalıkların deri dokusunun %44' ünde, kas dokusunun %32' sinde ve karaciğer dokusunun %16' sında florfenikol saptanmıştır. Ayrıca hasat dönemindeki alabalıkların deri dokusunun %40' ında, kas dokusunun %36' sında ve karaciğer dokusunun %32' sinde florfenikol saptanmıştır. Hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıklarda doku florfenikol miktarları **Şekil 2'** de gösterilmiştir.



**Şekil 2:** Hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıklarda doku florfenikol miktarları (µg/g).

Hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıklarda dokularda belirlenen ortalama florfenikol miktarları **Tablo 1'** de gösterilmiştir. Ayrıca, işletmelerdeki hasat öncesi ve hasat dönemi alabalık dokularında belirlenen florfenikol miktarının en alt ve en üst düzeyleri **Tablo 2 ve 3'** te gösterilmiştir. İşletmelerdeki hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıkların dokularındaki florfenikol miktarları **Şekil 3 ve 4'** te sunulmuştur.

Hasat öncesi alabalıkların kas dokusundaki ortalama florfenikol miktarının ( $3,52 \pm 0,89 \mu\text{g/g}$ ) hasat dönemindeki alabalıkların kas dokusundan ( $0,69 \pm 0,21 \mu\text{g/g}$ ) istatistiksel olarak daha yüksek olduğu ( $p < 0,05$ ), deri ile karaciğer dokularında ise istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ).

Hasat dönemindeki alabalıkların deri, kas ve karaciğer dokuları arasında da istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ). Hasat öncesi alabalıkların deri, kas ve karaciğer dokularındaki florfenikol miktarı ile hasat dönemindeki alabalıkların deri, kas ve karaciğer dokularındaki florfenikol miktarı arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 1:** Hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıklarda doku florfenikol miktarları ( $\mu\text{g/g}$ ).

<b>Dokular</b>	<b>Hasat Öncesi</b>	<b>Hasat dönemi</b>
<i>Deri</i>	$1,48 \pm 0,37^{\text{Aa}}$	$1,61 \pm 0,65^{\text{Aa}}$
<i>Kas</i>	$3,52 \pm 0,89^{\text{Ab}}$	$0,69 \pm 0,21^{\text{Aa}}$
<i>Karaciğer</i>	$2,39 \pm 1,09^{\text{Aa}}$	$0,70 \pm 0,15^{\text{Aa}}$

Aynı sütunda yer alan A harfi ile gösterilen gruplar arası fark önemsizdir ( $p > 0,05$ ).

Aynı satırda yer alan a, b harfleri ile gösterilen gruplar arası fark önemlidir ( $p < 0,05$ ).

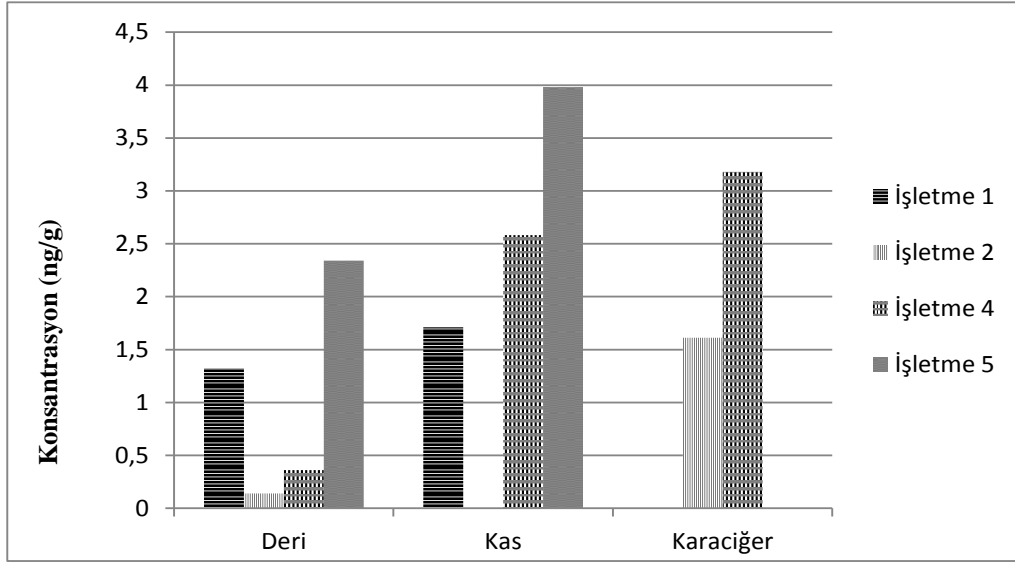


**Tablo 2:** İşletmelerdeki hasat öncesi dönem alabalık dokularında belirlenen florfenikol miktarının en alt ve en üst düzeyleri ( $\mu\text{g/g}$ ).

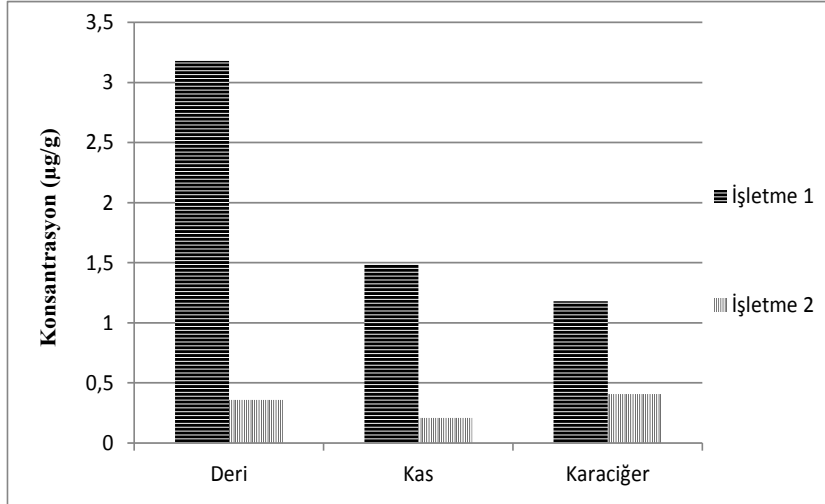
Doku	İşletme 1	İşletme 2	İşletme 3	İşletme 4	İşletme 5
Deri	0-1,32	0-1,48	0	0-0,36	1,03-3,84
Kas	0-1,71	0	0	0-3,52	2,04-9,60
Karaciğer	0	0-2,50	0	0-5,46	0

**Tablo 3:** İşletmelerdeki hasat dönemi alabalık dokularında belirlenen florfenikol miktarının en alt ve en üst düzeyleri ( $\mu\text{g/g}$ ).

Doku	İşletme 1	İşletme 2	İşletme 3	İşletme 4	İşletme 5
Deri	0,69-6,96	0,25-0,57	0	0	0
Kas	0-1,88	0,09-0,38	0	0	0
Karaciğer	0-1,51	0,19-0,52	0	0	0



**Şekil 3:** İşletmelerdeki hasat öncesi dönem alabalıkların yenilebilir dokularındaki florfenikol miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ).



**Şekil 4:** İşletmelerdeki hasat dönemi alabalıkların yenilebilir dokularındaki florfenikol miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ).

## 6. TARTIŞMA

Veteriner hekimlikte özellikle gıda değeri olan hayvanlarda antibakteriyel ilaçlar ve özellikle florfenikol kullanımı önemli bir yere sahiptir. Çünkü son yıllarda kültür balıkçılığında dirençli bakteri prevalansında görülen artışlar enfeksiyona bağlı hastalıklarının tedavisinde florfenikolü oldukça önemli kılmaktadır (37-39).

Bu çalışmada, Elazığ ilindeki alabalık işletmelerinde florfenikolün kalıntı düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla 5 farklı alabalık işletmesinden 25 adet hasat öncesi, 25 adet hasat dönemine ait toplam 50 adet balık numunesi toplanmıştır. Alabalıkların deri, kas ve karaciğer doku örnekleri floresan dedektör kullanılarak HPLC' de analiz edilmiştir.

Yapılan analizlerde hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıkların deri, kas ve karaciğer dokularında florfenikolün her iki dönemde de belirlenen limitlerin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Türk Gıda Kodeksine göre balık numunelerinde bulunmasına izin verilen en yüksek florfenikol limitleri 1µg/g doku olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada hasat dönemine göre hasat öncesi dönemde daha yüksek bulunmuştur. Hayvansal gıdalarda deri dokusu genellikle insanlar tarafından tüketilmemesine karşın, balık tüketiminde bu durum farklılık gösterebilmektedir. Çünkü özellikle küçük balıklar genellikle derisiyle birlikte tüketilen canlılardır. Derinin bağ dokudan zengin olması, balıklarda ilaca ilk maruz kalan bölge oluşu ve diğer nedenlere bağlı olarak kalıntı miktarlarının yüksek düzeylerde olması kaçınılmazdır. Balık hastalıklarında birçok hastalığın balık yetiştiriciliğinde erken dönemlerde gözüktüğü bilinmektedir. Hasat öncesi

döneme göre hasat döneminde deri dokusunda fazla miktarda florfenikol düzeylerine rastlanması deride birikim göstermesi ile açıklanabilir.

Kalıntı düzeylerine bakıldığında hasat öncesi ve hasat dönemlerine ait kas dokusu florfenikol düzeylerinin sırasıyla ortalama 3,52 ve 0,69  $\mu\text{g/g}$  doku olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde karaciğerde ise bu değerlerin sırasıyla 2,39 ve 0,70  $\mu\text{g/g}$  doku olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar analiz edildiğinde hasat öncesi ve hasat dönemi kas, deri ve karaciğer dokularında belirlenen limitlerin üzerinde olduğu görülmektedir. Balık yetiştiriciliğinde florfenikol veya diğer birçok antibiyotik yavru dönemlerde görülebilen hastalıkların sağaltımında kullanılmaktadır. Hasat öncesi kas ve karaciğerde daha yüksek olması bu dönemlerde antibakteriyel ilaç kullanımının daha yaygın olduğu ve bu dokularda birikim gösterebileceği kanaatine varılmıştır. Hasat dönemlerine yakın zamanlarda hem hastalıkların hem de ilaç kullanımının azalması sonucu işletmelerden alınan balıkların kas ve karaciğer dokularında florfenikol düzeylerinin daha düşük düzeylerde olduğunu göstermektedir. Tatlı su tilapalarına oral yolla 5 mg/ml florfenikol uygulamasından 24 saat sonra kas dokusunda 1,60  $\mu\text{g/g}$ , karaciğer dokusunda 1,69  $\mu\text{g/g}$  olarak tespit edilmiştir (29). Bu çalışmadan elde edilen kas ve karaciğer dokusundaki florfenikol miktarları yukarıdaki araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırıldığında florfenikolün hasat öncesi dönemlerde numunenin alındığı günlerde kullanıma ihtimalini göstermektedir. Oysa hasat döneminde bulunan düzeylerin ise yukarıdaki araştırmacının sonuçlarına göre karşılaştırıldığında çok daha erken dönemlerde kullanıldığını göstermektedir.

Pinault ve ark. (35) 10°C’ de taze su gökkuşuğu alabalıklarına 10 mg/kg/gün dozunda florfenikol verildiğinde kas dokusu rezidü seviyeleri 1, 3, 8 ve 15 gün sonunda sırasıyla  $3.37 \pm 1.17$  ppm,  $1.08 \pm 0.54$  ppm,  $0.21 \pm 0.11$  ppm ve  $0.15 \pm 0.05$  ppm olarak bulmuştur. Yine yapılan bir çalışmada 10°C’ de Atlantik salmonlarda florfenikol uygulamasından sonraki 3. saat, 12. saat, 1.gün, 3. gün ve 7. gün kasdaki miktarları sırasıyla  $7.59 \pm 1.39$  ppm,  $7.90 \pm 2.23$  ppm,  $6.71 \pm 0.69$  ppm,  $2.24 \pm 0.78$  ppm ve  $1.31 \pm 1.25$  ppm bulunmuştur (40). Tarafımızdan yapılan bu çalışmada kas dokusu florfenikol düzeylerinin sadece 2 işletmede tespit edilmesi florfenikolün özellikle hasat öncesi dönemlerde kullanılma ihtimalini doğurmaktadır. Elde edilen bulgular yukarıdaki araştırmacıların görüşleriyle paralellik göstermektedir.

Türk Gıda Kodeksindeki kalıntı limitlerine bakıldığında balıklarda florfenikol ve en önemli metaboliti olan florfenikolamin kalıntısının kas ve deri dokusunda toplam 1000 µg/kg olabileceği bildirilmiştir (34). Literatür bilgilerine göre toplam miktarın %65 i florfenikol, %35 ise florfenikolamin şeklinde metabolize edildiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada 10°C’ deki balıklarda uygulamadan 1 gün sonrası florfenikolamin konsantrasyonu deri ve kas dokusunda sırasıyla 9770 µg/kg ve 6710 µg/kg bulunmuştur. Uygulamadan 7 gün sonra bu düzey deride 930 µg/kg, kas dokusunda 1310 µg/kg’ a düşmüştür (26). Bu çalışmada balık dokularında sadece florfenikol düzeyleri belirlenmiştir. Metaboliti olan florfenikolamin düzeylerinin analizleri yapılamadığından kalıntı miktarlarının hesaplanmasında metabolit miktarı olan %35’ lik kısım dahil edilmemiştir. Bu bakımdan yapılan analizler sonucunda hasat öncesi alabalıkların kas, deri ve karaciğer dokularında sadece florfenikol miktarları bile Türk Gıda

Kodeksi' ndeki limitlerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Hasat dönemindeki alabalıkların ise deri, kas ve karaciğer dokularındaki florfenikol miktarı Türk Gıda Kodeksi limitinden daha yüksek olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, toplamda 5 işletmeden temin edilen numunelerden 2 işletmede hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıklarında florfenikolün kullanıldığı, hasat öncesi alabalıklarda daha yoğun kalıntılara rastlanıldığı, ancak, hasat döneminde hasat öncesi döneme göre daha düşük seviyelerde olduğu tespit edilmiştir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Arda M, Seçer S, Sarıyüpoğlu M. Balık Hastalıkları, Medisan Yayınevi 1. Baskı, Ankara, 2002.
2. Brown A. Understanding food, fish and shellfish, wadsworth/thoömsen learning. United States of America 2002, p:299-318.
3. Boyacıoğlu M. Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus Mykiss*) Rtf's' ye (Rainbow Trout Fry Syndrome) neden olan *Flavobacterium Psychrophilum* etkeninin izolasyonu ve antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi. Doktora Tezi, AYDIN: Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
4. DPT. Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, Su Ürünleri ve Su Ürünleri Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Devlet Planlama Teşkilatı: 2575 - ÖİK: 588, 2001.
5. Akşit D, Kum C. Gökkuşığı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)' nda sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2008; 19 (1): 1-7.
6. Munro ALS. The pathogenesis of bacterial diseases of fish. In: Microbial Disease of fish. Roberts RJ (Editor). Academic Press, London, 131-149.
7. Woo PTK, Bruno DW. Fish disease and disorders, Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, Oxfordshire, 1999.
8. Burka JF, Hammell KL, Horsberg TE et al. Drugs in salmonid culture- a review. J Vet Pharmacol Ther 1997; 20: 333-349.
9. Gustafson RH, Bowen RE. Antibiotic use in animal agriculture. J Appl Microbiol 1997; 83: 531-541.
10. Baydan E, Yurdakök B, Aydın FG. Balıklarda antibiyotik kullanımı. J Vet Sci 2012; 3(3).
11. Chou KY, Cheng TY, Chen CM et al. Simultaneous determination of residual thiamphenicol and florfenicol in foods of animal origin by HPLC/electrospray ionization-MS/MS. Journal of Aoac International 2009; 92(4): 1225-1232.
12. Pouliquen H, Morvan ML. Determination of florfenicol in freshwater, sediment and bryophyte *fontinalis antipyretica* by Hplc with fluorescence detection. Chromatographia 2005; 62: 225-231.
13. Mahmoudian M, Teyebi L, Falahati H, Dibazer S. Pharmacokinetics of florfenicol in young male calves using HPLC. Journal of Pharmaceutical Science and Technology 2010; 2(12): 432-435.
14. Cannon M, Harford S, Davies J. A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. Antimicrob Agents Chemother 1990; 26: 307-317.
15. Anadon A, Martinez MA, Martinez M et al. Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol-amine in chickens. J Agric Food Chem 2008; 56: 11049-11056.
16. Murray IA, Shaw WV. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. antimicrob. Agents Chemother 1997; 41: 1-6.
17. Can HY, Çelik TH. Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı ve kalıntı riski. Vet Hekim Der Derg 2008; 79(4): 35-40.

18. Doyle ME. Veterinary drug residues in processed meats-potential health risk. A Review of the Scientific Literature. 2006.
19. Gustafson RH, Bowen RE. Antibiotic use in animal agriculture. J Appl Microbiol 1997; 83: 531-541.
20. Vue C, Schmidt LJ, Stehly GR, Gingerich WH. Liquid chromatographic determination of florfenicol in the plasma of multiple species of fish. Journal of Chromatography B 2002; 780: 111-117.
21. Nagata T, Oka H. Detection of residual chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol in yellowtail fish muscles by capillary gas chromatography-mass spectrometry. J Agric Food Chem 1996; 44: 1280-1284.
22. Fukui H, Fujihara Y, Kano H. In vitro and in vivo antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens. Fish Pathol 1987; 22: 201
23. Long KS, Porse BT. A conserved chloramphenicol binding site at the entrance to the ribosomal peptide exit tunnel. Nucleic Acids Res 2003; 31: 7208-7215.
24. Jeffrey MVR, Ross AP, Melissa CF, Burns BG. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry. Journal of AOAC international 2003; 86(3): 510-514.
25. Scuka L. Florfenicol-pharmacodynamic, pharmacokinetics and clinical efficacy of oral formulations in domestic animals- A Systematic Review 2005; 615-619.
26. EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology). Florfenicol (extension to fish). Summary Report-5. 2000.
27. Kaya S. Kemoterapötikler. Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A. (Editörler). Veteriner uygulamalı farmakoloji. Cilt 2, 4. Baskı, Medisan, Ankara 2007.
28. Horsberg TE, Martinsen B, Varma KJ. The disposition of 14C- florfenicol in atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 1994; 122: 97-106.
29. Feng JB, Jia XP. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia After A single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. Aquaculture 2008; 276: 29-35.
30. Bektemuroğlu B, Şireli M. Kobaylarda kloramfenikol ve florfenikol' ün elektrokardiyogram üzerine etkisi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2011; 58: 155-160.
31. Goodman & Gilman' s The pharmacological basis of therapeutics, protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. Ed. Laurence L., 12. Baskı, 2010.
32. Kaya, S, Pirinçci İ, Bilgili A ve ark. Veteriner hekimliğinde farmakoloji. Medisan Yayınevi, 2002, 350-354.
33. Traş B, Yazar E, Elmas M. Veteriner İlaç. Nobel Matbaacılık, İstanbul 2009.
34. Türk Gıda Kodeksi Tebliği. Türk gıda kodeksi hayvansal gıdalarda bulunabilecek veteriner ilaçlarına ait farmakolojik aktif maddelerin sınıflandırılması ve maksimum kalıntı limitlerinin belirlenmesi hakkında tebliği (Tebliğ no: 2011/20), Resmi Gazete Tarihi: 29.04.2011 Resmi Gazete Sayısı: 27919 Mükerrer.



35. Pinault LP, Millot LK, Sanders PJ. Absolute oral bioavailability and residues of florfenicol in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Vet Pharmacol Ther* 1997; 20(1): 297-298.
36. Wrzesinski C, Crouch L, Gaunt P et al. Florfenicol residue depletion in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 2006; 253: 309-316.
37. Yasunaga N, Yasumoto S. Therapeutic effect of florfenicol on experimentally induced pseudotuberculosis in yellowtail. *Fish Pathol* 1988; 23: 1-5.
38. Nordmo R, Varma KJ, Sutherland IH, Brokken ES. Florfenicol in atlantic salmon, *Salmo salar* L: field evaluation of efficacy furunculosis in Norway. *J Fish Dis* 1994; 17: 239-244.
39. Powers TE, Varma KJ, Sutherland IH, Powers JD. Proceeding of the 4th congress of European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Budapest 1988.
40. Anonim. EMEA MRL 251/97- Final. <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/025197en.pdf>. 1997.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

18.06.1987 yılında Kastamonu' da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Kastamonu' da sırasıyla Sepetçiođlu İlköğretim Okulu, Merkez İlköğretim Okulu ve Orhan Şaik Gökyay Lisesi' nde tamamladıktan sonra 2005 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi' ne girdim ve 2010 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2010 yılının Eylül ayında F.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimime başladım ve 2012 yılının Ağustos ayında Amasya Üniversitesi Suluova Meslek Yüksekokulu' nun Laborant ve Veteriner Sağlık Programı' na Öğretim Görevlisi olarak atandım. Halen Suluova Meslek Yüksekokulu' nda Öğretim Görevlisi olarak görev yapmaktayım.