



## Farklı Protein İçerikli Pamuk Tohumu Küspelerinin HPLC Yöntemi ile Gossipol Düzeylerinin Belirlenmesi

### Determination of Gossypol Levels by HPLC Method of Cotton Seed Meals with Different Protein Contents

Habil UMUR<sup>1</sup>, Figen KÜTÜKOĞLU<sup>2</sup>, Hacer EKŞİ KARAAĞAÇ<sup>3</sup>, Serkan KARA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Zir. Yük. Müh., Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA, TÜRKİYE- ORCID ID-0000-0002-9824-1165

<sup>2</sup> Dr. Vet. Hekim, Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA, TÜRKİYE- ORCID ID-0000-0002-3360-6485

<sup>3</sup> Gıda Yük. Müh., Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA, TÜRKİYE- ORCID ID-0000-0003-0866-2212

<sup>4</sup> Zir. Müh., Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA, TÜRKİYE- ORCID ID-0000-0003-3091-5466

#### Özet

**Amaç:** Bu çalışma ülkemizde pamuk üretiminin yaygın olduğu Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden toplanan pamuklardan elde edilmiş farklı protein içerikli pamuk tohumu küspelerinin (+), (-) gossipol izomerleri ve toplam gossipol miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) metodu ile belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

**Materyal ve Yöntem:** Pamuk tohumu küspelerinin örnekleme 2013 ve 2014 üretim yıllarında yapılmış ve (+), (-) gossipol izomerleri ve toplam gossipol miktarları Hron ve ark. (1999)'un geliştirmiş oldukları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) metoduna göre belirlenmiştir.

Gossipol analizinde HPLC-PDA (Photo Diode Array Dedector) dedektörlü (Shimadzu, Japon) likit kromatografi cihazı, InterSustain C<sub>18</sub> (250x4.6mm, 5 µm) (GL Sciences Inc., Japon) kolon, mobil faz olarak %80 asetonitril, %20 10 nM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tampon kullanılmış olup, 40°C'lik fırın sıcaklığında şartlandırılmış ve 254 nm dalga boyunda, 20 µL enjeksiyon yapılarak 1 mL/dakika akış hızı uygulanmıştır.

**Bulgular:** Araştırmada, 2013 ve 2014 üretim yıllarında elde edilmiş ve %10,79-36,40 ham protein içeriğindeki pamuk tohumu küspelerinin (+), (-) gossipol izomerleri ve toplam gossipol miktarları sırasıyla; 30,26-1.134,00 mg/kg, 37,21-933,32 mg/kg ve 72,37-2.285,38 mg/kg olarak belirlenmiştir.

**Sonuç:** Ülkemizde pamuk tohumu küspelerinde gossipol izomerleri üzerinde yapılmış çalışma olmadığı için hayvanlarda oluşturacağı toksik etkileri değerlendirmek mümkün olmamıştır. Bu nedenle pamuk tohumu küspelerinde gossipol izomerlerinin hayvan türlerine göre toksik etkisini ortaya koyan daha ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Pamuk Tohumu Küspesi, Gossipol, HPLC Metot

#### Abstract

**Objective:** This study was carried out to determine the (+), (-) gossypol isomers and the total gossypol content by high-performance liquid chromatography (HPLC) method in cottonseed meal obtained from cotton collected from Aegean, Mediterranean and Southeastern Anatolia regions where cotton production is common in Turkey.

**Material and Methods:** Sampling of cottonseed meal was formed in 2013 and 2014 production years and the (+), (-) gossypol isomers and the total gossypol content were determined by the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method developed by Hron et al. (1999).

For Gossypol analysis, HPLC-PDA (Photo Diode Array Dedector) detector (Shimadzu, Japanese) high-performance liquid chromatography, InterSustain C<sub>18</sub> (250x4.6mm, 5 µm) (GL Sciences Inc., Japanese) column, 80% acetonitrile as mobile phase, 20% 10 nM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer were used and conditioned at 40°C oven temperature and a flow rate of 1 mL/min was applied at 254 nm wavelength by injection of 20 µL.

**Results:** In the study, the (+), (-) gossypol isomers and total gossypol contents of cottonseed meals obtained in the years 2013 and 2014 and 10,79-36,40% of crude protein content, were determined as 30,26-1.134,00 mg/kg, 37,21-933,32 mg/kg and 72,37-2.285,38 mg/kg respectively.

**Conclusion:** It was not possible to evaluate its toxic effects on animals because there was no study on gossypol isomers in cottonseed meal in our country. Therefore, more detailed studies are needed to reveal the toxic effects of gossypol isomers of cottonseed meal.

**Key Words:** Cottonseed Meal, Gossypol, HPLC Method

## 1. Giriş

Hayvan beslemede, hayvansal protein kaynaklarına göre daha ekonomik olan bitkisel protein kaynakları önemli yer tutmaktadır. Bitkisel protein kaynaklarını da başlıca yağlı tohumlar ve bunların küspeleri oluşturmaktadır (Ustaoglu 2007).

Çok eski yıllardan beri yetiştirilmekte olan pamuk bitkisinden, lif ve tohumu olmak üzere iki önemli ürün elde edilmektedir. Tohumlarının değerli bir yağ ve protein kaynağı olduğunun anlaşılması, pamuk bitkisinin ekim alanının daha da genişlemesini sağlamıştır (Kırkpınar ve Ergün 2003).

Çırcır makinesinde işlenen tohumun orijinal ağırlığının yaklaşık %6-12'lik kısmını pamuk lifleri, %20-25'lik kısmını kabuk oluşturmaktadır. Pamuk tohumu (PT)'nda, %19-28 oranında yağ bulunur. Tohumdan yağ çıkarıldıktan sonra geri kalan %35-45 gibi önemli bir kısım ise pamuk tohumu küspesi (PTK) olarak elde edilmektedir (Wellmann 2007).

TÜİK verilerine göre dünyada 2016 yılında yağlı tohum küspesi üretim miktarı, 554 milyon ton gerçekleşmiş olup 127 milyon tonluk üretim miktarı ile üretimin %23'lük kısmını 1. sırada ABD gerçekleştirmiştir. Toplam üretimde, 337 milyon ton ile soya küspesi 1. sırayı alırken PTK 40 milyon tonluk bir kısmı oluşturmuştur. Türkiye'de ise 2016 yılında 2.698.000 ton yağlı tohum üretilmiş, 1.250.000 tonluk üretim ile 1. sırayı ayçiçeği tohumu, 1.100.000 tonluk üretim ile 2. sırayı PT almıştır (Anonim 2016a). Yine TÜİK verilerine göre son 10 yıllık dönemde yağlı tohum küspelerinin ithalatı 12.597.000 ton gerçekleşmiş ve 4.150 milyon dolar ödeme yapılmıştır. Bu ithalat miktarı son 10 yılda, yağlı tohum küspelerinden soyanın ithalatı 15.204.000 ton, ayçiçeğinin ise 5.990.000 ton olmasına karşılık PTK 74.000 ton ile ithalatı yok denecek kadar azdır (Anonim 2016b). Yani PTK, soya ve ayçiçeğinde olduğu gibi ithalata bağımlı değil, tamamen yerli üretime dayalı bir yem hammaddesidir.

PT, tek mideli çiftlik hayvanları ve insanlar için toksik etkiye sahip olan eter ve asetonla eriyebilen fenolik yapıda bir bileşik olan gossipol içerir. Pamuk bitkisinin kökleri tarafından sentezlenmesine karşın kökler dışındaki diğer tüm organlarda gland adı verilen salgı bezlerinde bulunmaktadır. Bitkinin kökleri dışında her yerinde, özellikle tohumlarında bulunan toksik etkili gossipol nedeniyle gıda ve hayvan yemi sanayisinde birçok ekonomik sorunlar ortaya çıkmaktadır (Efe 2016). PT'deki gossipolün hemen hemen tamamı serbest formda ise de küspenin üretimi esnasında serbest formdaki gossipol değişen miktarlarda lizin ile bağlı forma dönüşmektedir. Böylece gossipol biyolojik aktivitesinin önemli bir kısmını kaybeder. Toksik etki yapan serbest gossipoldür (Chandrashekar ve ark. 2013, Khodwe ve Bhowmick 2013). PT'deki gossipol, küspe elde edilme yöntemine göre bir kısmı küspede kalmakta, bir kısmı yağ ile ekstrakte edilmekte, bir kısmı gossipol-lizin kompleksine dönüşmekte ve bir kısmı da serbest formda kalmaktadır. İşlenmiş küspede, serbest halde kalmış gossipol ile bağlı gossipolün toplamı, küspenin toplam gossipol miktarını verir ve yağın ekstraksiyonunda kullanılan metottan etkilenmez (Wellmann 2007).

PT'de, 300-24.000 mg/kg arasında serbest ve bağlı formda gossipol bulunur. PTK'da ise uygulanan yağ çıkarma yöntemine göre (sıkma, sıkma-süzme ve çözücüyle ekstraksiyon gibi) ortamdaki gossipolün çok önemli bir kısmı (%80-98) tahrip edilmekte veya uzaklaştırılarak 200-1.000 mg/kg arasında serbest gossipol düzeyine inmektedir. Bu işlemler esnasında ısıl işlem uygulandığı için gossipol ile birlikte bulunan lizin parçalanmakta ve PTK'nın besleyici değerini azaltmaktadır. Bu durumdan dolayı pamuk tohumu küspesi katılmış yemler mutlaka lizin yönünden desteklenmelidir (Kaya ve Yavuz 1993).

Tuncer ve Yalçın (1986), PTK'nın gossipol düzeyi üzerine küspenin elde edilmiş şeklinin de etkili olduğunu, ekspeller ve pres yöntemi ile elde edilen küspelerin ekstraksiyon küspelerine göre daha düşük düzeyde gossipol içerdiği ve ekspeller, pres ve ekstraksiyon küspelerinin serbest gossipol düzeylerini 300, 400 ve 2.400 mg/kg olarak bildirmektedirler.

Genel bir kural olarak, kanatlılar geviş getirenler nazarın gossipole karşı daha hassastırlar. Kasaplık piliç yem karmalarında serbest gossipol miktarı 400 mg/kg'ın üzerine çıktığında iştah ve canlı ağırlıkta gerilemeyle başlayıp ölümle sonuçlanan durumlar ortaya çıkmaktadır. Yumurta tavuklarında ise gossipol, yumurta verimi ve çıkış gücünü geriletmekte, ayrıca depolanan yumurtaların sarılarında renk bozukluklarına sebep olmaktadır. Bu nedenle, yumurta tavuklarının yem karmalarında serbest gossipol miktarının 300 mg/kg'dan az olması gerekmektedir. Bunun yanında, yeme demir tuzları ilavesiyle gossipolün zararlı

etkileri giderilebilmektedir. Çünkü serbest gossipol, demir tuzlarıyla sindirim enzimlerinin etkileyemediği kompleks bileşikler meydana getirmekte ve gübre ile dışarı atılmaktadır. Gossipollü PTK'dan kasaplık piliç karmalarına %30-35 hatta %50'ye varan oranlarda, yumurta tavuklarının karmalarına ise %20 oranında katıldığında her hangi bir zararlı etkisi olmamaktadır. Karabulut ve Filya (2007)'ye göre kümes kanatlılarının rasyon karmalarına %10-15, broilerlere ise %10 düzeyine kadar katılması durumunda zararlı bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Geviş getiren hayvanlar ise gossipole karşı kanatlılardan daha az hassas oldukları için gerek genç, gerekse gelişmesini tamamlamış sığır ve koyunların kesif yem karmalarına protein takviyesi olarak %50 ve hatta daha yüksek oranlarda pamuk tohumu küspesi katılabilir (Efe 2016).

Tuncer ve Yalçın (1986)'ya göre yumurta tavuklarına 50 mg/kg gossipol düzeyine kadar herhangi bir yan etki yapmamaktadır. Ancak yumurta tavuk rasyonlarına 40 mg/kg, broilerlerde 150 mg/kg üst sınırına ulaşabilmektedir. Ancak kanatlı rasyonlarına, her mg serbest gossipol için yumurta tavuklarına 4 mg/kg, broilerlere 1-2 mg/kg demirsülfat ilavesi yumurta tavuklarında 150-200 mg/kg, broilerlerde 400 mg/kg düzeylerindeki gossipolün zararlı etkisi olmamaktadır.

Ülkemizde 'Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ'de %12 rutubet içeren üründe PT'de 5.000 mg/kg, pres ya da ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiş PTK'da ise 1.200 mg/kg olarak gossipol düzeyi sınırlandırılmıştır (Karabulut ve Filya 2007, Ustaoglu 2007, Anonim 2014).

Gossipol öncelikle kronik zehirlenmeye sebep olan ve vücutta birikebilen bir maddedir. Düşük düzeyde uzun süre alınmasıyla bir kaç ay içinde hayvanlarda yem tüketiminde azalma, gelişme geriliği, zayıflama, kıl renginde değişme, anemi (gossipolün demiri bağlaması sonucu Hb miktarında, alyuvar, trombosit ve akyuvar sayısında azalma), güçsüzlük, isteksizlik, yumurta veriminde düşme veya durma, yumurtadan civciv çıkma oranında azalma, yumurta sarısı (gossipol demir bileşiğinden dolayı zeytin yeşili renk alma) ve akında (siklopropan yağ asitinden dolayı pembe renk alma) renk değişiklikleri görülür (Kaya ve Yavuz 1993).

PT ve PTK'da bulunan gossipolün hem (+), hem de (-) izomerleri mevcuttur. Gossipolün zararları üzerine birçok çalışma bulunmasına rağmen izomerlerinin sayısal olarak belirlenmesi için uygun yöntem olmadığı için yeterli çalışma mevcut değildir. Gossipolün izomerlerinin belirlenmesine yönelik ilk çalışma Kim ve ark. (1996) tarafından, plazma ve doku örneklerinde R-(-)-2-amino-1-propanol'ün gossipolü aniline çevirebildiğini belirleyerek bir metot geliştirmesi şeklindedir. Ancak geliştirilen bu yöntem PT'de gossipolün belirlenmesi için uygun bir yöntem olmamıştır. Hron ve ark. (1999), yaptıkları çalışma ile bu yöntemi PT'ye modifiye etmiş ve gossipolün izomerlerinin sayısal olarak belirlenmesini mümkün kılan metodu geliştirmişlerdir. Bu aşamadan sonra gossipol izomerlerinin toksisitesi üzerine çalışmalara başlanılmıştır.

Hron ve ark. (1999), PT'de gossipolün (+) ve (-) izomerleri üzerinde yaptıkları çalışmada 1996 yılında PT'nin 6 Upland varyetelerinde toplam gossipol içerisindeki izomerlerin oranlarını (+) izomeri %67,6, (-) izomeri %32,4 olarak belirlerken Prima varyetesinde ise %46,9 (+) izomeri, %53,1 (-) izomeri olduğunu saptamışlardır. Ayrıca Prima varyetesinin (-) izomerinin (+) izomere göre daha yüksek bulunmasının yanında Upland varyetelerine göre toplam gossipol düzeyinin daha düşük olduğunu belirlemişlerdir.

Bu konuda Lordelo ve ark. (2004), gossipolün etlik piliçler üzerindeki toksik etkiyi incelemişlerdir. Bu çalışmada, gossipolün (+) ve (-) izomerlerini her ikisinin de etlik piliçler üzerine toksik etkili olduğunu ve (-) izomerin (+) izomere göre daha fazla zararlı etki yaptığını belirlemişlerdir. Benzer bir çalışmada ise Lordelo ve ark. (2005), yumurta tavuklarında gossipol izomerlerinin toksik etkisini incelemişlerdir. 42 haftalık yaştaki 25 tavuğu, kontrol, 200 (+), 400 (+), 200 (-) ve 400 (-) mg/kg gossipol izomerleri içeren mısır/soya bazlı yemler ile 20 gün süre ile beslemişler, sonuç olarak kontrol ile (+) ve (-) izomeri arasında yumurta verimi açısından farklılık çıkmamış, fakat (+) gossipol izomeri ile beslenen tavukların toplam yumurta verimi kontrol ve (-) gossipol izomeri içeren gruplara göre düşük bulunmuştur (p<0,05).

Bu araştırma, ülkemizde yaygın üretim bölgeleri olan Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde üretilmiş pamuklardan elde edilmiş farklı protein içerikli PTK'ların Hron ve ark. (1999)'un geliştirmiş oldukları HPLC metodu ile gossipolün (+) ve (-) izomerlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Yem Materyali

Araştırmanın yem materyalini, ülkemizde yaygın üretim bölgeleri olan Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde 2013 ve 2014 üretim yıllarında yetiştirilmiş pamuklardan elde edilmiş ve ham protein (HP) içeriği %26 ve altında, %27-29, %30-32, %33-35, %36 ve üzerinde olan PTK'lar oluşturmuştur. PTK'lar, PT'den yağ çıkaran fabrikalardan C.P. Standart Gıda San. ve Tic. A.Ş. tarafından sağlanmıştır. Yem materyali, HP içeriklerine göre her bir grupta 10 adet olacak şekilde, farklı üretim yerlerinden Anonim (2017)'de belirtilen esaslara uyularak yaklaşık 10 kg alınmıştır.

## 2.2. Kimyasal Analizler

Bu çalışmada kimyasal analizler, kuru madde (KM) Anonim (2017)'ye, HP Leco-FP-528 Azot/Protein Cihazı kullanılarak Anonim (2007)'ye, gossipol HPLC Cihazı kullanılarak Hron ve ark. (1999)'a göre yapılmıştır.

### Gossipol Tayini

#### Çözeltiler

**Mobil faz:** %80 asetonitril (Sigma CAS No: 75-05-8, %99,9 HPLC gradient grade saflıkta), %20 10 nM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma CAS No: 7778-77-0, %99,99 Suprapur anhydrous saflıkta) tampon (pH=3'e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  kullanılarak ayarlanmış). 200 ml 1,36 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren çözelti + 800 ml Asetonitril eklenerek hazırlanır ve kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilir.

**Kompleks Çözelti:** 100 ml'lik ölçülü balona 2 ml - (R)-(-)-2-amino-1-propanol (Acros Organics CAS No: 35320-23-1, %98 pure saflıkta) ve 10 ml glacial asetik asit (Sigma CAS No: 64-19-7, %99,8 HPLC saflıkta) eklenir, oda sıcaklığına soğutulur. Ölçülü balon N,N-Dimethylformamide (Sigma CAS No: 68-12-2, %99,9 HPLC LiChropur saflıkta) ile tamamlanır. Çözelti buzdolabında saklanır, kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilir.

**Standart Rasemik Gossipol Çözeltileri:** 25 ml'lik hacimli ölçülü balona 38,0 mg gossipol asetik asit (Sigma CAS No: 12542-36-8, %95 HPLC saflıkta) tartılır. 25 ml'lik hacme kompleks çözelti ile tamamlanır. Tüm kimyasalın çözünmesi sağlanır. Bu şekilde, gossipol asetik asitten gossipole 0,8962 dönüşüm faktörü kullanılarak 1.294 mg/kg gossipol konsantrasyonuna sahip stok çözelti hazırlanmış olur.

#### Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Stok çözeltilerden 0,5-1,0-2,0-3,0-4,0-5,0 ml standart gossipol çözeltileri 20x125 mm ölçülü cam tüplere aktarılır, her tübe 4 ml kompleks çözelti ilave edilir. Tüplerin kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra vortekslenir, 100°C'ye ayarlanmış etüvde 30 dakika tutulur, süre sonunda soğutulur, her tüpe 16 ml mobil faz ilave edilir. Tüpler kapatılıp karıştırıldıktan sonra standart Watman No:2 filtre kağıdından süzülür. Her tüpten 5 ml'lik kısım alınarak 10 ml'lik deney tüplerine konur ve 10 ml'lik hacme mobil faz ile tamamlanır. Bu şekilde kalibrasyon eğrisi oluşturmak için hazırlanan standartlar 16, 32, 64, 128, 256 ve 320 mg/kg gossipol konsantrasyonlarında olmaktadır. Daha sonra tüpler vortekslelendikten sonra 0,45 µm membran fitreden geçirilerek viallenir.

#### Örneklerden (+)-, (-)- ve Toplam Gossipolün Ekstraksiyonu

PTK örnekleri milli bir değirmende öğütülür ve tohum kısımlarının ayrılması için elenir. Öğütülen bu kısım, 82°C'de 4 saat kurutulur. Daha sonra kurutulan numuneden 0,2 g (1,6-3,5 mg gossipol içerecek şekilde) 20x125 mm ölçülü tüpe tartılır. Üzerine 4 ml kompleks çözelti ilave edilir. Tüplerin kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra vortekslenir, 100°C'ye ayarlanmış etüvde 30 dakika tutulur, süre sonunda soğutulur, her tüpe 16 ml mobil faz ilave edilir. Tüpler kapatılıp karıştırıldıktan sonra standart Watman No:2 filtre kağıdından süzülür. Her tüpten 5 ml'lik kısım alınarak 10 ml'lik deney tüplerine konur ve 10 ml'lik hacme mobil faz ile tamamlanır. Tüpler vortekslelendikten sonra 0,45 µm membran fitreden geçirilerek viallenir.

#### (+)-, (-)- ve Toplam Gossipolün Belirlenmesi

Bu analizde HPLC-PDA (PhotoDiode Array Dedector) dedektörlü (Shimadzu, Japon) likit koromotografi cihazı kullanılmıştır. Kolon olarak InterSustain C<sub>18</sub> (250x4.6mm, 5 µm; GL Sciences Inc., Japon) kullanılmış olup 40°C'lik fırın sıcaklığında şartlandırılmıştır. Mobil faz olarak %80 asetonitril, %20 10 nM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon kullanılmış, 254 nm dalga boyunda, 20 µL enjeksiyon yapılarak 1 mL/dakika akış hızı uygulanmıştır. Toplam analiz süresi 10 dakikadır.



### (+)-, (-)- ve Toplam Gossipolün Hesaplanması

Her bir izomer için hesaplama aşağıdaki eşitliklerden yararlanılmaktadır:

$$(+) \text{-gossipol (mg)} = m(+) ((+) \text{-pik alanı}) + b(+)$$

$$(-) \text{-gossipol (mg)} = m(-) ((-) \text{-pik alanı}) + b(-)$$

#### Burada;

m: Her bir izomer için kalibrasyon eğrisinin eğimi,

b: Her bir izomer için kesişim noktasını,

ifade etmektedir.

$$\% (+) \text{ gossipol} = (m(+) ((+) \text{-pik alanı}) + b(+)) / (\text{Örnek Miktarı (g)} \times 10)$$

$$\% (-) \text{ gossipol} = (m(-) ((-) \text{-pik alanı}) + b(-)) / (\text{Örnek Miktarı (g)} \times 10)$$

$$\text{Toplam Gossipol (\%)} = (+) \text{ gossipol (\%)} + (-) \text{ gossipol (\%)}$$

olarak hesaplanır.

### 2.3. İstatistiki Analizler

Araştırma sonucunda elde edilen bulguların ortalamaları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde varyans analizi için JUMP istatistik programından, görülen farklılıkların önem seviyesinin belirlenmesinde ise LSD (Least Significant Difference) Karşılaştırma Testi'nden yararlanılmıştır.

### 3. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, PTK Gruplarının 2013 ve 2014 yıllarındaki HP ve gossipol içerikleri Çizelge 1 ve Çizelge 2'de, HPLC'de gossipol standardı ve PTK örneğine ait kromatogramlar ise Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir.

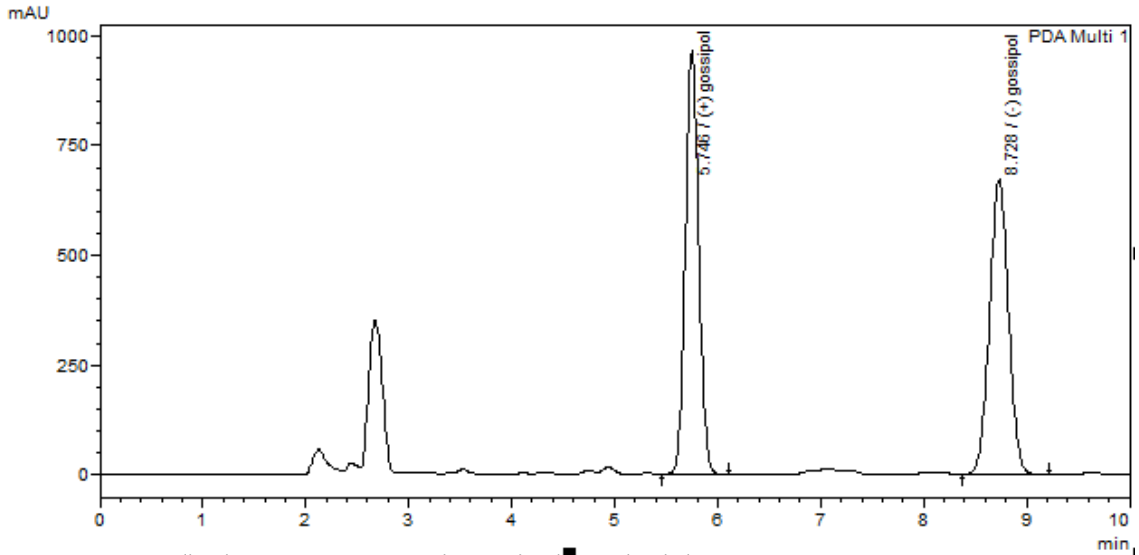
Çizelge 1. PTK'ların 2013 ve 2014 yılları HP içerikleri.

ANALİZLER	2013				
	1. GRUP (%10) (n=10)	2. GRUP (%22) (n=10)	3. GRUP (%25) (n=10)	4. GRUP (%30) (n=10)	5. GRUP (%34) (n=10)
KM (%)	92,15±0,13	94,55±0,21	94,97±0,15	89,60±0,08	89,12±0,05
HP (%)	10,79±0,11	22,12±0,43	25,13±0,26	30,68±0,21	34,24±0,81
ANALİZLER	2014				
	1. GRUP (%17) (n=10)	2. GRUP (%26) (n=10)	3. GRUP (%28) (n=10)	4. GRUP (%32) (n=10)	5. GRUP (%36) (n=10)
KM (%)	92,39±0,05	94,49±0,07	94,82±0,03	90,46±0,03	90,48±0,05
HP (%)	17,51±0,19	26,03±0,13	28,73±0,04	32,41±0,05	36,40±0,20

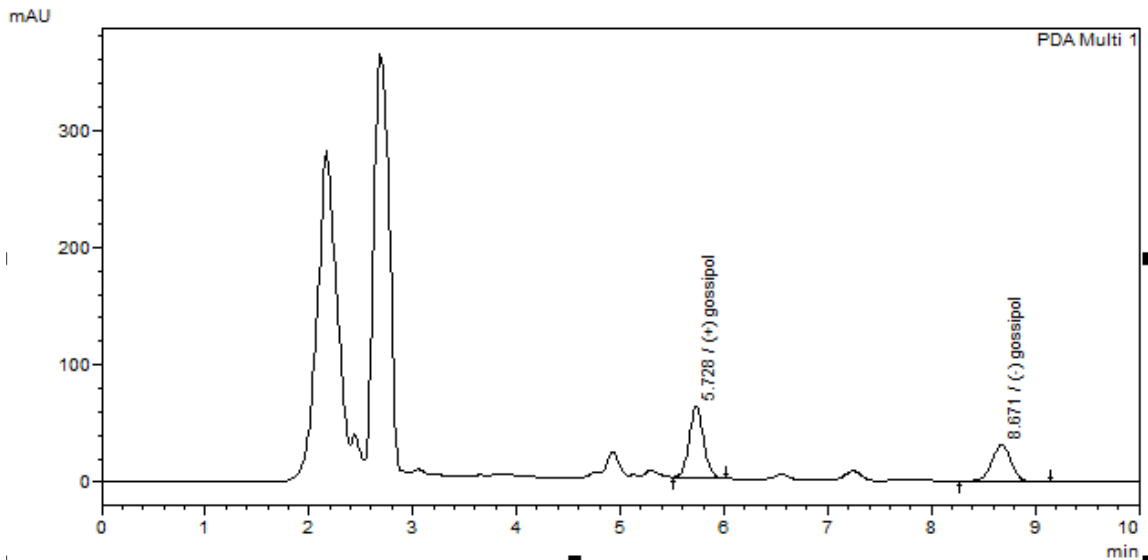
Çizelge 2. PTK'ların 2013 ve 2014 yılları (+), (-) ve toplam gossipol içerikleri.

Parametre	2013				
	1. GRUP (%10) (n=10)	2. GRUP (%22) (n=10)	3. GRUP (%25) (n=10)	4. GRUP (%30) (n=10)	5. GRUP (%34) (n=10)
(+) Gossipol (mg/kg)	30,26±2,20a	361,97±5,06c	126,42±1,54b	632,94±12,67d	676,53±107,62d
(-) Gossipol (mg/kg)	37,21±1,71a	269,64±3,25b	96,50±0,70a	511,37±9,68c	491,02±77,31c
Toplam Gossipol (mg/kg)	72,37±7,17a	727,64±78,80c	256,17±27,52b	1.287,22±137,84d	1.468,22±215,29d
Parametre	2014				
	1. GRUP (%17) (n=10)	2. GRUP (%26) (n=10)	3. GRUP (%28) (n=10)	4. GRUP (%32) (n=10)	5. GRUP (%36) (n=10)
(+) Gossipol (mg/kg)	134,33±0,34a	634,08±22,42b	790,83±119,95c	1.134,00±143,44d	1.119,01±17,12d
(-) Gossipol (mg/kg)	101,24±0,38a	434,45±15,89b	515,96±77,37b	933,32±112,83c	864,84±13,16c
Toplam Gossipol (mg/kg)	269,75±29,17a	1199,96±139,51b	1.642,04±238,56c	2.166,94±314,03d	2.285,38±244,61d

\*Aynı satırda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).



Şekil 1. 128 mg/kg konsantrasyonuna ait gossipol standardı kromatogramı.



Şekil 2. 2013 yılı 4. Grup (%30 HP) PTK örneğine ait gossipol kromatogramı.

PTK Gruplarının 2013 yılında HP içerikleri sırasıyla; %10,79±0,11, 22,12±0,43, 25,13±0,26, 30,68±0,21 ve 34,24±0,81, 2014 yılında ise %17,51±0,19, 26,03±0,13, 28,73±0,04, 32,41±0,05 ve 36,40±0,20 olarak belirlenmiştir.

PTK gruplarının 2013 yılında (+), (-) ve Toplam gossipol içerikleri (mg/kg) sırasıyla; 30,26±2,20, 361,97±5,06, 126,42±1,54, 632,94±12,67 ve 676,53±107,62; 37,21±1,71, 269,64±3,25, 96,50±0,70, 511,37±9,68 ve 491,02±77,31; 72,37±7,17, 727,64±78,80, 256,17±27,52, 1.287,22±137,84 ve 1.468,22±215,29 olarak belirlenmiştir. Toplam gossipol ve (+), (-) izomerleri 4. ve 5. grupta en yüksek, 1. grupta en düşük düzeyde bulunmuştur. 2013 yılında 1. grup haricinde (+) gossipol izomeri, (-) izomere göre daha yüksek değerler elde edilmiştir.

2013 yılında (+), (-) ve toplam gossipol içeriklerinin HP içeriklerine göre artış olmasına rağmen 3. grupta 2. gruba göre düşük bulunmasının nedeni bu gruptaki PTK'ların pres yöntemi ile elde edilmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Nitekim bu durum Tuncer ve Yalçın (1986)'nın bildirişleri ile uyum içerisindedir.

PTK gruplarının 2014 yılında (+), (-) ve Toplam gossipol içerikleri (mg/kg) sırasıyla; 134,33±0,34, 634,08±22,42, 790,83±119,95, 1.134,00±143,44 ve 1.119,01±17,12; 101,24±0,38, 434,45±15,89, 515,96±77,37, 933,32±112,83 ve 864,84±13,16; 269,75±29,17, 1.199,96±139,51, 1.642,04±238,56, 2.166,94±314,03 ve 2.285,38±244,61 olarak belirlenmiştir. Toplam gossipol 5. grupta en yüksek, 1. grupta en düşük düzeyde bulunurken (+) ve (-) izomerleri ise 4. grupta en yüksek, 1. grupta en düşük düzeyde bulunmuştur. 2014 yılında da 2013 yılına benzer şekilde (+) gossipol izomeri, (-) izomere göre daha yüksek değerler elde edilmiştir. Bu bulgular Hron ve ark. (1999)'un bildirişleriyle uyum içerisindedir.

Her iki yılda da 4 ve 5. Gruplar ile 1, 2 ve 3. Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur (p<0,01). 4 ve 5. Gruplarda (+), (-) ve Toplam gossipol düzeylerinin yüksek olmasının nedeni bu grupların HP içeriklerinin yüksek olmasını sağlayan pamuk tohumunun embriyo kısımlarının daha fazla bulunması ve embriyo kısımlarının da yüksek düzeyde gossipol içermesidir. Nitekim bu durum Efe (2016), Wellmann (2007), Kaya ve Yavuz (1993) bildirişleriyle benzerlik göstermektedir.

2013 ve 2014 yıllarında en yüksek gossipol düzeyi olan 2014 yılının 4. grubundaki (+), (-) ve toplam gossipol düzeyleri sırasıyla (mg/kg); 1,134, 933 ve 2166 yumurta tavuğu rasyon karmalarına %15 katılması durumunda rasyonun gossipol içerikleri yaklaşık olarak sırasıyla (mg/kg); 170, 139 ve 325 düzeylerinde, broilerlere ise %10 düzeyinde katılması durumunda ise 113, 93 ve 216 düzeylerinde olur. Bu düzeylerdeki gossipol Lordelo ve ark. (2004)'ün yumurta tavukları üzerinde yapmış olduğu çalışma sonuçlarına göre yumurta veriminde herhangi bir verim düşüklüğüne neden olmadan kullanılabilir. Benzer şekilde broilerlerde de Lordelo ve ark. (2005)'e göre olumsuz bir etkinin olmayacağı söylenebilir.

Araştırma sonucunda 2013 ve 2014 yıllarında elde edilmiş %10,79-36,40 HP içeriğindeki PTK'ların gossipolün (+) izomeri 30,26-1134,00 mg/kg, (-) izomeri 37,21-933,32 mg/kg ve toplam gossipol 72,37-2285,38 mg/kg düzeylerinde olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde PTK'da gossipolün izomerleri üzerinde yapılmış çalışma olmadığı için hayvanlarda meydana getirebilecek toksik etkilerini değerlendirmek mümkün olmamıştır. Bu nedenle ülkemizde PTK'da gossipolün izomerlerinin hayvan türlerine göre toksik etkisini ortaya koyan daha ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç vardır.

#### 4. Kaynaklar

- Anonim, 2007. Official methods of analysis of AOAC international.
- Anonim, 2014. Yemlerde istenmeyen maddeler hakkında tebliğ. 19.04.2014 tarih 28977 sayılı Resmi Gazete.
- Anonim, 2016a. Bitkisel üretim istatistikleri veri tabanı.
- Anonim, 2016b. Dış ticaret istatistikleri veri tabanı.
- Anonim, 2017. Yemlerin resmi kontrolü için numune alma ve analiz metotlarına dair yönetmelik. 21.01.2017 tarih 29955 sayılı Resmi Gazete.
- Chandrashekar, R., Kudle, K.R., Chaitanya, P.J. and Bhavani, N.L., 2013. Gossypol analysis in Bt and Non Bt cottonseed extracts by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). International Journal of Herbal Medicine, Volume:1, Issue:2, pp.53-58.
- Efe, L., 2016. Gossypolsüz Pamuklar ve önemi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv. Zir. Fak. Tarla Bitkileri Böl. (<http://cafelife.com.tr/ant/index.php/antbirlik/haberler/item/103-gossypolsuz-pamuklar-ve-onemi>).
- Hron Sr, H.L.Kim, R.J. and Fisher, G.S., 1999. Fetermination of (+)-, (-)-, and total gossypol in cottonseed by High-Performance Liquid Chromatography. JAOCS, Vol.76, No.11, pp.1351-1355.
- Karabulut, A. ve Filya, İ., 2007. Yemler bilgisi ve yem teknolojisi. U.Ü. Zir. Fak. Ders Notları No:67, (Genişletilmiş 4. Baskı), s. 81-82, Bursa.
- Kaya, S. ve Yavuz, H., 1993. Yem ve yem hammaddelerinde bulunan olumsuzluk faktörleri ve hayvanlara yönelik etkileri: 1: Organik Nitelikli Olumsuzluk Faktörleri. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 40(4): 386-614.
- Kırkpınar, F ve Ergül, M., 2003. Pamuk tohumu küspesinin yem olarak kullanımı. Pamukta Eğitim Semineri. Ege Üniv., 14-17 Ekim, İzmir, 223-235.
- Kim, H.L., Calhoun, M.C. and Stipanovic, R.D., 1996. Accumulation of gossypol enantiomers in ovine tissues, Comp, Biochem, Pfyiol, 113B:417-420p.
- Khodwe, M.S. and Bhowmick, D.N., 2013. Separation of of gossypol from cottonseed and prepatation of gossypol-free cottonseed cake. International Journal of Recent Scientific Research. Vol.4, Issue 8, pp. 1290-1295.
- Lordelo, M.M., Davis, A.J., Calhoun, M.C. and Dale, N.M., 2004. Relative toxicity of gossypol enantiomers in broilers. Poultry Science, Vol. 84, pp. 1376-1382.
- Lordelo, M.M., Davis, A.J., Calhoun, M.C. and Dale, N.M., 2005. Relative toxicity of gossypol isomers in laying hens. Poultry Science, Vol. 83, Suppl. 1, pp. 263.
- Tuncer, Ş.D. ve Yalçın, S., 1986. Türkiye’de üretilen pamuk tohumu küspelerinde gossypol düzeylerinin tespit edilmesi üzerinde bir araştırma. Selçuk Üniv. Vet. Fak. Derg. Cilt:2, Sayı:1, 125-134.
- Ustaoglu, A., 2007. Hatay ilinde üretimi yapılan pamuk tohumu küspelerinin besin madde içerikleri ve gossypol düzeylerinin belirlenmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi (Yayımlanmamış), 27 s, Antakya.
- Wellmann, K.T., 2007. Farklı düzeylerde kullanılan pamuk tohumu küspelerinin etlik piliçler üzerine etkileri. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi (Yayımlanmamış), 42s, Aydın.