

HAYVANLARIN PIŞMEMİŞ YENİLEBİLİR DOKULARINDA SULFONAMİD
ANALİZİ

A. Nazım Özkazanç¹

Sezai Kaya²

Analysis of sulfonamides in uncooked edible tissues of animals

Summary: *A spectrophotometric-thin layer chromatographic procedure was made to adapt for the determination of sulfonamides in animal tissues. The sulfonamides were extracted from the tissues with mixture of chloroform-acetone (1 to 1). Extracting solvent was evaporated. Shaking with 1 N HCL, hexane and acetone, the residue was transferred to a separator funnel. Sulfonamides were partitioned to acid layer that was drawn off another separator funnel. Organic phase was reextracted with 1 N HCL and the acid extracts were combined. The solution was made basic and interfering materials were extracted from the basic solution with chloroform which was taken out. Then the solution was made acidic. The Bratton-Marshall reaction was developed. If pink-red color formed within 15 minutes after color reagent was added, samples would be positive. Produced sulfonamide dye was partitioned into n-butanol prior to spectrophotometry. The butanol extract was the applied thin layer chromatography plate to separate Bratton-Marshall reactants. Acetone + n-heptane + methanol + ammonium hydroxide + n-butanol (36 + 10.5 + 4.5 + 5 + 5) was used as mobil solvent system.*

The recovery experiments were carried out on liver, muscle and kidney samples of cattle and chicken. Sulfonamides were added to these samples at levels of 0.1, 0.5 and 1.0 ppm. Ninety three recovery analysis (consisting of 36 liver, 24 meat and 14 kidney samples of cattle, and 11 liver and 8 meat samples of chicken) were performed on the spiked samples to determine validity of the procedure.

It was calculated from the results of the recovery experiments that sulfonamides were recovered in excess of 85 %, with mean recovery of percent 90.6 ± 1.19 at the 0.1 ppm level, 89.7 ± 0.32 at the 0.5 ppm level and 90.8 ± 1.54 at the 1.0 ppm level. The control tissue samples read less than 0.04

1 Prof. Dr., A. Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji Toksikoloji Bilim Dalı. Ankara.

2 Dr. Med. Vet., A.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji-Toksikoloji Bilim Dalı. Ankara

ppm. It was found that as little as 0.1 ppm sulfonamide can easily be detected and identified in this fashion on a 10 gram tissue sample.

It is concluded that this procedure has some economical and reproducibility advantages and can be used quantitative and qualitative estimation of sulfonamides in animal tissues.

Özet: Hayvansal dokulardaki sulfonamid kalıntılarının analizi için bir spektrofotometrik-ince tabaka kromatografik metod uyarlaması yapıldı. Sulfonamidler dokulardan kloroform-asetondan oluşan karışımla ekstre edildiler. Sulfonamidler ekstraktan sıvı sıvı partitisonla sulu asit ortama alındılar. Çözelti alkali yapıldıktan sonra, kloroformla çalkalanarak interferens yapısı maddeler uzaklaştırıldı. Çözelti tekrar asitleştirildi ve Bratton-Marshall renk reaksiyonu geliştirildi. Renk ayırıcı katıldıktan sonra 15 dakika içinde pembe-kırmızı bir renk şekillenen numuneler sulfonamid kalıntıları bakımından pozitif kabul edilirler. Oluşan sulfonamidli boya maddesinin butanolle ekstre edildikten sonra, butanol ekstraktın absorbansı spektrofotometrede okundu. Daha sonra belli bir hacme kadar azaltıldıktan sonra, butanol ekstraktı ince tabaka kromatografisi plakasına uygulandı. Böylece reaksiyon ürünlerinin ayrılması başarıldı.

Çeşitli sulfonamid standartları kullanarak 36'sı dana karaciğeri, 24'ü dana kası ve 14'ü dana böbreği ile 11'i tavuk karaciğeri ve 8'i tavuk kas dokusundan olmak üzere toplam 93 rekoveri analizi yapıldı.

Kullanılan analiz yöntemiyle, ortalama % 90 oranında rezidü kazancı sağlandığı, 0.1 ppm'e kadar inen sulfonamid kalıntılarının belirlenebileceği, kontrol değerlerinin düşük olduğu, iyi sayılabilecek derecede tekrarlanabilir ve güvenilir olduğu sonucuna varıldı.

Giriş

Sulfonamidler, öncelikle ucuz ve geniş etki alanına sahip olmaları nedeni ile geçmişte ve günümüzde besin üretimi için yetiştirilen hayvanlarda hastalıklardan koruyucu ve sağıtıcı olarak geniş bir kullanılma alanı olan ilaçlardandır. Hayvanlara yemlerine, sularına katılarak veya parenteral olarak sağıtıcı yada daha az miktarlarda verilen sulfonamidler, önerilen şekillerde kullanılmadıklarında, ilaç uygulanan hayvanların yenilebilir dokularında ve bunlardan sağlanan ürünlerde kalıntı bırakırlar. Böyle kalıntıları ihtiva eden besin maddeleri insan tüketimi için uygun değildir (4, 21, 24, 25). Zira, et ve diğer hayvansal ürünlerde bulunabilecek çok az miktardaki sulfonamid kalıntısı insanlarda allerjik etkilere (2,22), et ve süt teknolojisinde fermentasyon işleminde teknolojik problemlere (32) ve daha da önemlisi ilaçlara dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olurlar. (22).

Birleşik Amerika'da besin üretimi için yetiştirilen hayvanların % 70-80 kadarının yaşamlarında bir süre yemleriyle bir yada birkaç ilaç aldıkları hesaplanmıştır. Aynı ülkede, buzağı yemlerinin % 82'sinin, kanatlı ve domuz yemlerinin % 90'kadarının ilaçlı yem katkı maddesi içerdiği belirtilmiştir. Normal olarak, böyle hayvanların dokularındaki ilaç kalıntıları, kesime göndermeden önce belli bir süre hayvanlara ilaç veya ilaçlı yem ve su verilmemesi ile ve bu süre sonunda mezbahaya sevkedilmeleri ile kontrol edilebilir (20, 22, 28, 31). Ancak, antibiyotik ve sulfonamidlerin bilhassa verim artırıcı olarak ve bu amaçla da subterapötik miktarlarda sürekli ve kontrolsüz bir biçimde kullanımı, ette ve diğer hayvansal kaynaklı besin maddelerinde çeşitli düzeylerde ilaç kalıntılarıyla karşılaşılmasını kaçınılmaz yapmaktadır (16, 22).

Besin üretimi için yetiştirilen bir çok hayvan türünde çeşitli sulfonamid türevleri ile yapılan kontrollu denemelerle bunlarda, kesime sevkedilmeden ne kadar süre önce ilaç uygulanmasının kesilmesi gerektiği belirlenmiştir (4, 7, 15, 18, 22).

Righter ve arkadaşları (26) koyunlarda yaptıkları çalışmada, karaciğer, böbrek ve yağ dokusundaki sulfamerazin kalıntılarının son ilaç uygulanmasından 7 gün, kaslardaki kalıntıların 10 gün sonra 0.1 ppm altına düştüğünü belirtmişlerdir. Aynı araştırmacı grubu, buzağı ve piliçlerde sulfamerazine yaptıkları başka bir çalışmada (25), ilaç verilmesi kesildikten sonra buzağılarda sulfonamid kalıntılarının 8. günde, piliçlerde 10. günde kabul edilen 0.1 ppm'lik tolerans düzeyi altına indiği kaydedilmiştir.

Kanatlılardan elde edilen sonuçlar böbrek ve yumurtadaki sulfonamid kalıntılarının 0.1 ppm yada bunun altına inmesi için en azından 7 gün süreli bir ilaç kesilmesi periyoduna gerek olduğunu göstermektedir (27). Hatta, yumurta sarısındaki kalıntıların aynı düzeye inmesinin 8-10 gün aldığı da belirtilmiştir (21).

Çeşitli hayvan türleri ve sulfonamid türevleri arasında yapılan karşılaştırmalı denemelerden elde edilen bulgularla, besin üretimi için yetiştirilen hayvanlarda, kesimden en azından 10 gün önce (uygulama şekli, yolu ve preparata göre 2-21 gün arasında) ilaç yada ilaçlı yem ve suyun kesilmesi gerektiği ifade edilmiştir (22, 28). Bu süre USA'da 1978 yılında 15 güne çıkarılmıştır.

Hayvansal kaynaklı çeşitli besin maddelerinde kalıntı halindeki sulfonamidler mikrobiyolojik yada kimyasal yöntemlerle belirlenir.

Mikrobiyolojik yöntemler kullanılacağı zaman, sulfonamidlerin antagonisti olan PABA ve folinik asit yoğunlukları en düşük olan ya da bu maddelerin hiç bulunmadığı bakteriyel geliştirme ortamlarını kullanmak gerekir (20, 32).

Bugün için hayvansal dokularda muhtemel sulfonamid kalıntılarının aranmasında başvurulan yöntemlerin çoğu kimyasal analiz niteliği taşır ve Bratton-Marshall tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntemeye dayanır. Çeşitli besin maddelerindeki sulfonamid kontaminasyonunu ortaya çıkarmak için adı geçen yöntem esasına dayanan bir çok teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin çoğunda biyolojik ortamdan sulfonamidler kloroform (6, 17), aseton (5, 28), kloroformaseton (30) ve alkolle (5) estre edilirler. Ekstre edilen sulfonamidler ekstraktan sıvı-sıvı partitasyonla asit (9, 30) yada alkali(6) ortama alınarak doğrudan veya kolon kromatografisi ile (13, 29) yada metal ile çöktürülmeyle (12) ileri bir temizleme gerçekleştirildikten sonra Bratton-Marshall renk reaksiyonuna maruz bırakılırlar. Ancak, çözeltide renk geliştirme temelince dayanan bu yöntem selektivite ve spesifiteden yoksundur. Ayrıca, kolorimetrik yöntem sadece total sulfonamid miktarını verdiğiinden, tarama nitelikli bir çalışmada diğer kimyasal yöntemlerle birlikte uygulanması gerekir. Bu nedenle, kolorimetrik yöntem ince-tabaka kromatografisi ile (1, 3, 5, 23) yada gaz-sıvı kromatografisi ile (9, 10, 11, 19, 28) birlikte uygulandığında istenen yönde gelişme sağlayarak güvenilir olmaktadır. Ancak, bugün pahalı cihazları ve deneyimli personeli gerektirmesi nedeni ile, gaz-sıvı kromatografik uygulama rutin analizlerde kullanılacak şekilde yaygınlaşmamıştır.

Bratton-Marshall renk ayırıcı, N-(1-Naphthyl)-ethylene diamine dihydrochlorid (NED), genellikle diazotize olmuş aromatik, primer aminlerle kenetlenerek spektrofotometreyle ölçülen renkli maddeler oluşturur. Sulfonamidler, bu grup bileşikler içinde yer alırlarsa da, renk ayırıcıyla yaptıkları ürünlerin ekstinksiyon koefisientleri ve absorpsiyon maksimasının dalga boyları değişkenlik arzeder. Bu durum sulfonamidlerin doğru ve özgün bir şekilde NED ile ölçülmelerinde bazı şüphelere neden olur, Zira, sulfonamidlere ilaveten NED ile reaksiyona giren birçok ilaç ile zirai mücadele ilaçları ve metabolitleri bulunur. Koksidiostatik olarak kullanılan zoalenin metaboliti ANOT (3-amino-5-nitro-0-toluamid), herbisid olarak kullanılan amiben (3-amino-2,5-dichlorobenzoic acid), kanatlılarda yem katkı maddesi olarak kullanılan cyzine (2-acetylamino-5-nitrothiazol), sulfanitram (2-acetyl-p-nitrophenyl) sulfanilamid), aromatik NO₂ grup-

ları ihtiva eden herbisid ve insektisidler(23) kolorimetrik yöntemde interferens kaynağı olabilen bahsedilmeye değer başlıca kimyasal maddelerdir.

Yukarıda belirtilen bileşiklerden ve bunların metabolitlerinden ileri gelen muhtemel interferenslerin düzeyi henüz tamamı ile değerlendirilmemiştir. Bu sebepten, daha önce de değinildiği gibi, kolorimetrik yöntem İTK ile birlikte uygulandığında, interferenslere meydan vermeyerek dokulardaki rezidüal sulfonamidlerin ölçülmesine olanak sağlamaktadır (23).

Bu çalışmanın amacı, hastalıklardan koruyucu ve sağıtıcı, dolayısı ile verim artırıcı olarak besin üretimi için yetiştirilen hayvanlarda sık kullanılan, ancak öngörülen şekilde uygulanmadıklarında, bu hayvanlardan sağlanan etlerde kalıntı bırakarak, çeşitli sağlık sakıncaları yaratabilen sulfonamidlerin adı geçen hayvansal etlerde kalıntılarının analiz edilebilmesi amacıyla laboratuvar şartlarımıza uygun, rutin çalışmalarda kullanılacak, basit, güvenilir ve ekonomik bir yöntem uyarlaması yapmaktır.

Materyal ve Metot

Materyal olarak dana ve kanatlılara ait çeşitli doku örnekleri kullanıldı. 74 ü dana doku nümunesinden (36 karaciğer, 24 kas eti ve 14 böbrek) 19'u tavuk doku nümunesinden (11 karaciğer ve 8 kas eti) olmak üzere 93 rekoveri analizi yapıldı.

Çözücüler

Aseton, kloroform, hekzan, n-heptan, metanol, amonyum hidroksit, n-butanol. Tüm çözücüler kromatografik analiz kalitesinde seçildi.

Ayırıcılar

a- % 0.1'lik *Sodyum nitrit* (Merck, Art. 6544) *Çözeltisi*: Distile suyla haftalık olarak hazırlandı.

b- % 0.5 lik *Amonyum sulfamat* (Merck, Art. 1220) *çözeltisi*: Distile suyla haftalık olarak hazırlandı,

c- % 0.1'lik *N-(-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride* (Merck, Art. 6237) *çözeltisi* (*NED*). Distile suyla günlük olarak hazırlandı.

d- *Sulfonamid standartları*

1. *Sulfanilamid* (Riedel)

2. *Sulfadimetoksin* 250 mg/g. etken madde içeren Agribon (Roche) isimli veteriner spesiyaliteden

3. *Sulfamethazin* 160 mg/ml. sulfamethazin sodyum içeren Abizatin (Top-Kim) isimli veteriner spesiyaliteden

4. *Sulfakinoksalin* : 32 mg/ml. sulfakinoksalin sodyum içeren Sulkoksin (Vetaş) isimli spesiyaliteden hazırlandılar.

a- *Kolorimetrik ölçüm için Stok çözelti* (1 mg./ml.) : Her bir sulfonamid türevinden 100 mg. tartılıp yada buna eşdeğer miktarda çözelti halindeki spesiyaliteden alınıp, 100 ml. asetonda çözdürülerek hazırlandı. *Uygulama standardı* (1 µg./ml.) : Stok çözeltiden 0.1 ml alınıp asetonla 100 ml'ye ulaştırıldı.

b- *İnce-tabaka kromatografisi (İTK) için*: Yukarıdaki sulfonamidlerin karışımını içeren 1 µg/ml'lik uygulama standardı.

Adsorban

Silikajel G (İTK için, Tip 60, Merck, Art. 7736).

Aygutlar

a- *Spektrofotometre* (Beckman, Model-B)

b- *Homojenizatör* (Virtis, Model 23)

c- *İnce-Tabaka Kromatografisi aygıtı ve eklenti* (Desaga)

d- *Evaporatif konsentratör* (Buchi)

Analiz numunelerinde sulfonamidlerin ekstraksiyonu ve renk geliştirme, Tishler ve arkadaşlarından (30) uyarlanan tekniğe göre gerçekleştirildi. Şekillenen NED-Sulfonamid ürünleri Fellig ve Westheimer'in(6) belirttiği biçimde partitasyon yapıldı. Spektrofotometrik okumadan sonra butanol ekstrakt belli bir hacme kadar azaltıldı ve İTK (23) plakasına uygulanarak sulfonamidlerin bireysel ayrımı başarıldı.

Ekstraksiyon : 10 g. kıyılmış doku örneği ve 20ml kloroform-aseton(1-1) homojenizatörün kabına konuldu. Düşük hızda 1 dakika kadar homojenize edildi. Dokusal kısmın bir cam baget yardımıyla homojenizatör kabında kalması sağlanırken, homojenize karışım uçurma balonuna süzüldü. Ekstraksiyon işlemi aynı miktardaki çözücü karışımıyla iki kez yinlendi. Filtre kağıdı ve içeriği birkaç kez 2-5 ml çözücü karışımıyla yıkandı. Aseton-Kloroform ekstraktı evapo-

ratif konsentratörde (50°C) uçuruldu. Uçurma balonunda kalan kalıntı, sırasıyla, 2 × 10 ml 1 N HCL, 2 × 10 ml hekzan, 2 × 1. 5 ml aseton ve 5 ml hekzanla çalkalandı. Her çalkalama işleminden sonra ekstraktlar 100 ml'lik ayırma hunisinde toplandı. Ayırma hunisi 2 dakika hafif şekilde çalkalandı. Fazların ayrılması için 10 dakika kadar beklendi. Altta toplanan asit ekstrakt diğer bir ayırma hunisine süzülerek aktarıldı. Ayırma hunisinde kalan organik fazdan ekstraksiyon işlemi 5 ml 1N HCl ile yinelenildi ve asit ekstrakt diğerine katıldı. Buna 2.5–3.0 ml 10 N NaOH katıldı ve iyice karıştırıldı. Bazik çözelti 2 × 5 ml kloroformla çalkanarak yıkandı. Kloroform atıldı. Ayırma hunisinde kalan bazik sulu çözelti konsantre HCl ile asit (yaklaşık pH 1) yapıldı. Çözelti 50 ml'lik bir kaba süzüldü ve süzgeç kağıdı 2 ml 1N HCl ile yıkandı.

Renk geliştirme: Asit çözeltiye 2 ml % 0.1'lik NaNO₂ çözeltisi katıldı, iyice karıştırıldı ve 3 dakika beklendi. 2 ml % 0.5 lik amonyum sulfamat çözeltisi katıldı, iyice karıştırıldı ve 2 dakika beklendi. 1 ml % 0.1 NED çözeltisi katıldı, iyice karıştırıldı ve karanlıkta 15 dakika tutuldu. Bu süre sonunda, renkli çözelti 50 ml'lik ayırma hunisine aktarıldı. 10 g. sodyum klorür ve 5 ml n-butanol katıldı. 30 saniye süreyle şiddetli bir şekilde çalkalandı ve 10 dakika kadar tabakaların ayrılması için bırakıldı. Renk kompleksini içeren butanol tabakası bir enjektör yardımı ile 15 ml'lik konik santrifüj tübüne alındı. Örnekten butanolla ekstraksiyon işlemine renkli madde ekstrakte edilemeyece kadar 1'er ml butanolla devam edildi. Oluşan rengin şiddetine göre butanol ekstraktın hacmi 5–10 ml arasında tutuldu. Butanol ekstrakt 10 dakika 1500 dev/dak. da santrifüj edildi. Butanol renk kompleksinin tabanında su yada tortu toplandığında, üstteki butanol tabakası bir enjektör yardımıyla diğer bir tübe aktarıldı. Butanol ekstraktın absorbanansı saf butanole karşı 545 nm. de okundu.

Renk ayırıcı katıldıktan sonra 15 dakika içinde pembe-kırmızı bir renk oluşması durumunda, analiz edilen örnek sulfonamid (Icr) bakımından pozitif kabul edildi. Bundan sonra, gerek tek ve gerekse kombine haldeki bir çok sulfonamid kalıntı çeşidinin ve miktarının (karışım halindekiler için) belirlenmesi için İTK ile devam edildi. Belirtilen süre içinde renk oluşmayan örnekler sulfonamid kalıntıları bakımından negatif kabul edildi.

Sulfonamid standart eğrisi: 1 µg/ml'lik uygulama standard çözeltisinden 50 ml'lik beherlere 1.0; 0.0; 2.0; 4.0; 6.0; 8.0 ve 10.0 ml konuldu. Çözücü sıcak hava akımında uçuruldu. Kalıntılar 3 × 5 ml

1N HCl ile çalkalanarak 50 ml'lik beherlere aktarıldı. Renk geliştirme kısmında, renk stabilizantı olarak 5 g. NaCl kullanılması dışında "asit çözeltiye" olduğu gibi devam edilerek renk şekillendirildi ve analizde kullanılan her sulfonamid türevinin eğrisi çizildi.

İTK için 1.0-10.0 ml sulfonamid standartları karışımı 50 ml'lik beherlere konuldu. Hava akımında kuruyana kadar uçuruldu. Kalıntılar 3×5 ml 1N HCl ile çalkalanarak 50 ml'lik diğer beherlere alındı. Renk geliştirildi. Renk kompleksinin butanolle partitasyonu yapıldı. Butanol sıcak su banyosunda, N-gazı akımı altında 0.2-0.5 ml kalana kadar uçuruldu.

İnce-tabaka kromatografisi: Örnek ve standarda ait azaltılmış butanol ekstrakt 0.25 mm kalınlığında Silikajel-G ile kaplanmış plakaya 20-50 µl. miktarında lekclendi. Plaka aseton + n-heptan + metanol + amonyum hidroksit + n-butanol (36 + 10.5 + 4.5 + 5 + 5) dan oluşan developman sisteminde developpe edildi.

İnce-tabaka kromatogramı, gözle, total renk intensitesinin tek bir sulfonamidden mi yoksa sulfonamidlerin karışımından mı yada interferens veren maddelerden mi ileri gelip gelmediğinin belirlenmesi bakımından incelendi. Bu kontrol sonunda, İTK'de interferens görülmez ise, örnekteki sulfonamid miktarı ya ilk anbsorbans değerini kullanıp (ki örnekte tek bir sulfonamid bulunduğu İTK'de gösterildiği durumda) standard eğri ile yada plakada bilinen standardla karşılaştırılarak hesaplandı.

Bulgular

Çalışmada analiz materyali olarak seçilen dana ve kanatlılara ait çeşitli dokulara 0.1-1.0 ppm kirlenme düzeyine denk gelecek şekilde sulfonamidler katılarak, kalıntı analizleri yapıldı. Bu uygulama, her analiz başlangıcından önce, kıyılmış 10 g. doku örneğine 1,5 ve 10 µg sulfonamid standardı katılarak gerçekleştirildi. Belirtilen miktarlarda, çeşitli sulfonamidlerden en az ikişer kez katılarak 93 geriye kazanç analizi yapıldı. Kanatlı dokularında iki, danalara ait dokularında bu üç kirlenme düzeyinde, sulfonamidlerle yapılan analiz sonuçlarına ilişkin rakamsal veriler Tablo 1'de görülmektedir. Ayrıca, çizilen sulfonamid eğrilerine bir örnek teşkil etmesi amacıyla sulfanilamid standart eğrisi Şekil 1'de verilmiştir.

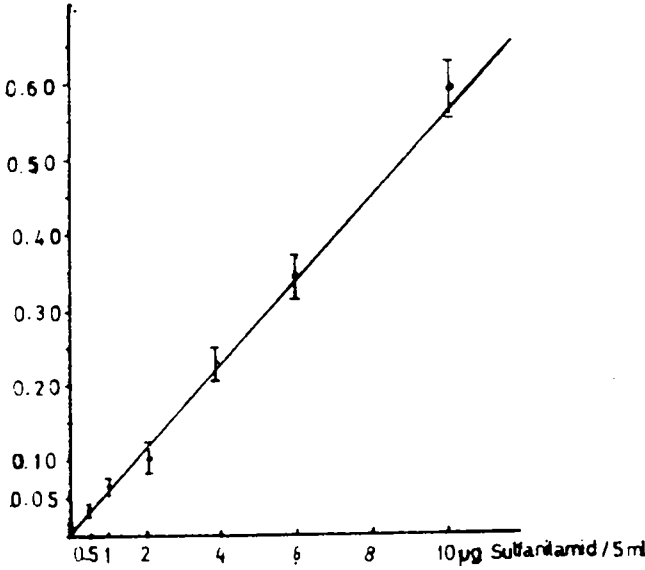
Tablo 1 incelendiğinde, sulfonamid tipi ve analiz edilen doku çeşidi dikkate alınmaksızın, tüm sulfonamidlerin geriye kazanç yüzdesi

Tablo 1: Karaciğer, kas ve böbrekten sulfonamidlerin geriye kazançları (%)

Sulfonamid türü	Katılan, ppm		
	0.1	0.5	1.0
	Karaciğer (dana)		
Sulfanilamid ¹	88	93	82.6
Sulfamethazin ²	91	90	87.5
Sulfadimetoksin ³	83.3	92.5	86.6
Sulfakinoksalin ⁴	85	87.5	83.3
Kontrol	0.024 ppm		
	Kas (dana)		
Sulfanilamid	85	90	84
Sulfamethazin	93	82.5	97
Sulfadimetoksin	90	92.5	100
Sulfakinoksalin	89.5	92	89.5
Kontrol	0.035 ppm		
	Böbrek (dana)		
Sulfanilamid	90	—	—
Sulfamethazin	92.5	87.5	92.5
Sulfadimetoksin	87.5	90	87.5
Kontrol	0.025 ppm		
	Karaciğer (Kanatlı)		
Sulfamethazin	93.3	—	96
Sulfadimetoksin	101.6	—	96
Kontrol	0.0275 ppm		
	Kas (kanatlı)		
Sulfamethazin	94.3	—	92
Sulfadimetoksin	94.3	—	97
Kontrol	0.0175 ppm		

1. Sulfanilamid (Riedel); 2. Topkim'in Abizatin; 3. Roche'nin Agribon; 4. Vetaş'ın Sulkoksin isimli spesiyaliteleri.

85 üzerinde gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Sulfonamidlerin ortalama geriye kazanç yüzdesi 0.1 ppm düzeyinde 90.6 ± 1.19 ; 0.5 ppm düzeyinde 89.7 ± 0.32 ve 1.0 ppm düzeyinde 90.8 ± 1.54 olarak hesaplandı. Diğer yandan, analiz edilen doku çeşidi dikkate alınmaksızın sulfonamid türevlerinin geriye kazanç oranlarının değişkenlik gösterip göstermediği incelendi. Buna göre yapılan değerlendirmede



Şekil 1. Sulfanilamid standart eğrisi

sulfanilamidin geriye kazanç yüzdesi 88.9 ± 1.6 ; sulfamethazinin 91.5 ± 1.08 ; sulfadimetoksinin 92.2 ± 1.51 ve sulfakinoksalinin 87.8 ± 1.31 olarak bulundu. Ayrıca, dokulardan ayırım gözetmek-sizin sulfonamidlerin benzer oranda geriye kazanıldığı anlaşıldı.

Silikajel G ile kaplanmış plakaya uygulanarak ve bahsedilen developman sisteminde developpe edilerek sulfonamid-NED reaksiyon ürünlerinin ayrılması başarıldı. Rf değerlerinin aşağıdaki gibi sıralandığı belirlendi: Sulfanilamid 0.85; sulfadimetoksin 0.79; sulfakinoksalin 0.75 ve sulfamethazin 0.55. Ayrıca şekillenen bu renk kompleksinin 10-20 ng. miktarının TİK plakasında gözle rahatlıkla okunabildiği anlaşıldı.

Tartışma ve Sonuç

Sulfonamidlerin besin üretimi için yetiştirilen hayvanlarda sürekli ve uygunsuz şekilde kullanılmaları bunlardan sağlanacak etlerde kalıntı sorununu bir bakıma kaçınılmaz yapmaktadır. Etlerde doğabilecek bu sulfonamid kalıntıları hayvanlara kesime göndermeden belli bir süre önceden ilaç verilmesinin kesilmesi, kirlenme durumunun ortaya çıkarılması, insan sağlığı yönünden sakıncalı olabilecek kirlenme

ve tolerans düzeyleri ile günlük alınabilir miktarlarının saptanması ve sakıncalı düzeyde kirlenmiş etlerin tüketimine izin verilmemekle önlenebilir (16, 22, 24).

Kısaca verilen bu literatür bilgidен anlaşılacağı gibi sulfonamidlerle kirlenen besinlerden ileri gelecek sağlık sakıncalarının önlenmesinde, bilimsel ve yasal önlemlerin alınmasında ve kalıntı durumunun ortaya çıkarılmasında sulfonamid kalıntı analizleri kilit uygulama niteliği taşır. Bu nedenle, sulfonamid kalıntılarının ortaya çıkarılmasına yönelik yöntem çalışmaları önem arzeder (2,5,8,9,13,28,29,30). Ancak, uygulanan yöntemlerin çoğunda, numunelerden elde edilen sulfonamidli ekstraktların NED ile reaksiyona girerek hatalı ölçümlere sebep olabilen diğer bazı primer aromatik aminlerden ileri gelen interferenslerden tümüyle arındırılması başari lamamıştır. Bu nedenle, çözeltide renk geliştirme esasına dayanan yöntemler ile, özellikle tarama nitelikli bir çalışmada, her zaman hatalı sonuçlar elde edilmesi ve değerlendirmeler yapılması mümkün olabilmektedir (6,13,29,30). Bu tür interferensler bazı yöntemlerde renk reaksiyonu şekillendirilmeden önce (1, 30) yada sonra (12) ortam alkali yapılarak kloroformla ekstraksiyonla ortamdan etkin bir biçimde uzaklaştırılabildikleri belirtilmiştir.

Tarama nitelikli sulfonamid kalıntı analizinde, Bratton-Marshall renk reaksiyonuna bugün genellikle bir ön deneme olarak bakılmaktadır. Yani, bu uygulamayla sulfonamidlerce pozitif olan örnekler belirlenir; bunlar İTK'ye (2,3,5,23) yada GSK'ye (9, 28) uygulanarak, bireysel ayırım sağlanır ve kalıntıya doğruluk kazandırılır. Zira, literatür bilgi kısmında ve yukarıda değinildiği gibi, günlük kullanımda olan çok sayıda ilaç ve kimyasal madde NED ile reaksiyona girerek interferens yapabilmektedir (5, 23).

Burada bahsedilen yöntemin ekstraksiyon, temizleme ve renk geliştirme aşamaları Tishler ve arkadaşlarından (30) uyarlandı. Ancak, böbrek ve karaciğer gibi kanatlı dokuları da dikkate alındığından, analizler 10 g. doku örneğinde yürütüldü. Sulfonamidler kloroformaseton karışımıyla ekstrakte edilip, çözücü uçurulduktan ve kalıntı sıvı-sıvı partitisonla sulu asit çözeltiye alındıktan sonra, ortam alkali yapıldı ve ileriki aşamada interferens yapabilecek maddeler kloroformla çalkalanarak giderilmeye çalışıldı. Şekillenen renkli madde butanolle (6) ekstrakte edildikten sonra spektrofotometrik okuma yapıldı. Böylece, şekillenen sulfonamidli boya maddesinin absorbansı, dilue sulu asit ortam yerine konsantre butanol ekstraktında yapılarak, yön-

temde istenen duyarlılığa ulaşıldı. Ayrıca, bu uygulama bazı doku örneklerinin sulu çözeltilerinde ara sıra karşılaşılan bulanıklığı da gidermektedir. Spektrofotometrik okumadan sonra, Bratton-Marshall reaksiyonu İTK ile birleştirilerek (23) sulfonamidlerin bireysel ayrımı gerçekleştirildi.

Yukarıda kısaca belirtilen uyarlamaların, sulfonamid kalıntı analizinde kullanılan belli başlı yöntemlere göre (1,2,6,9,23,28,30) iyileştirmeler getirip getirmediğini belirleyebilmek için, bu tür yöntemlerde sık kullanılan ortamdaki sulfonamidin geriye kazanılması "recovery" denemelerine başvuruldu. Duyarlılık düzeyi, geriye kazanç oranı, tekrarlanabilirlik, kontrol değerleri, analiz süresi ve ekonomik yönden diğer yöntemlerle karşılaştırıldı.

10 g. doku numunesine 0.1-1.0 ppm'e denk gelecek şekilde çeşitli sulfonamidlerden katılarak yapılan geriye kazanç denemeleriyle birlikte yürütülen duyarlılık düzeyi çalışmasında, yöntemle 0.1 ppm'lik sulfonamid kalıntısının güvenle ortaya çıkarıldığı bulundu. Hatta, Tablo 1'deki kontrol değerleri ile Şekil 1'deki sulfanilamid standard eğrisi dikkate alındığında yöntemle 0.05 ppm'e kadar sulfonamid kalıntısının ölçülebileceği anlaşılır.

Bugün hayvansal dokularda sulfonamid kalıntılarının analizinde kullanılan yöntemlerin çoğunda duyarlılık düzeyi 0.1 ppm (6, 28, 30) ile 0.05 ppm (9,23) gibi dar sınırlar arasında değişmektedir. Uyarlanan yöntemle elde edilen duyarlılık düzeyinin sıralanan aynı nitelikli bu verilerle uygunluk gösterdiği kolayca anlaşılır.

Analiz edilen doku çeşidi ve sulfonamid tipi ile kirlenme düzeyi dikkate alınmaksızın ortalama % 82.5-101.6 arasında değişen sulfonamid geriye kazanç oranı 0.1, 0.5 ve 1.0 ppm düzeylerinde, sırasıyla, % 90.6 ± 1.19 , 89.7 ± 0.332 ve 90.8 ± 1.54 olarak gerçekleşmiştir.

Goodspeed ve arkadaşları (9) analiz materyali olarak kullandıkları karaciğer, kas ve böbrekte 5 farklı sulfonamid türevinin 0.1, 0.5 ve 1.0 ppm düzeyinde geriye kazanç yüzdesini, sırasıyla, 81.5, 79.1 ve 76.0 olarak hesaplamışlardır. Phillips ve Trafton (23) aynı değeri 9 farklı sulfonamidle % 88 olarak bulmuştur. Tishler ve arkadaşları (30) söz konusu oranı % 76-100; Fellig ve Westheimer (6) % 70-90; Fravolini ve Begliomini (8) % 94-104; Selezzer ve Banes (29) % 60-91 arasında bulmuştur. Verilen bu rakamsal bilgilerden de anlaşılacağı gibi tekrarlanabilir ve güvenilir olarak kabul edilen çok sayıda ana-

liz yönteminin sulfonamid kazanç değerleri belli ölçüde varyasyon gösterebilmektedir. Çalışmada elde edilen aynı nitelikli verilerin de benzer bir varyasyon gösterdiği dikkate alınır, uyarlanan bu yöntemin de oldukça iyi sayılabilir derecede tekrarlanabilirlik özelliği taşıdığı ve güvenilir sonuçlar verdiği ve ayrıca etkin bir sulfonamid geri alım yüzdesi sağladığı anlaşılır.

Çeşitli besin maddelerindeki kalıntı halindeki sulfonamidlerin analizinde kullanılan çoğu yöntemlerin önemli bir olumsuz yönü, uygulanan temizleme tekniklerine rağmen (12, 30), kontrol değerlerinin yüksekliğidir. Fellig ve Westheimer (6) dokularda kontrol değerini 0.02-0.04; Tishler ve arkadaşları (30) 0.005-0.039 ve Selzer ve Banes (29) sütte 0.03-0.05 ppm arasında bulmuşlardır. Tablo 1'deki görünüşte sulfonamid değerini gösteren kontrol değerleri herhangi bir karışıklığa neden olmayacak kadar düşük kalmış ve literatürdekilerle uyum göstermiştir.

Bratton-Marshall reaksiyonu primer aromatik aminler için spesifik olmasına rağmen, analiz edilen nümune çoğu kez ayıraçlarla renk meydana getiren genellikle birden fazla madde ihtiva etmesi ve bunların da doğru bir şekilde spektrofotometrik ölçümü imkansız kılması nedeni ile, sadece pozitif nümunelerin belirlenmesinde yararlı olmaktadır. Bu reaksiyon, başlıca, laboratuvarlarda bireysel sulfonamidlerin geriye kazanç oranlarının hesaplanmasında ve tek bir sulfonamidi doğrulamada değer taşımaktadır (9, 23). Sıralanan nedenlerden dolayı butanol ekstrakt spektrofotometrik ölçümden sonra İTK plakasına uygulandı. Böylece nümune mevcut sulfonamidlerin bireysel ayırımı başarıldı. İTK plakasında sulfonamid türevi dikkate alınmaksızın 10-20 ng. sulfonamid-NED reaksiyon ürününün gözle rahatlıkla okunabileceği bulundu. Analiz edilen nümune ağırlığı ve azaltılmış butanol ekstraktın miktarı dikkate alındığında, bu miktarın 0.05 - 0.1 ppm'e karşılık geldiği kolayca anlaşılır.

Alınan analiz nümunesi miktarını azaltıp, spektrofotometrik ölçümün konsantr butanol ortamında yapılması şeklindeki uyarlamayla, sulfonamidlerin ekstraksiyonu ve ileriki aşamalarda kullanılan çözücü miktarında önemli ölçüde ekonomi sağlanmıştır. İTK plakasına uygulamak için, kaynama noktasının yüksekliği nedeniyle, butanolun belli bir hacme kadar azaltılması zaman almaktadır. Ancak, buna rağmen günde, paralel bir şekilde yürütülerek 6 nümunenin analizi gerçekleştirilebilmektedir.

Sonuç olarak, uyarlanan bu spektrofotometrik-ince -tabaka kromatografik yöntemin duyarlılık düzeyi, rezidü kazanç oranı, tekrarlanabilirlik niteliği ve ekonomik oluşuyla etlerdeki sulfonamid kalıntılarının analizinde başarıyla kullanılabileceği kanısına varıldı.

Literatür

- 1- **Alexander, L.R. and Stanley, E.R.** (1965): *Quantitative determination of sulfa drugs in medicated feeds by thin-layer chromatography.* J. A. O.A.C. 48 (2), 278-279.
- 2- **Bevill, R.F., Sharma, R. M., Meachum, S.H., Wozniak, S.C., Bourne, D. W. A. and Dittert, L.W.** (1977): *Disposition of sulfonamides in food producing animals: Concentration of sulfamethazine and its metabolites in plasma, urine and tissues of lambs following intravenous administration.* Am. J. Vet. Res. 38 (7), 973-977.
- 3- **Bican-Fister, T. and Kajganovic, V.** (1964): *Quantitative analysis of sulfonamides mixtures by thin-layer chromatography.* J. Chromatog. 16, 503-509.
- 4- **Biehl, L.G., Bevill, R.F., Limpoka, M. and Koritz, G.D.** (1981): *Sulfamethazine residues in swine.* J. Vet. Pharmacol. Therap. 4, 285-290.
- 5- **Cieri, U.R.** (1976): *Detection of sulfonamides in animal feeds.* A.O.A.C. 59(1), 56-59.
- 6- **Fellig, J. and Westheimer, J.** (1968): *Determination of sulfadimetoxine in animal tissues.* J. Agr. Food Chem. 16 (5), 738-740.
- 7- **Fellig, J., Westheimer, J., Walsgh, M.J. and Marusic, W.L.** (1971): *Tissue clearance of Rafenaid in chiskens and turkeys.* Poult. Sci. 50 (6), 1777-1783.
- 8- **Fravolini, A. and Begliomini, A.** (1969): *Extraction and GLC determination of mixed sulfonamides in feeds.* J. A.O.A.C. 52 (4), 757-769.
- 9- **Goodspeed, D.P., Simpson, R.M., Ashworth, R.B., Shafer, J.W. and Cook, H.R.** (1978): *Sensitive and spesific Gas Liquid chromatographic-spectrophothometric screening procedure for trace level of five sulfonamides in liver, kidney and muscle tissues.* J.A.O.A.C. 61 (5), 1050-1053.
- 10- **Gyllenhaal, O. and Ehrsson, H.** (1975): *Determination of sulfonamides by electron-capture gas chromatography: preparation and properties of perfluoroacyl and pentafluorobenzyl derivatives.* J. Chromatog. 107, 327-333.
- 11- **Gyllenhaal, O., Tjarnlund, U., Ehrsson, H. and Hartivg, P.** (1978): *Electron-capture gas chromatography of sulfonamides after extractive alkylation.* J. Chromatog. 156, 275-283.
- 12- **Hill, V.B. and Martin, E.E.** (1967): *Determination of sulfamethazine in mixed feeds containing procain penicillin.* J.A.O.A.C. 50 (1), 42-45.
- 13- **Houston, S. F. and Umstead, J.E.** (1968): *Determination of sulfonamides in milk.* J. A.O.A.C. 51 (5), 1016-1019.
- 14- **Kim, T.K. and Stephens, J.F.** (1972): *Drug rezistance and transferable drug resistance of Escherichia coli isolated from "ready -to-cook" broilers.* Poult. Sci. 51 (4), 1165-1170.

- 15- **Laurencot, H.J., Schlosser, A. and Hemostead, J.L.** (1972): *The disposition and clearance of Rifenaïd in chicken and Turkey eggs.* *Poult. Sci.* 51 (4), 1181-1189
- 16- **Lehmann, R.P.** (1972): *Implementation of the recommendations contained in the report to the commissioner concerning the use of antibiotics in animal feeds.* *J. Anim. Sci.* 35 (6), 1340-1341.
- 17- **Mainthal, M., Carol, J. and Kunze, F.M.** (1961): *The analysis of mixed sulfonamides by quantitative paper chromatography.* *J. A.O.A.C.* 44 (2), 313-317.
- 18- **Messersmith, R.E., Sass, B., Berger, H. and Gale, G.O.** (1967): *Safety and tissue residue evaluations in swine fed rations containing chlortetracycline, sulfamethazine and penicillin.* *J.A.V.M.A.* 151 (6), 719-724.
- 19- **Nose, N., Kobayashi, S., Hirose, A. and Watanobe, A.** (1976): *Gas-liquid chromatographic determination of sulphonamides.* *J. Chromatog.* 123, 167-173.
- 20- **Nauws, J.F.M.** (1981): *Tolerance and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals.* *Arc. Lebensmittelhyg.* 32, 103-110.
- 21- **Oikawa, H., Nakamoto, K., Hirota, K. and Katagiri, K.** (1977): *Clearance of sulfamethoxazole in eggs and tissues of chickens.* *Poult. Sci.* 56 (3), 813-821.
- 22- **Penumathy, L., Trabosh, H.M., Clark, G.M., Conrey, J.S., Rader, W.A and Spaulding, J.E.** (1975): *Sulfa drug residues in uncooked edible tissues of cattle, calves, swine and poultry.* *Feedstuffs* 47, 19-20, 26.
- 23- **Phillips, W.F. and Trafton, J.E.** (1975): *A screening method for sulfonamides extracted from animal tissues.* *J.A.O.A.C.* 58 (1), 44-47.
- 24- **Rieder, J.** (1973): *Metabolism and techniques for assay of trimethoprim and sulfamethoxazole.* *J. Inf. Disease* 128, Suppl., 567-573.
- 25- **Righter, H.F., Worthington, J.M. and Mercer, H.D.** (1971): *Tissue residue depletion of sulfamethazine in calves and chickens.* *Am. J. Vet. Res.* 32(7), 1003-1006.
- 26- **Righter, H.F., Worthington, J.M. and Mercer, H.D.** (19712): *Tissue residue depletion of sulfamerazine in sheep.* *J. Agr. Food Chem.* 20 (4), 876-868.
- 27- **Richter, H.F., Worthington, J.M., Zimmermann, H.E. and Mercer, H.D.** (1970): *Tissue-residue depletion of sulfaquinoxaline in poultry.* *Am. J. Vet. Res.* 31 (6), 1051-1054.
- 28- **Saschenbrecker, P.W. and Fish, N.A.** (1980): *Sulfamethazine residues in uncooked edible tissues of pork following recommended oral administration and withdrawal.* *Can. J. Comp. Med.* 44 (3), 338-345.
- 29- **Selzer, G.B. and Banes, D.** (1963): *The detection and estimation of sulfonamide residues milk.* *J.A.O.A.C.* 46 (4), 703-707.
- 30- **Tishler, F., Sutter, J.L., Bathish, J.N. and Hagman, H.E.** (1968): *Improved method for determination of sulfonamides in milk and tissues.* *J. Agr. Food. Chem.* 16 (1), 50-53.
- 31- **Van Houweling, C.D. and Kingma, F.J.** (1969): *The use of drugs in animals raised for food.* *J.A.V.M.A.* 155 (12), 2197-2200
- 32- **Yndestad, M. and Underdal, B.** (1977): *Residues of sulfadimidine, sulfanilamid and sulfamethoxypridazine in sheep tissue.* *Acta Vet. Scand.* 18 (1), 15-22.