



Rumen Sıvısında İmmuno-Affinite Kolon (IAK) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kombinasyonu ile Aflatoksinlerin Tayini

Murat Reis Akkaya¹, Ali İhsan Atalay², Mehmet Ali Bal³

¹Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yüreğir, Adana, ²Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Suveren Kampüsü, Iğdır, ³Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü

ÖZET

Öz bilgi/Amaç: Bu çalışmada rumen sıvısında aflatoksin (B₁, B₂, G₁, G₂) tayini için immuno-affinite kolon ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılan bir yöntem geliştirilerek laboratuvar içi validasyonu yapılmıştır.

Materyal ve Metot: Bu amaç için laktasyondaki bir inekten alınan aflatoksin içermeyen rumen sıvısı süzülüp -35°C'de 24 saat bekletildikten sonra oda sıcaklığına getirilerek kullanılmıştır. Rumen sıvısına değişik konsantrasyonlarda sertifikalı aflatoksin karışım standardı ilave edilerek yapılan çalışmada, metanol-su (70:30/v:v) ekstraksiyonu, immuno-affinite kolon ile aflatoksinlerin ekstraktan ayrılması, metanol ile aflatoksinlerin immuno-affinite kolondan alınması ve floresan detektörlü HPLC ile aflatoksin miktarlarının tespit edilmesi aşamaları gerçekleştirilmiştir. Örneklerin analizi ile elde edilen veriler tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), doğrusallık, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik gibi metot performans kriterlerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Bulgular ve Sonuç: Araştırmada, aflatoksin B₁ için belirlenen tespit limiti, ölçüm limiti ve geri kazanım oranı sırasıyla 0.01 ppb, 0.02 ppb ve % 91 olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik çalışmasında ise 1 ve 2 ppb konsantrasyonlar için varyasyon katsayıları % 3.15 ve % 4.56 olarak hesaplanmıştır. Rumen sıvısında aflatoksinlerin tayini için belirlenen bu performans kriterleri ile doğru ve güvenilir bir şekilde analiz yapılabilir.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin, HPLC, İmmuno-affinite kolon, Rumen sıvısı

The Combination of Immuno-Affinity Column (IAC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Detection of Aflatoxins in Rumen Fluid

ABSTRACT

Background/Aim: This study was performed for internal validation of immuno-affinity column and HPLC methods for determining aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂) in ruminal fluid.

Material and Method: Aflatoxin free rumen fluid was sampled from a lactating cow, filtered and kept at -35°C for 24 h. Then it was brought to room temperature for further analysis. The certified aflatoxin mix standard was added to rumen fluid in varying concentrations. The performed following steps were; methanol-water (70:0/v:v) extraction, separating aflatoxins from the extract by immuno-affinity column, taking methanol and aflatoxins from immuno-affinity column and determining the amount of aflatoxins by HPLC having fluorescence detector. The data was used for limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, recovery and repeatability of the method's performance criteria.

Results and Conclusion: The detection and measurement limits and recovery rate for aflatoxin B₁ were 0.01 ppb, 0.02 ppb and 91%, respectively. The calculated variation coefficients in repeatability study were 3.15 and 4.56% for 1 and 2 ppb concentrations. It can be done accurate and reliable analysis in ruminal fluid that specified performance criteria for the determination of aflatoxins.

Key words: Aflatoxin, HPLC, Immuno-affinity column, Rumen fluid.

Correspondence to: Mehmet Ali Bal, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Avşar Yerleşkesi, Kahramanmaraş. E.mail: malibal40@gmail.com

Giriş

Aflatoksinler, *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nominus* küfleri tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünleri olup, oluşumu ve toksisitesi göz önüne alındığında aflatoksin B₁ (AFB₁) en önemlisidir ve bunu sırasıyla aflatoksin G₁ (AFG₁), aflatoksin B₂ (AFB₂) ve aflatoksin G₂ (AFG₂) izlemektedir (Van Genderen, 1997; Doyle ve ark., 1997). Gıdalarda ve hayvan yemlerinde sıklıkla rastlanan aflatoksinlerin yüksek dozları akut toksik etki göstererek, önemli sağlık sorunlarına ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Düşük dozları ise güçlü bir hepatokarsinogen, mutajen ve teratojen olup ayrıca bağışıklık sistemini de baskılamaktadır. Memeli hayvanlar, kuşlar ve balıkların birçok türünün aflatoksinlerin etkilerine karşı hassas olduğu bildirilmiştir (Stark, 2001). Memelilerde akut aflatoksikozun belirtileri; iştahsızlık, uyuşukluk, dengesizlik, düzensiz ve mat tüy ile yağlanarak büyümüş karaciğer olarak, kronik belirtilerin ise; yem tüketimi ve süt üretiminde azalma, sarılık, iştah kaybı ve büyüme oranında gerileme olarak rapor edilmiştir (Nibbelink, 1986).

Aflatoksinlerin rumende biyodegradasyonu hakkında çelişkili sonuçlar rapor edilmektedir. Bazı araştırmacılar AFB₁'in rumen sıvısında inkübasyona uğradığında konsantrasyonunda önemli azalmalar olduğunu bildirirken (Engel ve Hagemester, 1978), bazı araştırmacılar ise bunu tespit edememişlerdir (Kiessling ve ark., 1984). Çünkü rumen sıvısına inoküle edilen ve *in vitro* ortamda inkübasyona bırakılan AFB₁ molekülleri rumende arandığında AFB₁'in aflatoksikol gibi metabolitleri tespit edilmiştir (Auerbach ve ark. 1998). Rumendeki kısmi bozulma nedeniyle mikotoksinler ruminantlarda diğer türlere göre daha az toksiktir ancak, rumende mikotoksinlerin degradasyonu tamamen olmamakta ve bazı parçalanma ürünleri toksik madde olarak kalabilmektedir (Kiessling ve ark., 1984). Aflatoksinlerin sadece % 10'undan az bir bölümünün rumende yıkılabildiği ve bu nedenle rumen mikroorganizmaları üzerinde de olumsuz etkilerin olduğu bildirilmiştir (Yiannikouris ve Jouany, 2002).

Mikotoksinlerle ilgili olarak ruminantların sindirim sistemi ve hayvanların besin kaynakları üzerine etkileri hakkında bilgi çok azdır. AFB₁'in *in vivo* veya *in vitro* ortamda uçucu yağ asitleri ve selüloz sindirimi üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Edrington ve ark., 1994; Auerbach ve ark., 1998). Ancak önemli ölçüde mikotoksin varlığı ve çeşitli toksinler arasındaki sinerjistik etki ruminant sindirim sistemine olumsuz etki yapmaktadır. Ayrıca rumen mikroflorasının ve mikrofaunasının kompozisyonu rasyona bağlı olduğundan, beslenme şartları detoksifikasyon sürecinde yer alan mikroorganizmaların biyolojik aktivasyonunu etkilemektedir (Jouany, 2001).

Mikotoksinlerin ruminal degradasyon oranı tüketilen yemin mikotoksin yüküne, yemin bileşimine, hayvanın sağlığına, rumendeki mikroflora ve protozoa aktivitesine göre değişim göstermektedir. Tüketilen yemin rumenden geçiş hızı ve rumendeki düşük protozoa popülasyonu rumende mikotoksinlerin degradasyonunu azaltmaktadır. Mikotoksinlerin ruminal degradasyonu bakteriyel aktiviteden daha çok protozoal aktiviteye bağlıdır (Kiessling ve ark., 1984). Monogastrik türlerle karşılaştırıldığında ruminant hayvanların mikotoksin bulaşmış yemlere karşı daha dayanıklı olduğu düşünülmektedir (Gremmels, 2008). Bu varsayıma dayanarak rumen florası mikotoksinleri parçalayarak veya inaktive ederek hayvanları korur. Zehirlenmelere yol açan bazı mikotoksinler rumende parçalanmaya karşı dayanıklıdır. Ayrıca farklı yemlerden gelen mikotoksinlerin çeşitliliğinin artması sonucu süt sığırlarına olan baskı artar. Birkaç farklı mikotoksinin aynı

anda baskısı beklenmeyen sağlık sorunlarına yol açabilir. Geçiş dönemlerinde önceden var olan negatif enerji dengesi nedeniyle sığırların küf, küf sporları ve mikotoksinlerle kontamine olmuş yemlerin oluşturduğu baskıya karşı daha duyarlı oldukları düşünülmektedir (Gremmels, 2008). Hayvanların mikotoksin bulaşmış yemleri veya tahılları reddetmesi hayvan beslenmesinde tekrarlanan bir sorun haline gelmiştir. İştah kaybı ile ilişkilendirildiğinde monogastrik hayvanlar ruminantlara göre daha hassastır. Benzer şekilde süttten yeni kesilmiş ruminantlar yetişkin ruminantlara göre daha hassastır (Bersjo ve ark., 1992; Bersjo ve ark., 1993; Rotter ve ark., 1995).

Rumende aflatoksinlerin degradasyonu konusunda daha net bilgilere ulaşabilmek için rumen sıvısında aflatoksin analizi konusunda valide edilmiş yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışma rumen sıvısında aflatoksin (B₁, B₂, G₁, G₂) tayini için immuno-affinite kolon ve HPLC kullanılan bir yöntem geliştirmek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Rumen Sıvısı: Laktasyondaki bir inekten rumen sondası yolu ile alınan rumen sıvısı hızlı bir şekilde termos ile laboratuara getirilerek süzölmüş, ardından -35°C'de derin dondurucuda 24 saat bekletilmiş ve oda sıcaklığına getirildikten sonra kullanılmıştır.

Aflatoksin MIX Standardı (AFMIX): HPLC'de kalibrasyon için sertifikalı, metanol içinde çözönmüş formda bulunan ve toplam konsantrasyonu 2.6 µg/ml olan Aflatoksin Mix (1µg/ml AFB₁, 0.3 µg/ml AFB₂, 1 µg/ml AFG₁ ve 0.3 µg/ml AFG₂) standardı (Aflatoxin Mix Kit-M, Supelco, USA) kullanılmıştır.

İmmuno-affinite Kolonlar (IAK): Aflatoksinlere karşı spesifik antikorlar içeren immuno-affinite kolonlar (AflaTest-P, Vicam Science Technology LP, USA) kullanılmıştır.

Kimyasallar ve sarf malzemeler: HPLC saflıkta asetonitril (75-05-8) (Merck), metanol (67-56-1) (Merck), sodyum klorür (7647-14-5) (Merck), potasyum bromür (7758-02-3) (Merck), nitrik asit (7697-37-2) (Merck), ultra saf su, fosfat tamponu (PBS) hazır tabletleri (pH 7.0), kaba filtre kağıdı, Whatman No:4 filtre kağıdı, mikrofiber cam filtre ve gerekli cam malzemeler kullanılmıştır.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı: Dionex P680 HPLC Pompa, Dionex ASI-100 Otomatik **Örnekleyici**, Dionex RF 2000 Floresan Dedektör, Dionex TCC-100 Isıtıcı Kolon Fırını, ODS-2 (C18 -250 mm-5µm- 4,6 mm) kolonu, bilgisayar ve yazılım donanımı mevcuttur. Aflatoksin analizi; Dedektör dalga boyu: Excitation wavelength: 360 nm, Emission wavelength: 440 nm, Pompa akış hızı: 1ml/dk, Enjeksiyon hacmi: 100 µl, Kolon sıcaklığı: 25°C, Mobil faz: Saf su/Asetonitril/ Metanol (55/20/30; v/v/v) HPLC şartlarında, 15 dakika sürede yapılmıştır.

HPLC Mobil Fazı: Saf su/Asetonitril/Metanol (55/20/30; v/v/v) oranlarında karışım hazırlanmıştır. Çözeltilinin bir litresine 120 mg Potasyum Bromür ve 350 µl 4 Molar Nitrik Asit ilave edilmiş ve kullanmadan önce 0.45 mikron gözenekli filtre kâğıdından süzülerek hazırlanmıştır (AOAC, 2000).

HPLC'de kalibrasyon tablosunun oluşturulması: HPLC'de kalibrasyon tablosu AOAC Official Method 991.31 (AOAC, 2005)'e göre oluşturulmuştur. AFB₁ ve AFG₁'in 1000 ng/ml, AFB₂ ve AFG₂'nin 300 ng/ml konsantrasyonda olduğu sertifikalı hazır mix standart kullanılmıştır. 1 ml aflatoksin standardı 15 ml'lik amber vial e aktarılmış ve üzerine 9 ml metanol

Tablo 1. Kalibrasyon standardının hazırlanması

Table 1. Preparation of the calibration standard

1. vial	80 µl ikinci aşama standart + 3920 µl metanol + 6 ml saf su
2. vial	240 µl ikinci aşama standart + 3760 µl metanol + 6 ml saf su
3. vial	400 µl ikinci aşama standart + 3600 µl metanol + 6 ml saf su
4. vial	560 µl ikinci aşama standart + 3440 µl metanol + 6 ml saf su
5. vial	720 µl ikinci aşama standart + 3280 µl metanol + 6 ml saf su
6. vial	880 µl ikinci aşama standart + 3120 µl metanol + 6 ml saf su
7. vial	1000 µl ikinci aşama standart + 3000 µl metanol + 6 ml saf su

Tablo 2. Kalibrasyon standardı konsantrasyonları (ppb) ve HPLC kalibrasyon tablosu değerleri

Table 2. The concentrations of calibration standard (ppb) and the values on calibration table of HPLC

Vial No	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
1	0.8	0.24	0.8	0.24
2	2.4	0.72	2.4	0.72
3	4.0	1.20	4.0	1.20
4	5.6	1.68	5.6	1.68
5	7.2	2.16	7.2	2.16
6	8.8	2.64	8.8	2.64
7	10.0	3.00	10.0	3.00

ilave edilerek II. aşama standart solüsyonu hazırlanmıştır. Kalibrasyon standardını hazırlamak için II. aşama standarttan aşağıda belirtilen hacimlerde 7 ayrı 15 ml'lik vidalı amber viale aktarılmıştır. Viallerdeki II. aşama standartlarının her biri üzerine uygun hacimde metanol ilave edilerek 4 ml'e tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. Sonrasında her bir vialde 6 ml saf su ilave edilmiş ve yine iyice karıştırılmıştır (Tablo 1).

Her vial 2 ml'lik viallere yeteri miktarda aktarılacak 100 µl hacimde HPLC'ye enjekte edilmiştir. HPLC'de kalibrasyon tablosu ppb olarak oluşturulduğu için Tablo 2'deki değerler

HPLC'ye girilmiştir.

Tablo 2'deki değerlerle oluşturulan kalibrasyon tablosu ile 7 noktalı kalibrasyon eğrisi çizilmiş, korelasyon katsayısının en az 0.999 olması sağlanmıştır.

Rumen Sıvısında Aflatoksin (B₁, B₂, G₁, G₂) Analizleri: Rumen sıvısında aflatoksin tayini için kullanılan yöntem AOAC Official Method 999.07 (AOAC 2000) analiz metodundan modifiye edilmiştir. HPLC-IAK analiz yönteminin prensibi; örneğe uygulanan ön işlemlerden sonra (örnekleme, örneğin

Tablo 3. Rumen sıvısındaki aflatoksinlerin (B₁, B₂, G₁, G₂) Tespit (LOD) ve Ölçüm (LOQ) limitleriTable 3. The limits of detection (LOD) and the limits of quantification LOQ) in the ruminal fluid of aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂)

Paralel no	AFB ₁ (0.04 ppb)	AFB ₂ (0.015 ppb)	AFG ₁ (0.04 ppb)	AFG ₂ (0.03 ppb)
1	0.032	0.011	0.038	0.017
2	0.032	0.010	0.025	0.017
3	0.027	0.009	0.029	0.016
4	0.030	0.013	0.029	0.021
5	0.026	0.012	0.025	0.012
6	0.027	0.013	0.025	0.014
7	0.028	0.012	0.033	0.012
8	0.030	0.010	0.027	0.012
9	0.030	0.010	0.026	0.021
Ort.	0.029	0.011	0.029	0.016
S	0.002	0.001	0.004	0.004
LOD	0.01	0.004	0.01	0.01
LOQ	0.02	0.01	0.04	0.04

Tablo 4. Rumen sıvısından Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂'nin geri kazanım oranları (%)Table 4. The recovery of aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂) from ruminal fluid (%)

AFB ₁		AFB ₂		AFG ₁		AFG ₂	
1 ppb	2 ppb	0.3 ppb	0.6 ppb	1 ppb	2 ppb	0.3 ppb	0.6 ppb
94	88	89	85	88	85	52	51
Ort. 91		Ort. 87		Ort. 87		Ort. 52	

Tablo 5. Rumen sıvısında Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ için tekrarlanabilirlik sonuçları
Table 5. The repeatability of aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂) from ruminal fluid (%)

Paralel no	AFB ₁		AFB ₂		AFG ₁		AFG ₂	
	(1 ppb)	(2 ppb)	(0.3 ppb)	(0.6 ppb)	(1 ppb)	(2 ppb)	(0.3 ppb)	(0.6 ppb)
1	0.95	1.81	0.26	0.52	0.88	1.76	0.15	0.29
2	0.97	1.83	0.28	0.53	0.89	1.76	0.15	0.29
3	0.96	1.86	0.27	0.53	0.85	1.76	0.16	0.29
4	0.96	1.87	0.27	0.54	0.92	1.76	0.15	0.32
5	0.94	1.75	0.27	0.50	0.89	1.67	0.15	0.32
6	0.95	1.66	0.27	0.49	0.90	1.59	0.16	0.34
7	0.90	1.72	0.25	0.49	0.86	1.66	0.16	0.30
8	0.89	1.68	0.26	0.49	0.87	1.64	0.17	0.30
9	0.90	1.69	0.26	0.48	0.87	1.64	0.16	0.30
Ortalama	0.94	1.76	0.27	0.51	0.88	1.69	0.16	0.31
S	0.030	0.080	0.008	0.022	0.022	0.067	0.007	0.016
%CV	3.15	4.56	2.95	4.35	2.46	3.95	4.64	5.30

temizlenmesi, immuno-affinite kolon (IAK) (VICAM Afla Test-P, USA) safhası, HPLC'ye enjeksiyon) kantitatif analiz ilkesine dayanmaktadır (AOAC, 2000). HPLC'de kolon sonrası türevlendirme Kobra Cell kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Derin dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığına getirilen rumen sıvısından 20 ml alınmış ve üzerine 80 ml metanol-su karışımı (7:3 v/v) ve 5 g sodyum klorür ilave edilmiştir. Karıştırıcıda (Waring Commercial Blender) 2 dakika yüksek hızda karıştırıldıktan sonra kaba filtre kâğıdından ve Whatman No:4 filtre kâğıdından süzülerek iri partiküllerinden temizlenmiştir. Süzüntüden 20 ml alınıp üzerine 20 ml PBS tampon çözeltisi eklenerek el ile karışmaları sağlanmıştır. IAK kolon 20 ml'lik enjektöre sabitlenmiş ve enjektöre pipetle 20 ml rumen sıvısı örneği mikrofiber cam filtreden geçirilerek alınmıştır. Kolondan saniyede 1 damla akacak şekilde geçirilmiştir. Daha sonra 2 kez 10 ml saf su geçirilerek yıkama yapılmıştır. Akış hızı 5 ml/d ayarlanmıştır. Kolondan birkaç kez hava geçirilip su tamamen çıkarılmıştır. 1 ml metanol eklenerek kolondan yavaşça geçirilmiştir. Tüm metanol 15 ml'lik koyu renkli vialde toplanmıştır. 1 ml saf su ile işlem tekrarlanmış ve su aynı vialde alınmıştır. Toplam hacim 2 ml olmuştur. Vortekste iyice karıştırılarak 2 ml'lik vialde HPLC'ye 100 µl enjeksiyon yapılmıştır.

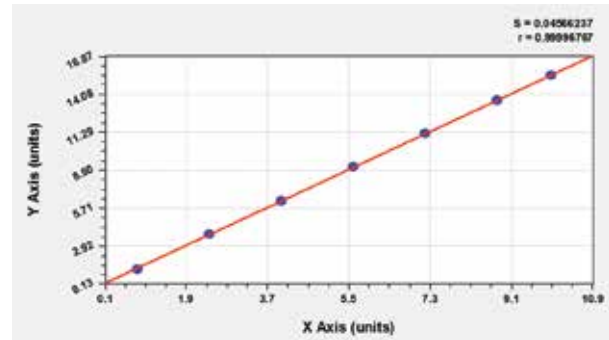
Validasyon Çalışması: Çalışmadakullanılan yöntem tespiti limiti (limit of detection-LOD), ölçüm limiti (limit of quantification-LOQ), doğrusallığı (linearity), geri kazanım (recovery) yüzdesi ve tekrarlanabilirliği (repeatability) incelenmiştir (AOAC, 2005; Şenyuva ve Gilbert, 2006; SANCO/10684, 2009). LOD ve LOQ toplamda üç farklı düzeyde aflatoksin içeren örneklerle; doğrusallık 7 farklı düzeyde, % geri kazanım 2 farklı düzeyde çalışılarak belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik değerleri ise toplamda iki farklı düzeyde aflatoksin eklenmiş olan örneklerin 9 paralel çalışılmasıyla hesaplanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

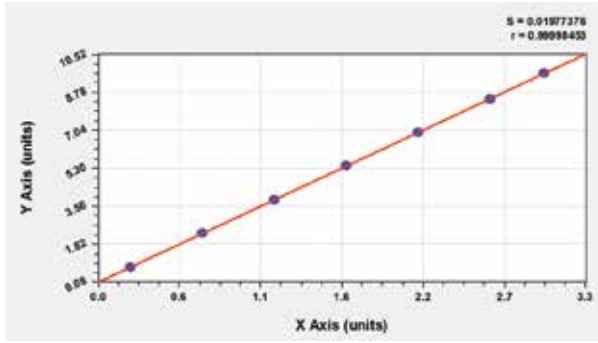
Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ): Tespit limitini hesaplamak için daha önceden hazırlanan aflatoksin yönünden temiz rumen sıvısı örneğine toplamda 0.104 ppb, 0.13 ppb ve 0.26 ppb aflatoksin standardı ilave edilerek 9 paralelli olarak çalışılmış ve HPLC'de enjeksiyon yapılmıştır. Bu çalışma sonucu elde edilen değerler Tablo 3.'de verilmiştir. Toplam aflatoksin içindeki Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ toksinlerinin oranı; 0.104 ppb konsantrasyondaki standartta Aflatoksin B₁ ve G₁ 0.04 ppb,

Aflatoksin B₂ ve G₂ 0.012 ppb, 0.13 ppb konsantrasyondaki standartta Aflatoksin B₁ ve G₁ 0.05 ppb, Aflatoksin B₂ ve G₂ 0.015 ppb, 0.26 ppb konsantrasyondaki standartta Aflatoksin B₁ ve G₁ 0.1 ppb, Aflatoksin B₂ ve G₂ 0.03 ppb oranlarında bulunmaktadır. Tespit limiti (LOD): 0 + 3S, Ölçüm limiti (LOQ): 0 + 10S (S: Standart sapma) formülüne göre hesaplanmış ve Aflatoksin B₁ için LOD değeri 0.01 ppb, LOQ değeri 0.02 ppb olarak bulunmuştur. Aflatoksin B₂ için LOD değeri 0.004 ppb, LOQ değeri 0.01 ppb olarak bulunmuştur. Aflatoksin G₁ için LOD değeri 0.01 ppb, LOQ değeri 0.04 ppb olarak bulunmuştur. Aflatoksin G₂ için ise LOD değeri 0.01 ppb, LOQ değeri 0.04 ppb olarak bulunmuştur.

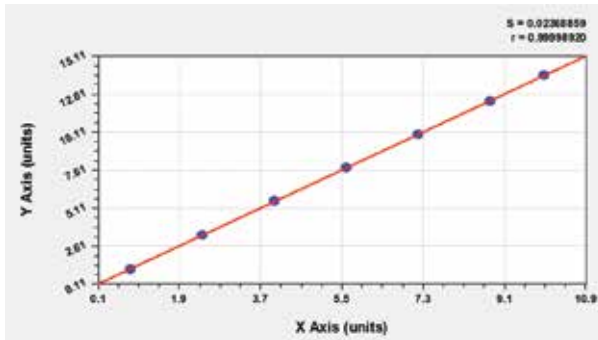
Doğrusallık (Linearity): Yedi farklı düzeyde ve üçer paralelli olarak yapılan enjeksiyonlardan elde edilen alanlar ile konsantrasyonlar arasındaki korelasyon katsayılarını gösteren grafikler Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4'te verilmiştir. Aflatoksin türlerinin hepsinde korelasyon katsayısı 0.999 ve üzerinde bulunmuştur.



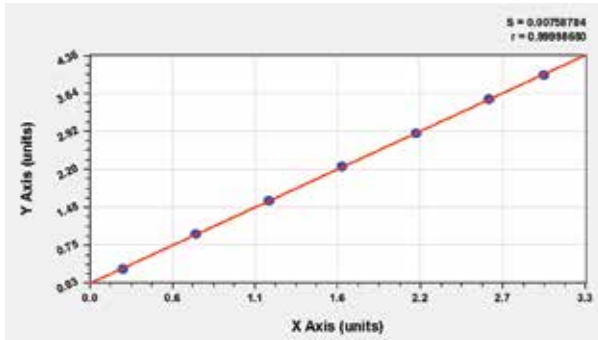
Şekil 1. Aflatoksin B₁'e ait konsantrasyon-alan korelasyon grafiği
Figure 1. Correlation graphic of concentration-area Aflatoxin B₁



Şekil 2. Aflatoksin B₂'ye ait konsantrasyon-alan korelasyon grafiği
Figure 2. Correlation graphic of concentration-area Aflatoxin B₂



Şekil 3. Aflatoksin G₁'e ait konsantrasyon-alan korelasyon grafiği
Figure 3. Correlation graphic of concentration-area Aflatoxin G₁



Şekil 4. Aflatoksin G₂'e ait konsantrasyon-alan korelasyon grafiği
Figure 4. Correlation graphic of concentration-area Aflatoxin G₂

Geri Kazanım (Recovery): Geri kazanım oranlarını tespit etmek için hazırlanan aflatoksin bakımından temiz rumen sıvısı örneğine 2.6 ppb ve 5.2 ppb toplam konsantrasyonda aflatoksin standardı enjekte edilerek her konsantrasyon 18 kez çalışma yapılmış ve % geri kazanım oranları hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmasından elde edilen oranlar Tablo 4.'de gösterilmiştir.

Tekrarlanabilirlik (Repeatability): Rumen sıvısı numunesine 2.6 ppb ve 5.2 ppb'lik toplam aflatoksin standardı enjekte edilerek tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır. Dokuz paralelli olarak çalışılan örneklerin ortalamaları, standart sapmaları ve varyasyon katsayıları (% CV) Tablo 5'de verilmiştir.

Sonuç: Yapılan bu çalışma ile rumen sıvısında aflatoksin analizleri için söz konusu yöntemin performans kriterleri bakımından güvenilir olduğu ve konu ile ilgili olarak yapılacak çalışmalarda kullanılması için önerilebilecek bir yöntem olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar yöntemin laboratuvarlar arası bir çalışma ile yeniden yapılabilirliğini (reproducibility) ve validasyonun tamamlanabileceğini de göstermiştir.

Kaynaklar

- AOAC (2000). Official Method 999.07. Aflatoxin B₁ and Total Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste, and Paprika Powder. Immunoaffinity Column Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization First Action 1999. P.49.2.29.
- AOAC (2005). Official Method 991.31. Aflatoxin in corn, raw peanuts and peanut butter: immunoaffinity column (aflatest) method. AOAC International, p. 49.2.18.
- Auerbach H, Maas RFM, Op Den Camp HJM, Pol A, Fink-Gremmels J (1998). Biodegradation of aflatoxin B₁ by bovine rumen microorganisms in vitro and its effects on rumen fermentation. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 149:573.
- Bersjo B, Matre T, Nafstad I (1992). Effect of diets with graded levels of deoxynivalenol on performance in growing pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 39:752-758.
- Bersjo B, Langseth W, Nafstad I, Hogset Jansen J, Larsen HJS (1993). The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. *Veterinary Research Communications*. 17:283-294.
- Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (1997). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC, ASM Press 768p.
- Edrington TS, Harvey RB, Kubena L (1994). Effects of aflatoxin in growing lambs fed ruminally degradable or escape protein sources. *Journal of Animal Science* 72:1274-1281.
- Engel VG, Hagemester H (1978). Untersuchungen über den verbleib von aflatoxin B₁ im verdauungstrakt von kühen. *Milchwissenschaft*. 33:21-23.
- Gremmels JF (2008). The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*. 176: 84-92.
- Jouany JP (2001). The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle. *Science and Technology in the Feed Industry Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium*. 191-223
- Kiessling KH, Pettersson H, Sandholm K, Olsen M (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three tricothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 47:1070-1073.
- Nibbelink, SK (1986). Aflatoxicosis in food animals: A clinical review. *Iowa State Univ. Vet.* 48:28-31.
- Rotter BA, Thompson BK, Lessard M (1995). Effects of deoxynivalenol-contaminated diet on performance and blood parameters in growing swine. *Canadian Journal of Animal Science*. 75:297-302.
- Sanco/10684 (2009). Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- Stark AA (2001). Mechanisms of action of aflatoxin B₁ at the biochemical and molecular levels. (Edited by Charles L. Wilson and Samir Droby.), *Microbial Food Contamination*. CRC Press. ISBN 0-8493-2229-4, p:81-94.
- Şenyuva HZ, Gilbert J (2006). Metod geliştirme ve validasyonu için basit kullanım klavuzu. Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Basımevi, Ankara. ISBN 975-00884-0-9.
- Van Genderen H (1997). Adverse effects of naturally occurring nonnutritive substances (Edited by John De Vries). *Food Safety and Toxicity*, CRC Press, ISBN 0-8493-9488-0, p:153-168.
- Yiannikouris A, Jouany JP (2002). Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. *Animal Research* 51:81-99