

YEM ve YEM MADDELERİNDE AFLATOKSİN, OKRATOKSİN A ve
ZEARALENON KALINTILARININ KROMATOĞRAFİK
YÖNTEM İLE ARAŞTIRILMASI

*The investigation of aflatoxin, ochratoxin A and zearalenone
residues in feeds and feedstuffs by
chromatographic method*

H. Ahmet ACET¹
Ömer DEMET²
Büyüamin TRAŞ³

Summary : This investigation was conducted to determine the levels of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in feeds and feedstuffs obtained from various regions of Turkey.

Samples were analysed by thin layer chromatography. In this method, mycotoxins were extracted with chloroform from materials and then transferred through the sep-pak cartridge column to elute the mycotoxins residues.

Mycotoxins were found in the nine samples of a hundred materials analysed. Aflatoxin B₁ in two samples, ochratoxin A in five samples and zearalenone in three samples were determined. The average concentrations of aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone were 3.75., 12 and 6,6 microgram/kg respectively. The detectable limits were 1 microgram/kg for aflatoxin, 2 microgram/kg for ochratoxin A and 4 microgram/kg for zearalenone.

According to results, the levels mycotoxins determined in the samples will not cause an extremely cases, however would make residue problems with consumption of these feeds by the animals for a long periods.

Özet : Bu çalışmada, ülkemizin farklı bölgelerinden toplanan 100 adet yem ve yem maddelerinden oluşan numunelerde ince tabaka kro-

-
- (1) Doç. Dr., S. Ü. Vet. Fak. Farm. ve Toks. Anabilim Dalı, Konya
 - (2) Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Vet. Fak. Farm. ve Toks. Anabilim Dalı, Konya
 - (3) Arş. Gör., S. Ü. Vet. Fak. Farm. ve Toks. Anabilim Dalı, Konya

matografi yöntemiyle aflatoksinler, okratoksin A ve zearalenon yönünden analizleri yapılarak, mikotoksin yönünden değerlendirmeler yapıldı.

Çalışmada yem ve yem maddelerinde mikotoksin analizi için ince tabaka kromatografi yöntemi kullanıldı. Mikotoksinler, numunelerden kloroform ile ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt sep-pak kolonundan geçirilerek mikotoksinlerin ayrımları yapıldı.

Analiz edilen 100 numunenin 9'unda mikotoksin belirlendi. Numunelerin 2'sinde aflatoksin B₁, 5'inde okratoksin A ve 3'ünde de zearalenon bulundu. Mikotoksin ortalama yoğunlukları aflatoksin B₁ için 3.75, okratoksin A 12 ve zearalenon için ise 6.6 mikrogram/kg olarak tespit edildi. Yöntemin duyarlılığı aflatoksinler için 1, okratoksin A 2 ve zearalenon için ise 4 mikrogram/kg olarak belirlendi.

Bulguların değerlendirilmesinde; numunelerde yarı nicel olarak belirlenen miktarların akut bir toksikasyona yol açmayacağı, ancak böyle yemler hayvanlar tarafından uzun süre alınmasıyla subklinik etkilerin görülebileceği ve hayvansal ürünlerde mikotoksin kalıntılarının oluşabileceği kanısına varıldı.

Giriş

Mikotoksinler, çeşitli küf mantarları tarafından oluşturulan insan ve hayvanlarda fizyolojik ve patolojik değişikliklere yol açan toksik metabolitlerdir. Küf mantarları az sayıda da olsa yem ve yem maddelerinde doğal olarak bulunabilmektedir. Bunlar toksin üretmesi için uygun ortam oluştuğunda (nem oranının artması gibi) çoğalarak değişik oranlarda mikotoksin salgırlar. Böylece bir yandan yemin kalitesi bozulurken, diğer taraftan da insan ve hayvan sağlığı olumsuz yönde etkilenir (9, 10, 11, 15).

Mikotoksinler, yem ve yem maddelerinin üretiminden tüketimine kadar geçen süreç içerisinde her devrede oluşabilir. Genellikle yemlerin hazırlanması aşamasında yem maddeleri belli düzeyde bir ısıya maruz bırakıldığından, küf mantarlarına tüketime sunulmak üzere hazırlanmış yemlerde daha az rastlanır. Bununla beraber, yemlerin hazırlanması aşamasında ve hazırlanmış yemlerde herhangi bir nedenle nem oranı %11'in üzerine çıkarsa mantarların üretmesi için uygun bir ortam teşekkül edeceğinden bu gibi yemlerde de mikotoksinler oluşabilmektedir (5, 8). Mantarların üremeleri ve toksin oluşturmaları birçok yem maddelerinin yetiştirilmesi aşamasında ve depolama süresi içerisinde meydana gelir (3, 13).

Yem ve yem maddelerinde en sık görülen ve hayvanlarda toksikas-

yonu açan mikotoksinler; aflatoksinler, okratoksin A, zearalenon (F-2 toksin) ve trikotesenler (T-2 toksin)'dir (6, 11, 13).

Aflatoksin bir karaciğer toksindir. Aynı zamanda karsinojen, mutagen ve teratojen etkilidir (5). Yemlerle birlikte alınan 100 mikrogram/kg aflatoksin B₁ sığır ve domuzlarda toksikasyona yol açmaktadır (8). Süt ineklerine yemleri ile birlikte 20 mikrogram/kg aflatoksin B₁ verildiğinde, sütte 0.5 mikrogram/kg aflatoksin B₁ tespit edilmektedir (9). Bu düzey insan sağlığı için zararlı olarak kabul edildiğinden FDA, süt hayvanlarına verilecek yemlerde aflatoksin B₁ düzeyinin 20 mikrogram/kg'ı geçmemesi gerektiğini bildirmektedir (3). Genellikle besinlerde 20 mikrogram/kg'a kadar bulunan aflatoksin kalıntıları hayvanlarda zararsız kabul edilir (9). Piliçler aflatoksinle dirençlidir. Yemlerle alınan 500 mikrogram/kg aflatoksin B₁ gençlerde büyümede gerilemeye ve tavuklarda da yumurta veriminde düşüşe sebep olmaktadır. Hindiler daha duyarlıdır. Bu hayvanlarda yemlerle alınan 100 mikrogram/kg aflatoksin B₁ düzeyinin büyümede önemli derecede gerilemeye neden olduğu belirtilmektedir (8).

Okratoksin A, aspergillus ve penicilium türü küf mantarları tarafından üretilir. Domuz ve kanatlılarda proksimal böbrek tubulus bozukluklarına yol açar. Teratojen etkilidir (4, 12, 13). Yemlerle alınan 200 mikrogram/kg okratoksin A, domuzlarda 3 ay içerisinde sözkonusu böbrek lezyonlarına sebep olmaktadır (8).

Zearalenon, fusarium türü küf mantarları tarafından hazırlanan östrojenik etkili bir mikotoksindir. Özellikle domuzlar duyarlıdır. Yemlerde bulunan 0.01 mg/kg zearalenon düzeyi domuzlarda hiperöstrojenizmeye sebep olur (3, 14, 17). Piliçler zearalenona karşı oldukça dayanıklı hayvanlardır (5). Yemlerle alınan 12 mg/kg zearalenon sığırlarda yavru atmaya yol açmaktadır (14). Ayrıca östrojenik etkili olması nedeniyle özellikle puberte çağındaki çocuklarda, besinlerle alınan zearalenonun hormonal değişikliklere sebep olabileceği bildirilmektedir (5, 10, 14).

Trikotesenler, fusarium ve trichoderma gibi farklı küf mantarları tarafından üretilen ve hayvanlar için oldukça toksik etkili mikotoksinlerdir. Aflatoksinlerle sinerjik etki gösterirler (3, 5, 10).

Besinler ve biyolojik ortamda bulunan mikotoksinlerin ayrı ayrı ve birlikte aranmasını sağlayan çeşitli analiz metodları geliştirilmiştir. Kromatografik esasa dayalı bu yöntemler pikogram düzeylerine kadar analiz imkanı vermektedir (2, 13, 16, 17).

Bu çalışmada, çeşitli bölgelerden alınan yem ve yem maddelerinde ince tabaka kromatografi yöntemiyle mikotoksin arandı. Çalışmanın ama-

cı, alınan yem örneklerinde mikotoksin kalıntılarını araştırmak ve mikotoksinler yönünden bir değerlendirme yapmaktır.

Materyal ve Metot

Materyal : Analiz materyalleri olarak kullanılan yem ve yem maddeleri (Ay çiçeği küspesi, soya küspesi, pamuk tohumu küspesi, mısır, balık unu, et kemik unu, buğday, kepek, arpa, süt yemi, kuzu besisi yemi) Adana, Bursa ve Konya yörelerinden sağlandı.

a) Alet ve Malzemeler :

- İnce tabaka kromatografi aygıtı ve ekleri
- UV lambası (Desaga, 366 nm ve 254 nm dalga boylarında)
- Sep-pak slika kartij (Water Ass. Inc. Milford)
- Rotatif evaporatör (Heidolph)
- Cam malzemeler.

b) Kimyasal maddeler :

- Çözücüler : Kloroform, benzen, asetonitril, aseton, toluen, asetik asit, metanol (Merk).
- Slikajel (60 G (Merk, İTK için Art 7731)
- Sülfirik asit ve trifloraasetik asit (Merk)
- Mikotoksin standartları : (Standartlar Sigma'dan sağlandı). Aflatoksinler, (5 µg/ml B₁; 5 µg/ml G₁; 1,5 µg/ml B₂; 1,5 µg/ml G₂): benzen-asetonitril (98 + 2) karışımında hazırlandı.
- Okratoksin A (10 µg/ml) : benzen-asetonitril (98 + 2) karışımında hazırlandı.
- Zearalenon, (10 µg/ml ve 100 µg/ml) : metanolda hazırlandı.

c) Metot

Ekstraksiyon işlemi : Değirmende öğütülmüş 50 gr yem numunesi tartılarak 500 ml'lik bir erlene kondu. Üzerine 25 ml distile su ve 250 ml kloroform ilave edildi. Ağzı kapatılarak 30 dk süreyle karıştırıldıktan sonra 10 gr selit 545 konmuş süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen ekstraktan 50 ml alınarak evaporatörde 55-60 °C'de uçuruldu.

Temizleme aşaması : Kalıntı 2 x 0.5 ml toluenle alınarak sep-pak temizleme kolonuna aktarıldı. İlk önce, zearalenon 10 ml toluen-aseton (9 + 5) karışımı ile elüe edildi. Kolon 6 ml etil eter-hekzan (3 + 1) çözücü karışımı ile yıkandıktan sonra 10 ml kloroform-metanol (97 + 3) ile aflatoksinler, 10 ml toluen-asetik asit (9 + 1) çözücüsü ile de okratoksin A elüe edildi. Elde edilen zearalenon, aflatoksin ve okratoksin A ekstraktları kuruyuncaya kadar uçuruldu. Kalıntılar 0.5 ml kloroform ile küçük tüplere alındı.

İnce tabaka plakalarının hazırlanması : Yayıcı tabakaya yerleştirip iyice temizlenen (20 x 20) cam plakalar 0.30 mm kalınlığında, 30 gr slika-jel 60 G ve 65 ml distile su ile hazırlanmış jelle kaplandı. Oda ısısında 20 dk bekletildikten sonra etüvde 110 °C de bir saat süreyle aktive edildi. Aktive edilen plakalar desikatöre alınarak saklandı.

Plakaya lekelerin uygulanması :

Aflatoksin : Elde edilen aflatoksin eluatı kuruyuncaya kadar uçuruldu .250 mikrolitre benzen-asetonitril (98 + 2) karışımında çözdürüldü. 2, 5, 10 mikrolitrelik nümune lekeleri ve aynı plakaya olmak üzere 2 ve 5 mikrolitrelik standart lekeleri uygulandı. Plaka, kloroform-aseton (90 + 10) çözücü sisteminde devolope edildi. Tanktan çıkarılan plaka havada kurutulduktan sonra 365 nm de UV ışığı altında gözlemlendi. Aflatoksin B₁ ve B₂ mavi aflatoksin G₁ ve G₂ yeşil renk fluoeresans vermektedir. Standartla karşılaştırmalı olarak nümunedeki bulunan aflatoksin lekeleri belirlendi. Sulfirik asit (% 25) ve trifluora asetik asit ile doğrulama testleri yapıldı.

Okratoksin A : Elde edilen okratoksin A eluatı kuruyuncaya değin uçuruldu, 1 ml benzen-asetonitril (98 + 2) de çözdürüldü. Plakaya 2, 5, 10 mikrolitrelik lekeler uygulandı. Yine aynı plakaya 2 ve 5 mikrolitrelik okratoksin A standartı uygulandı. Plaka kloroform-metanol (97 + 3) çözücü karışımında devolope edildi. Tanktan çıkarılan plaka havada kurutulduktan sonra ikinci kezde toluen-asetik asit (90 + 10) çözücü sisteminde devolope edildi, 365 nm UV ışığı altında açık maviden yeşile varan renkte okratoksin A lekeleri gözlemlendi.

Zearalenon : Elde edilen zearalenon eluatı kuruyuncaya değin uçuruldu, 40 mikrolitre kloroformda çözdürüldü. Nümune ekstraktlarından 2, 5 ve 10 mikrolitrelik ve aynı plakaya 2 ve 5 mikrolitrelik standart lekeleri uygunlandı. Plaka kloroform-metanol (97 + 3) çözücü sisteminde devolope edildi. Havada kurutulduktan sonra 254 nm UV ışığı altında açık mavi fluoeresans veren zearalenon lekeleri gözlemlendi.

Floresans şiddeti ve leke alanları bakımından farklı yoğunluklardaki mikotoksin standartları ile karşılaştırmalı olarak; nümune ekstraktlarına rit lekelerde bulunan mikotoksin yoğunlukları yarı nicel olarak hesaplandı.

Bulgular

Analizi yapılan 100 adet nümunenin 9'unda mikotoksin kalıntıları tespit edildi. Aflatoksin B₁ kepek ve ayçiçeği küspesi olmak üzere 2 adet nümune de bulundu. Nümunelerin hiçbirisinde aflatoksin B₂, G₁ ve G₂ belirlenemedi. Okratoksin A ayçiçeği küspesi (2 adet); mısır, kuzu besisi yemi, et-kemik unu olmak üzere 5 adet, zearalenon süt yemi, arpa ve ayçiçeği olmak üzere 3 adet nümune de tespit edildi (Tablo 1).

Analiz edilen nümunelerde mikotoksin bulunma oranı aflatoksin B₁, okratoksin A ve zearalenon için sırasıyla %2, %5 ve %3'dür. Nümunelerde mikotoksin ortalama yoğunlukları aflatoksin B₁ için 3.75 mikrogram/kg, okratoksin A 12 mikrogram/kg ve zearalenon için 6.6 mikrogram/kg olarak hesaplandı.

Yem örneklerine çeşitli düzeylerde aflatoksin, okratoksin A ve zearalenon miktarlarının katılması ile yapılan analizlerde yöntemin duyarlılık limitinin aflatoksinler için 1 mikrogram/kg, okratoksin A 2 mikrogram/kg ve zearalenon için ise 4 mikrogram/kg olduğu tespit edildi.

Tablo 1 : Nümunelerde belirlenen ortalama mikotoksin yoğunlukları (mikrogram/kg)

Yemin cinsi	aflatoksin B ₁	okratoksin A	zearalenon
Kepek	3.2	—	—
Ay çiçeği küspesi	—	16.3	—
Ay çiçeği küspesi	4.3	13.7	—
Ay çiçeği küspesi	—	—	6.8
Mısır	—	10.7	—
Arpa	—	—	6.6
Et kemik unu	—	8.3	—
Süt yemi	—	—	6.4
Kuzu besisi yemi	—	11	—

Tartışma ve Sonuç

Ülkemizde yem ve yem maddelerinde mikotoksinlerin ne düzeyde olduğunu belirlemeye yönelik çalışmalar azdır. Bu nedenle elde edilen sonuçları değişik yönlerden karşılaştırmalı olarak değerlendirebilmek imkanı sınırlı kalmaktadır. Çalışmada analizi gerçekleştirilen 100 örnekten ikisinde aflatoksin, (% 2) beşinde okratoksin A (% 5) ve üçünde de zearalenon (% 3) tespit edilmiştir. Oysa yine ülkemizde, süt yemlerinde aflatoksin kalıntılarının araştırılması amacıyla yapılan bir başka çalışmada (9) sadece aflatoksinler yönünden bu oran % 19.6 olarak belirlenmiştir. Ancak bu oran tek örnek yemle yapılan bir çalışmanın sonucunu göstermektedir. Yaptığımız bu çalışmada ise analiz edilen örnekler farklı yem nümunelerinden oluşmaktadır. Aflatoksin B₁ kepek ve ayçiçeği küspesinde, okratoksin A et kemik unu, mısır, kuzu besisi yemi ve ayçiçeği küspesi (2 adet), zearalenon arpa, ayçiçeği küspesi ve süt yeminde tespit edilmiştir. Alp ve ark (1) yağlı tohum küspelerinde aflatoksin kalıntılarının araştırılması üzerine yaptıkları çalışmada küspe örneklerinde total aflatoksin B₁ bulunma oranını % 12 olarak tespit etmişlerdir.

Yemlerle birlikte alınan 100 mikrogram/kg aflatoksin B₁'in sığır ve domuzlarda toksikasyona yol açtığı bildirilmektedir (8). FDA ise (3) süt hayvanlarına verilen yemlerde 20 mikrogram/kg'dan fazla aflatoksin B₁'in bulunmaması gerektiğini ifade etmektedir. Ayrıca yemlerle birlikte alınan 500 mikrogram/kg aflatoksin B₁'in piliçlerde büyümede gerilemeye ve tavuklarda yumurta veriminin düşmesine sebep olacağı; 100 mikrogram/kg düzeyin de ise hindilerde büyümede gerilemeye yol açacağı kaydedilmektedir (8). Genellikle besinlerde 20 mikrogram/kg'a kadar bulunan aflatoksin kalıntıları hayvanlarda zararsız olarak kabul edilmektedir (3, 9). Analiz edilen yem nümunelerinde belirlenen aflatoksin B₁ düzeylerinin hayvan sağlığı yönünden zararsız olduğu kolayca görülmektedir.

Yemlerde bulunan 200 mikrogram/kg okratoksin A'nın domuzlarda böbrek tutulmalarında nefropatiye yol açtığı bildirilmektedir (4, 5). Yaptığımız analizlerde 100 örnekten beşinde okratoksin A bulunmuştur. Yemlerde tespit edilen okratoksin A düzeylerinin toksik düzeyde olmadığı görülmektedir.

Süt sığırlarında 12 mg/kg zearalenonun yavru atmaya (14), 0.01 mg/kg düzeyinde zearalenon ise domuzlarda hiperöstrojenizme (3, 5) yol açtığı belirtilmektedir. Analiz edilen nümunelerde belirlenen zearalenon düzeylerinin hayvanlarda akut toksik etkilere yol açmayacağı anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, analiz edilen nümunelerde belirlenen aflatoksin B₁, okratoksin A ve zearalenon düzeylerinin hayvanlarda toksikasyona yol açmayacağı, ancak böyle yemlerin hayvanlar tarafından sürekli alınmasıyla, subklinik etkilerin görülebileceği ve hayvansal ürünlerde mikotoksin kalıntılarının oluşabileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Alp, F., Tuncer, N. ve Özsoy, A. (1988). Yağlı tohum küspelerinde Aflatoksin B₁ taraması. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 6, 3, 103-106.
2. Benett, G. A., Shotwell, O. L. and Kwolex, W. F. (1985). Liquid chromatographic determination of -zearalenol and zearalenon in corn. *J. Assoc. of Anal. Chem.* 68, 5, 958-964
3. Booth, N. H., Mc Donald, L. E. (1982). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Fifth Edition. The Iowa State University Press/Ames.
4. Brown, T. P., Manning, R. O., Fletcher, O. J. and Wyatt, R. D. (1985). The individual and combined effects of citrinin and ochratoxin A on renal ultrastructure in layer chicks. *Avian Disease*, 30, 1, 191-197.
5. Clarke, M. L. and Harvey, D. G., Humphreys, D. J. (1985). *Mycotoxins*. Veterinary Toxicology.
6. Cullison, A. E. and Lowrey, R. S. (1987). *Feed and Feeding*. Fourth Edition. Prentice-Hall, Inc. Newjersey.
7. Howell, M. V. and Taylor, P. V. (1981). Determination of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in mixed feeds, with detection by thin-layer chromatography or high performance liquid chromatography. *J. Assoc. off Anal. Chem.* 64, 6, 1356-1362.
8. Howell, M. V. (1982). Moulds and mycotoxins in animal feedstuffs. Haresign, W. (Editör) *Recent Advances in Animal Nutrition*. Mansell Bookbinders Ltd., Essex, 1-20.
9. Kaya, S. (1982). Süt yemi ve çiğ sütte aflatoksin kalıntılarının kromatografik yöntem ile araştırılması. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* 29, 3, 3-4, 443-457.
10. Kaya, S. (1989). Aflatoxinler ve diğer mikotoksinler. *Türk Veteriner Hekimliği Derg.* 2, 12-16.
11. Lindsay, D. G. (1981). Aflatoxin residues in animal products. Haresign, W. (Editör) *Recent Advances in Animal Nutrition*. The Camelot press, Southampton, 153-163.
12. Maning, R. O., Wyatt, R. D. (1984). Toxicity of *Aspergillus ochraceus* contaminated wheat and different chemical forms of ochratoxin A in broiler chicks. *Poultry Science*, 63, 3, 458-465.

13. Patterson, D. S. P. and Roberts, B. A. (1979). Mycotoxins in animal feed-stuffs : Sensitive thin layer chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, zearalenon and T-2 toxin. *J. Assoc. off Anal. Chem.* 62, 6, 1265-1267.
14. Sundlof, S. F. and Strickland, C. (1986). Zearalenone and zearanol potential residue problems in livestock. *Veterinary and Human Toxicology*, 28, 3, 242-250.
15. Şanlı, Y., Ceylan, S. ve Kaya, S. (1982). Karma yemlerde aflatoksin analizi. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* 29, 1-2, 50-70.
16. Takeda, Y., Isohata, E., Amona, R. and Uchiyama, M. (1979). Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains. *J. Assoc. off Anal. Chem.* 62, 3, 573-577.
17. Tanaka, T., Hasegawa, A. and Matsuki, Y. (1985). Rapid and sensitive determination of zearalenone in cereals by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. of Chromatography*, 328, 271-278.

