

**VAN'DA SATILAN SÜTLERDE AMPİSİLİN KALINTILARININ TAYİNİ  
VE  
ISITMANIN AMPİSİLİN ÜZERİNE ETKİSİ**

Hülya Sağmanlıgil<sup>1</sup> Haluk Testereci<sup>2</sup> İdris Türel<sup>3</sup>  
Tahir Kahraman<sup>4</sup> Ali Ertekin<sup>4</sup>

**Determination of Ampicillin Residues in Milks Sold at Van and Heating Effect  
on Ampicillin**

**Summary:** *Ampicillin residues have been determined in milk sold in Van markets by high performance liquid chromatography. Ampicillin has been derivatized to measure with fluorescence detector. No ampicillin residue were found in 26 samples of milks.*

*Effects of leaving ampicillin at + 95°C with 30, 60, 90 120 minutes interval, +20°C and + 85°C have been examined. Ampicillin concentration has significantly decreased with time at +95°C (at least  $P < 0.05$ ). About 12-54% loss in ampicillin concentration with heat were found.*

*Leaving the ampicillin added milk at +85°C for one minutes (pasteurization) had no effect on ampicillin concentration.*

**Key Words:** *Ampicillin, Milk, Residue, HPLC, Heat*

**Özet:** *Van marketlerinde satılan sütlerde ampisilin kalıntısı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayin edildi. Ampisilini fluoreosan detektörle ölçebilmek için derivatize edildi. 26 süt numunesinde ampisilin kalıntısı bulunamadı.*

*Ampisilini +95° C'de 30, 60, 90, 120 dakika aralıklarla, +20°C ve +85°C'ye maruz bırakmanın etkisi incelendi. Ampisilin konsantrasyonu +95 °C de zamanla önemli oranda azaldı (en az  $P < 0.05$ ). Isı ile ampisilin konsantrasyonunda yaklaşık % 12-54 arasında bir azalmanın olduğu saptandı.*

*Ampisilin eklenmiş sütleri +85°C de 1 dakika bırakmanın (pastörizasyonun) ampisilin konsantrasyonu üzerine hiç bir etkisi yoktur.*

**Anahtar Kelimeler:** *Ampisilin, Süt, Kalıntı, HPLC, Isı*

1:Yrd.Doç.Dr., Yüzüncü Yıl Üniversitesi,Veteriner Fakültesi,Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Van-TÜRKİYE

2: Yrd.Doç. Dr., Yüzüncü Yıl Üniversitesi,Veteriner Fakültesi,Biyokimya ve Fizyoloji Anabilim Dalı, Van-TÜRKİYE

3:Arş.Gör., Yüzüncü Yıl Üniversitesi,Veteriner Fakültesi,Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Van-TÜRKİYE

4:Arş.Gör., Yüzüncü Yıl Üniversitesi,Veteriner Fakültesi,Biyokimya ve Fizyoloji Anabilim Dalı, Van-TÜRKİYE

## Giriş

Penisilin ve ampisilin beta-laktam grubu antibiyotiklerdendir. Doğal ve sentetik olarak bulunurlar. Tüm penisilin çeşitleri 6-aminopenisillanik asit'ten türerler. Beta laktam gurubu antibiyotikler, 6-aminopenisillanik asit çekirdeğiyle amid bağı oluşturan guruba göre dayanıklılıkları, antibakteriyel özellikleri ve farmakolojik aktiveleri farklılık gösterir. Ampisilin benzil penisilin yan zincirindeki  $\alpha$ -karbon atomuna amino gurubunun getirilmesiyle hazırlanır (2,4,8,13). Ampisilin mide asidine dayanıklı geniş spektrumlu bir antibiyotiktir.(4,11).

Beta laktam antibiyotikler veteriner ve insan hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Pneumoni, ishal, bağırsak yangısı, meme hastalıkları, piyelonefrit, septisemi, üriner sistem hastalıklarında geniş kullanım alanı bulmaktadır (13).

Evcil hayvanların sağıtımında kullanılan beta-laktam antibiyotikler et, süt ve yumurta gibi hayvansal ürünlere geçer. Hayvansal ürünlerdeki antibiyotik rezidüleri bu antibiyotiklere hassas kişilerde akut reaksiyonlara neden olabilmektedir. Uzun süre düşük dozda besinlerle alınmasıyla R-plazmid transferi ile dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkması mümkündür (1,4,12). Özellikle sütte bulunan antibiyotik kalıntıları yoğurt ve peynir hazırlanmasını olumsuz yönde etkiler (1,11,12).

Ampisilin et ve sütte bulunmasına tolere edilebilecek düzeyinin yaklaşık 10 ng/ml olması gerektiği bildirilmiştir. Ampisilin verilmiş hayvanların etlerinin bekletme süresi 15 gün ve süttten atılma süresi 48 saat olarak bildirilmektedir (2, 3,4,9). Sütte bulunan ampisilin derivatize edilerek, fluoresan detektörde tayini ile, sütteki sakınca yaratmayan düzeyine kadar (10 ng/ml) tanısı bildirilmiştir (3).

Bu çalışmada Van'daki marketlerden toplanan sütlerde ampisilin kalıntısının olup olmadığı ve ısıtma süresinin ampisilin kalıntısı üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Numunelerin hazırlanması:** Nisan-Mayıs aylarında Van'da halk tarafından satışı sunulan, toplam 26 adet çiğ inek süt numunelerinde ampisilin kalıntısı aşağıda izah edilen kolon öncesi derivatizasyonla fluorese edilerek yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde tayin edildi (14).

Ampisilin ısıya dayanıklılığını araştırmak amacıyla, 1 lt çiğ süt üzerine ampisilin standardı eklendi (300 ng/ml). Bu süt numunelerinden 6 adet 10 ar ml alınıp 30, 60, 90 ve 120 dakika +95°C ısıya maruz bırakıldı. Bu numunelerden 1' er ml alınıp mevcut ampisilin derivatize edildi.

Isı uygulamadan +20°C de (oda ısısında) ilk dakikada 1 ml stok süt ampisilin karışımından alınarak derivatizasyon işlemi gerçekleştirildi.



Stok süttten 6 adet 10' ar ml alınıp su banyosunda +85°C'ye çıktıktan sonra 1 dakika tutularak pastörizasyon işlemi uygulandı. İşlem sonrası derivatizasyon gerçekleştirildi.

**Standartların hazırlanması:** Ampisilin ( $\alpha$ -aminobezylpenicillin, Sigma) distile suda çözdürülerek stok çözeltisi (100  $\mu$ g/ml ampisilin) hazırlandı. 300 ng/ml çalışma standardı, stok çözeltinin distile su ile sulandırması yapılarak hazırlandı.

**Kolon öncesi derivatizasyon:**

**Sitrik asit çözeltisi:** % 37 'lik formaldehit (Rieadel deHaen) su ile % 7 'lik yapılarak formaldehit solüsyonu hazırlandı. 400 mM sitrik asit (E. Merck) solüsyonu, formaldehit solüsyonunda toz sitrik asit çözdürülerek hazırlandı (14).

**Standardın veya sütteki ampisilin derivatizasyon işlemi:** 1ml. standart (veya süt) çözeltisi üzerine 1 ml Sitrik asit çözeltisi konuldu. Üzerine 100  $\mu$ l HClO<sub>4</sub> (E. Merck) eklendi ve karışım 80 °C su banyosunda 1 saat tutularak derivatizasyon tamamlandı. Örnekler 4000 rpm de 15 dakika santrifüj edildikten sonra ve 0.45  $\mu$ m selüloz membrandan geçirilerek filtre edildi. 20  $\mu$ l numune C<sub>8</sub> kolonuna enjekte edildi.

**Mobil faz:** Mobil faz 20 mM HClO<sub>4</sub> + Metanol (55:45 v/v) (E. Merck) karışımından hazırlandı ve pH'ı bir cam elektrotla 1.7' ye ayarlandı. Mobil faz (Millipore 0.45  $\mu$ m geçirilerek) filtre edildi ve kullanmadan önce vakum ile çözünmüş gazlarından arındırıldı.

**Kromatografi:** Mobil faz LC-10 AD model HPLC pompa (Shimadzu, Japonya) ile 1 ml/ min akış hızında izokratik olarak kullanıldı. Numuneler Rheodyne 7124 enjeksiyon (20-ml yükleme kapasiteli) valfına verildi. RF-10A model floresan detektör (Shimadzu, Japan) ile 346 nm eksitasyon ve 422 nm emisyonunda okundu. Numuneler C<sub>8</sub> kolonda(150x4.6 mm, Shimadzu, Japan) ve oda ısısında ayrıldı. Sonuçlar C-R6A model Chromatopac integrator (Shimadzu) tarafından hesaplandı.

### Sonuç ve Tartışma

Van marketlerinde halk tarafından piyasaya arz edilen çiğ 26 süt numunesinde ampisilin yeni ve hassas bir metodla araştırılmıştır. Hiç bir süt numunesinde ampisilin rezidüsüne rastlanmamıştır. Ampisilin sütte tanınmasında UV detektör uzun zamandan beri kullanılmaktadır (6,10,11,15). Bu çalışmada sütte bulunan ampisilin derivatize edilip floresan özellik kazandırılarak, ampisilin tanı sınırı artırılmıştır (14). Bu metod ampisilini 10 ng/ml sınırına kadar okuyabilmektedir.

Standart ve süt örneklerine ait kromatogram pikleri şekil 1' de görülmektedir. Ampisilin için tutulma zamanı 4.1 dakika olarak bulundu. Bu da numunelerin en geç 4-5 dakika arasında problemsiz olarak tekrar okunmasına izin vermektedir.

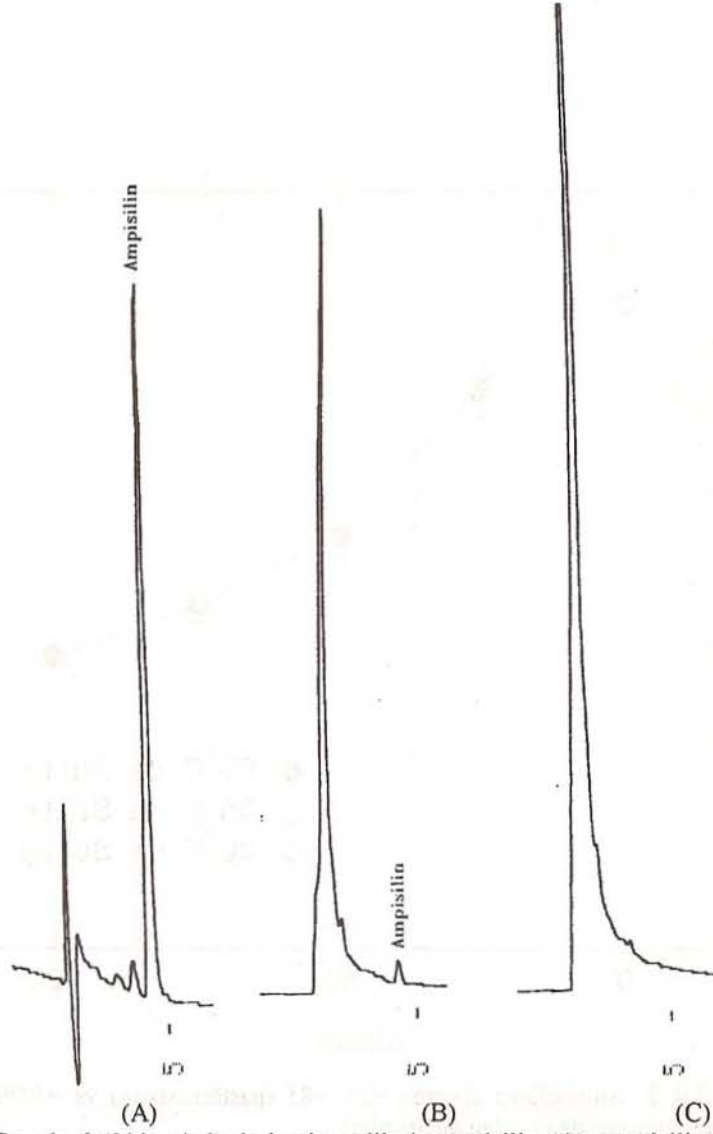
Demet ve arkadaşları (7), Konya yöresindeki mandıralardan topladıkları sütlerde penisilin G, V ve ampisilin kalıntı analizi yaptıkları çalışmalarında,

likit kromatografisi ile UV dedektörde ayrımı yapılan süt örneklerinde ampisilin ve penisilin V kalıntısının bulunamamasına karşılık 50 adet süt örneğinin altısında penisilin G potasyum (0.385, 12.032, 0.443, 6.048, 1.291, 3.445 µg/kg ) bulunduğunu bildirmektedirler.

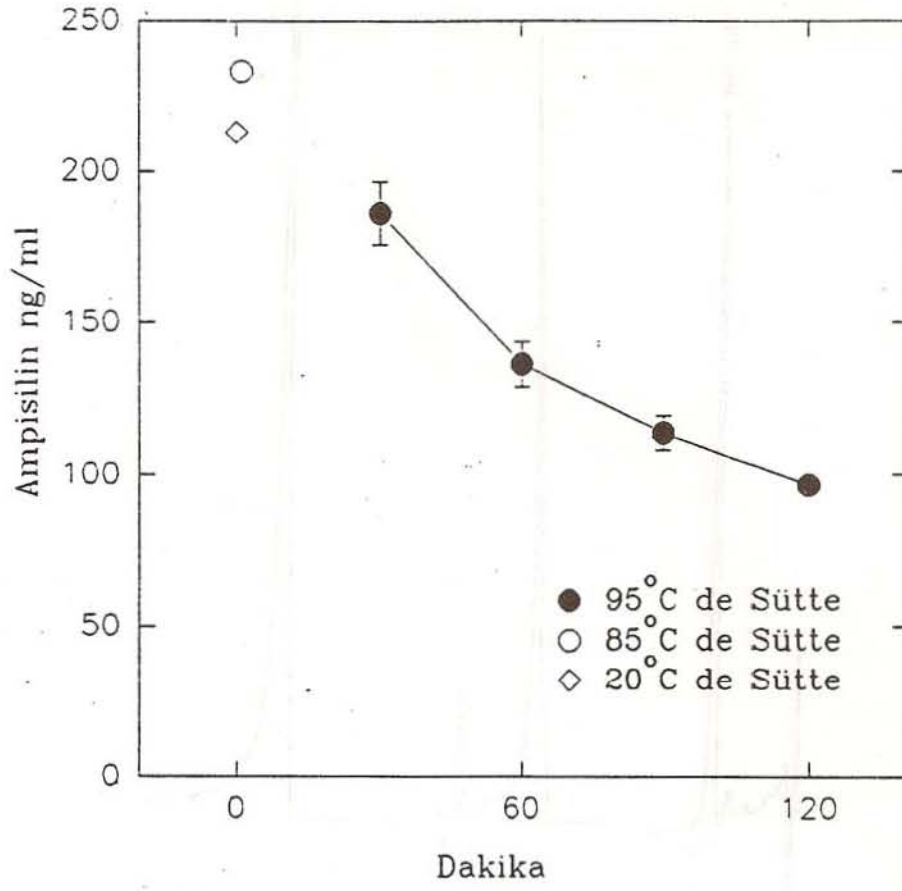
Ampisilin katılan sütlerde ampisilinin ısıtma ile meydana gelebilecek değişimleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Kaslarda penisilin G rezidülerinin - 20 °C de 10 günlük bir saklamada kaybolduğu bildirilmektedir. 10 gün sonra yaklaşık % 50 oranında bir kayıba uğradığı belirtilmektedir ( 2 ). Pastörizasyon ve ısıtmanın sütteki antibiyotik kalıntıları yok etmediği ve sütün 100°C ye kadar ısıtılması ile penisilinin % 50 , tetrasiklinin % 90, streptomisin % 66, oranında tahrip olduğu buna karşılık kloramfenikolün ısıya dayanıklı olduğu bildirilmektedir (16).

85°C de 1 dakika ısıya maruz bırakılarak pastörize edilen ampisilinli sütlerde bu çeşit bir ısının ampisilin üzerine bir etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır. Ampisilinli sütlerin 95°C de 30, 60, 90 ve 120 dakika ısıya maruz bırakılmaları sonucunda kalıntı konsantrasyonlarının zamana bağımlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Şekil 2). Ortalama ampisilin değerleri Tukey's testi ( 5 ) ile karşılaştırıldıklarında zamanlar arasında önemli farklılıklar olduğu tesbit edilmiştir (P<0.05). Bu azalma +20°C de başlangıç dakikada okunan değerlere oranla sırasıyla % 12.7, % 35.8, % 46.6 ve % 54.7 oranlarında olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, Van marketlerinde halk tarafından satışa arz edilen 26 çiğ süt numunesinde ampisilin kalıntısına rastlanmamıştır. Ampisilin pastörizasyon ısısına karşı dayanıklı olmasına karşın, ısının uzun süre uygulanmasıyla ampisilin miktarında azalma belirlenmiştir. Pratik olarak kısa süreli ısıtmanın ampisilin üzerine etkisi olmadığından, halk sağlığı açısından sütlerde ampisilin rezidüsünün belirtilen tolerans düzeyini aşmaması lazımdır. Bu nedenle ilgili kurumlarca, periyodik aralıklarla sütlerin bu antibiyotik kalıntılarının mevcudiyeti kontrol edilmelidir.



Şekil 1. Standard (300ng/ml) derivatize edilmiş ampisilin (A), ampisilin eklenmiş süt numunesi (10ng/ml) (B) ve Van yöresinde satılan ampisilin kalıntısı ihtiva etmeyen süt numune (C) kromatogramları. Numuneler C<sub>8</sub> kolonunda 20 mM HClO<sub>4</sub> + Metanol (55:45 v/v) mobil fazıyla izokratik olarak ayrılmışlardır. Tanılar floresans dedektörde (Eks:346 nm ve Ems:422 nm) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. Ampisilin sütte +20, +85 (pastörizasyon) ve +95°C de, zamanla meydana gelen değişimleri.



## Kaynaklar

1. Berger, K. and Petz, M. (1990): *In Residues of Veterinary Drugs in Food*, N. Haagsma, A. Ruiter, P. B. Czedik Eysenberg (Eds), *Proceeding of the Euro Residue Conference, Noordwijerhout, The Netherlands*, 118-122.
2. Boison, J. O. (1992): *Chromatographic Methods of Analysis for Penicillins in Food-Animal Tissues and Their Significance in Regulatory Programs for Residue Reduction and Avoidance.*, *Journal of Chromatography*, 624, 171-194.
3. Boison, J. O. K., Keng, L. J. Y. and Mac Neil, J. D. (1994): *Analysis of Penicillin G in Milk by Liquid Chromatography*. *J. AOAC Internat.*, 77: 565-570.
4. Booth, N. M. and Mc Donald, L. E., (1982): *Veterinary Pharmacology and Therapeutic*. The Iowa State University, Ames, IA, USA.
5. Cochran, W. G. and Cox, G. M. (1950): *Experimental Designs*, John Wiley & Sons, New York, USA. pp.1-611.
6. Cullor, J. S., Enennam, A. V., Perani, L., Dellinger, J., Smith, W. L., Thompson, T., Payne, M. A., Jensen, L., Guterbock, W. and M. N. (1994): *Performance of Various Tests Used to Screen Antibiotic Residues in Milk Samples from Individual Animals*, *J. AOAC Internat.*, 77, 862-870.
7. Demet, Ö., Acet, A., Traş, B., Baş, A. L. ve Eğilmez, İ. (1992): *Konya'da Faaliyet Gösteren Çeşitli Mandrallardan Toplanan Süt Örneklerinde Penisilin G, Ampisilin ve Penisilin V Kalıntılarının Araştırılması*. *S.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 8: 33-35.
8. Fallow, A., Booth, R. F. G. and Bell, L. D. (1982): *Applications of HPLC in Biochemistry*. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Ed by. R. H. Burdon and P. H. Van Knippenberg. *Elsivier Science Pub. Amsterdam, Netherland*, 7: 296-305.
9. Kaya, S. ve Şahal, M. (1990): *Besinlerimizdeki İlaç Kalıntıları, Bunlara İlişkin Tolerans Düzeyleri, İlaç Verilmiş Hayvanlarda Uyulması Gereken Kesim Öncesi Bekletme ve Sütün Kullanma Süreleri*. *Tarımda Kaynak Tarımsal Kalkınma Vakfı Yay.*, Ankara., 1-2: 22-28.
10. Lal, J., Paliwal, K., Grover, P. K. and Gupta, R. C. (1994): *Determination of Ampicillin in Serum by High-Performance Liquid Chromatography with Precolumn Derivatization*. *J. Chromatography*, 655: 142-146.
11. Moats, W. (1994): *Determination of Ampicillin and Amoxicillin in Milk with an Automated Liquid Chromatographic Cleanup*. *J. AOAC Int.*, 77: 41-45.
12. Riviere, J. E., Craigmill, A. L. and Sundlof, S. E. (1991): *Handbook of Comparative Pharmacokinetics and Residues of Veterinary Antimicrobials,  $\beta$ -Laktam Antibiotics*. C.R.C. Press, Boca Baton. Fl. 3, 37-173.
13. Şanlı, Y. ve Kaya, S. (1991): *Veteriner Farmakoloji. Kemoterapötikler*. Birinci Baskı, 553-624 Medisan Yayınevi, Ankara.

14. Testereci, H., Yörük, I.H., Kahraman, T., Dülger, H. and Ekin S. (1995): *Fluoremetric Determination of Ampicillin in Milk with Precolumn Derivatization by High Performance Liquid Chromatography*. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg* 6(1-2) . (Baskıda).

15. Tyczkowska, K. L., Voyksner, R. D., Straub, R. F. and Aronson, A. L. (1994): *Simultaneous Multiresidue Analysis of  $\beta$ -Laktam Antibiotics in Bovine Milk by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection and Conformation by Electrospray Mass Spectrometry*. *J. AOAC Internat.*, 77:1122-1131.

16. Vautier, H. E. and Pastigo, C.B. (1986): *Bovine mastitis and antibiotic in milk. Risc to public health*. *World Anim. Rev.*, 60, 41-42.