

Minikolon tekniği ile aflatoksin analizi

Ender YARSAN¹, Gökhan ERASLAN², Dinç EŞSİZ¹

¹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara; ² Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı, Kayseri; ³ Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı, Kars

Özet: Bu çalışmanın amacı, yem ve yem hammaddelerinde mikotoksin analizinde yarı-kalitatif bir yöntem olarak kullanılan minikolon tekniğinin laboratuvarımıza uyarlanması ve tekniğin duyarlılık limitlerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla 10'u hammadde ve 12'si de karına yemden oluşan toplam 22 yem örneği kullanıldı. Her yem örneğine sırasıyla 10 ppb, 20 ppb, 50 ppb ve 100 ppb düzeyinde olacak şekilde aflatoksin ilave edildi. Ekstraksiyon işleminden sonra yoğunlaştırılmış olan ekstrakt, önceden hazırlanmış kolonlara aktarıldı. Ekstrakt ve yıkama solüsyonu tamamen geçtikten sonra UV ışığında mavi ya da yeşil floresans oluşumu yönünden incelendi. Florisil tabakadaki mavi floresan pozitif olarak kabul edildi. Doğrulama testi olarak da aynı kolonlardan sülfürik asit (suda %25'lik) geçirildi ve oluşan mavi rengin aflatoksinler için karakteristik olan sarı renge dönüştüğü görüldü. Elde edilen sonuçlar minikolon tekniği ile yem ve yem hammaddelerindeki 10 ppb'lik aflatoksin yoğunluğunun ölçülebileceğini ve bu yöntemin rutin analizlerde, tarıma niteliğinde olacak şekilde saha şartlarında kullanılabileceğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin, analiz, minikolon

Aflatoxin analysis with minicolumn technique

Summary: The aim of this study is to adapt minicolumn technique, that is used as a qualitative method for mycotoxins analysis, to our laboratory, and also determine the detection limits of this method. For this aim 10 feedstuff and 12 mixed feed; totally 22 feed samples were used. Ten ppb, 20 ppb, 50 ppb and 100 ppb aflatoxins were added to each feed samples, respectively. After extraction of these samples, the extracts were condensed and transferred to the minicolumn. After the extract and the developing solution were passed through the column, results were evaluated under UV light to observe blue or green fluorescence. Blue fluorescence in florisil layer evaluated as positive. So as to confirm the test, sulfuric acid (24%, in water) was added to the columns and it was observed that the blue color was turned to yellow, which characterize for aflatoxins. Results show that the 10 ppb aflatoxin can be detected in the feedstuff and mixed feed with minicolumn technique and this method can be used in routine analysis and in practical.

Key words: Aflatoxin, analysis, minicolumn

Giriş

Mikotoksinler çeşitli mantar türlerince sentezlenen; alındıkları zaman insan ve hayvanlarda latent, akut ya da kronik karakterde zehirlenmelere neden olan kimyasal madde veya metabolitlerdir; başta *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri olmak üzere mikotoksin oluşturan mantarlar dünyanın her tarafında yaygın şekilde bulunurlar ve şartlar uygun olduğu taktirde, tarım ürünleri ile bunlardan hazırlanan besinleri hızla kontamine ederler (2,8,9,11). Mikotoksinlerin gerek besinler gerekse tüketici konumundaki insan ve hayvanlar üzerinde çok yönlü istenmeyen etkileri söz konusudur. Özellikle besinlerde ve tarımsal ürünlerde renk, şekil, koku değişiklikleri ile birlikte daha da önemlisi enzimatik ve biyokimyasal bozukluklara yol açarlar. Ayrıca, insanlar ve hayvanlar yönünden latent, akut ve kronik tipte zehirlenmelere (mikotoksikozis) de neden olurlar. Zehirlenme sonucu en çok etkilenen organın karaciğer olduğu bilinmektedir. Bunun yanında, mikotoksinler böbrekleri, sindirim sis-

temini, deriyi, solunum sistemini, üreme sistemini, sinir ve kasları da etkiler. Bu bileşiklerin teratojenik ve karsinojenik etkileri de söz konusudur (3,7,17,19,22).

Mikotoksinlerle meydana gelen zehirlenmelerden akut nitelikte olanlar, klinik bulgular ve ekonomik kayıplar şeklinde kolayca dikkati çekerken, subklinik ve kronik olgular gözden kaçabilir. Zehirlenme olaylarının tanısında; mikotoksin çeşidinin belirlenmesi ve kirlenme düzeyinin saptanması yönünden, toksikolojik analizlerin önemi büyüktür. Aynı kapsamda olmak üzere tarama niteliğinde yem ve yem hammaddeleri ile besinlerde mikotoksin çeşidi ve yoğunluğunu belirlemeye yönelik laboratuvar analizlerinde de farklı analitik metotlardan (kromatografik, fluorodansitometrik ve immunolojik) yararlanılır (1,13,14,18,21).

Bu çalışmada; yem ve yem hammaddeleri ile besinlerde mikotoksin analizinde kullanılan ve yarı-kalitatif nitelikte bir metot olan minikolon tekniğinin laboratuvarımıza uyarlanması ve bu kapsamda olacak şekilde fark-

lı düzeylerde aflatoksin katılmış yem ve yem hammaddelerinde bu yöntemin duyarlılık limitlerinin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Çalışmada materyal olarak özel bir yem fabrikasından temin edilen ve herhangi bir mikotoksin kontaminasyonu olmadığı tespit edilen 10'u hammadde (arpa, buğday, mısır, mısır kepeği kırmızı, mısır kepeği beyaz, pamuk tohumu küspesi, pamuk yaprağı küspesi, kepek, soya küspesi, ayçiçeği küspesi) ve 12'si de karma yemden (2. dönem tavuk yumurta yemi, yumurta civeiv yemi, etlik civeiv yemi, toklu besi yemi, kuzu büyütme yemi, sığır başlangıç yemi, sığır besi yemi, sığır besi semirtme yemi, sığır ekstra süt yemi, sığır süt yemi, buzağı başlangıç yemi, buzağı büyütme yemi) oluşan toplam 22 yem örneği kullanıldı. Çalışma aflatoksinin üretiminden başlanarak 3 aşamada yürütüldü.

Aflatoksin üretimi

Çalışmada kullanılan aflatoksin; Shotwell ve ark. (16) tarafından bildirilen ve Demet ve ark. (4) tarafından modifiye edilen yöntemle üretilmiştir. Buna göre, önce 10 ml'lik tüplere 5'er ml patates dekstroza agar ilave edildi, tüpler eğik tutuldu ve agarın donması sağlandı. Aflatoksin üretimi için *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999 suşu kullanıldı. Söz konusu suştan agara ekim yapılarak etüvde 28°C'de 5 gün tutuldu. %0,005'lik triton X-100 kullanılarak mantarlar toplandı ve sayımı yapıldı. Üretilen mantarlardan aflatoksin sentezi 100 g pirinç içeren 500 ml'lik erlenlerde gerçekleştirildi. Öncelikle pirinç içeren erlenlere 50 ml su ilave edildi ve sterilize edildi, toplanan ve sayılan mantarlardan her bir erlenmeye 1'er ml ilave edildi ve erlenler etüve (28°C'de) yerleştirildi; 5 gün sadece gündüzleri her saat başı karıştırıldı. Beşinci günün sonunda erlenler etüvden alındı ve otoklavda mantarlar öldürüldü, yaklaşık 70°C'de kuruması sağlandı ve öğütüldü. Toplam aflatoksin miktarı, r-biofarm total aflatoksin kiti kullanılarak Enzim Immuno Assay cihazında ölçüldü.

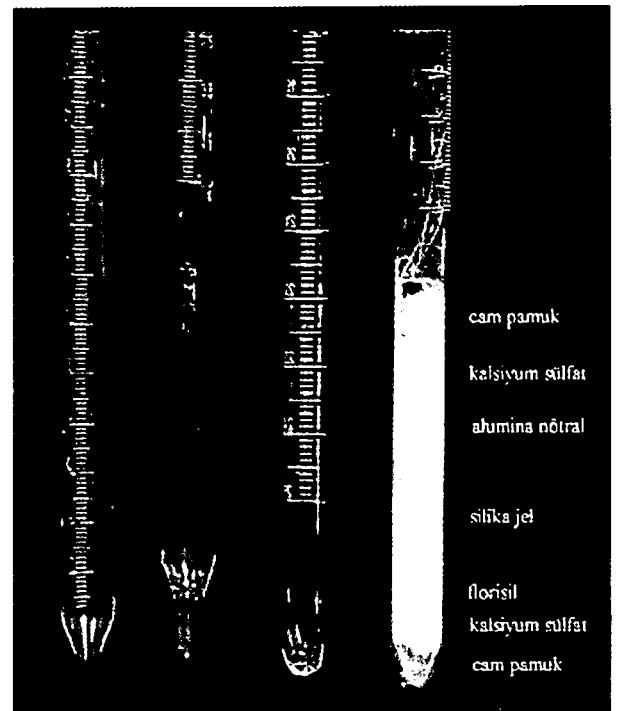
Ekstraksiyon

Yukarıda ayrıntıları verilen yöntem ile üretilen ve hazırlanan aflatoksin standardı 4 farklı düzeyde (10, 20, 50 ve 100 ppb) olacak şekilde 22 yem numunesine ayrı ayrı ilave edildi. Yem ve yem hammaddelerine ilave edilen aflatoksinin ekstraksiyonu esasta Roberts ve Patterson (13) tarafından önerilen ve Şanlı ve ark. (18) tarafından uyarlanan yöntemle yapıldı. Buna göre kısaca; örneklerdeki aflatoksin kalıntıları asetonitril+potasyum klorür (90+10) karışımı ile ekstrakte edildi; ekstrakte bulunan protein, mum, renkli maddeler gibi kirleticiler kurşun ase-

tatla çöktürülerek ve yağlar izooktan ile çalkalanarak uzaklaştırıldı ve bu şekilde ön temizlemesi yapıldı; sulu asetonitril kısmı önce bikarbonat ve daha sonra hidroklorik asitle muamele edilerek asit ve alkali faza geçebilen mikotoksinler daha sonra kloroform fazında toplandı. Evaporatörde kloroform kısmı 1 ml'ye kadar uçuruldu ve minikolon aşaması için hazır hale getirildi.

Minikolon tekniği

Ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen yaklaşık 1 ml'lik ekstrakt toplam aflatoksinin belirlenmesi yönünden minikolon tekniği (6.15.20) kapsamında içerisi daha önceden adsorban maddelerle doldurulmuş cam kolonlara aktarıldı. Kolon olarak, 6 mm çapında ve yaklaşık 15 cm uzunluğunda cam kolonlar kullanıldı. Kolonlar en alt tabakadan başlayarak cam pamuğu, kalsiyum sülfat, florisit (60-100 mesh, 130°C'de 5-8 saat etüvde etkinleştirilmiş, daha sonra deaktive edilmiş), silika jel (230 mesh, 80°C'de 2 saat süreyle etkinleştirilmiş, daha sonra deaktive edilmiş), alumina nötral (etkinlik derecesi V, 527-675°C'de en az 4 saat süreyle aktive edilmiş, daha sonra deaktive edilmiş), susuz kalsiyum sülfat ve en üste de cam pamuğu olacak şekilde dolgu maddeleri ile dolduruldu (Şekil 1). Elde edilen ekstrakt (yaklaşık 1 ml) kolona aktarıldı; daha sonra üzerine yıkama çözeltisi olarak kullanılan kloroform+aseton (9+1), 2x4 ml ilave edildi. Ekstraktın tamamen sürüklenmesi beklendikten sonra UV



Şekil 1. Çalışmada kullanılan cam kolonlar ve adsorbanlarla doldurulmuş kolon.

Figure 1. Glass column and column filled with adsorbents used in the study.

ışığı altında kolonlar aflatoksin varlığı yönünden değerlendirildi. Florisil tabakalarda meydana gelen mavi floresans pozitif olarak kabul edildi. Kör deneme olarak da aynı şekilde hazırlanan cam kolondan aflatoksin ilave edilmeden ekstraksiyonu yapılan ve evaporatörde uçularak hazırlanan ekstrakt geçirildi ve UV ışığı altında incelendi. Aflatoksinlerin karakteristik özelliği olan ve sülfürik asit ilavesi ile maviden kanarya sarısına dönüşen rengi gözlemek ve dolayısıyla da ayırimsal tanıyı sağlamak için: UV ışığı altında incelenen kolonlardan 5 ml sülfürik asit (suda %25'lik) çözeltisi geçirildi ve tekrar UV ışığı altında incelendi.

Bulgular

Çalışma kapsamında 10'u hammadde ve 12'si de karma yem olacak şekilde toplam 22 adet yem örneği analize tabi tutuldu ve her örnek için aflatoksinin 4 farklı yoğunluğu değerlendirildi. Bu amaçla yeme katılacak aflatoksin miktar olarak Türkiye'de karma yemlerde bulunmasına izin verilen total aflatoksin düzeyi olan 10 ppb'den başlayarak 20, 50 ve 100 ppb düzeyinde yem örneklerine katıldı.

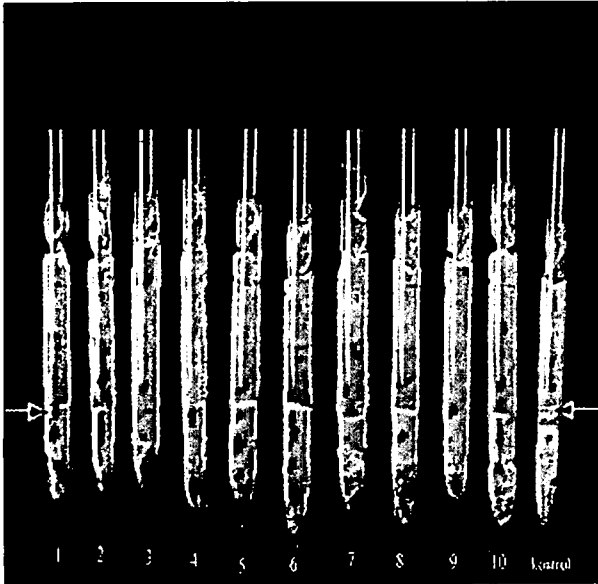
Çalışma sonunda elde edilen bulgular aflatoksinin yukarıdaki 4 farklı yoğunluğunun da minikolon tekniği ile tespit edilebileceğini gösterdi. Evaporatörde uç-

rulduktan sonra kalan yaklaşık 1 ml'lik hacim kolona aktarıldığında, aflatoksin florisil tabakasında UV ışığı altında mavi floresan şeklinde belirlendi. Aflatoksinin artan miktarına bağlı olarak renk şiddeti ve yoğunluğunda da artış şekillendi (Şekil 4 ve 5). Olanak ölçüsünde farklı yem numunesi seçilmek suretiyle yemden kaynaklanabilecek pigmentlerin, yağların ya da yabancı maddelerin sonucu etkileyip etkilemeyeceği de değerlendirilmiş oldu. Özellikle yağlı numunelerde bu yapıların florisil tabakanın üstündeki adsorbanlar tarafından tutularak sonuç üzerinde olumsuz bir etkiye yol açmadığı gözlemlendi.

Analiz her numunede üçer kez tekrar edilerek standardize edildi. UV ışığı altındaki elde edilen görüntülerin resmi karanlık ortamda çekilerek sunuldu. Buna ilişkin sonuçlar, Şekil 2'de 50 ppb'lik aflatoksin düzeyinin farklı yem numunelerindeki görünümünü ve Şekil 4'de de farklı yoğunluklardaki aflatoksinin 2 farklı yem örneğindeki görünümünü şeklinde gösterildi. Aynı şekilde, kolondan H₂SO₄ (suda %25) geçirildikten sonraki renk değişiklikleri de Şekil 3 ve 5'de gösterildi.

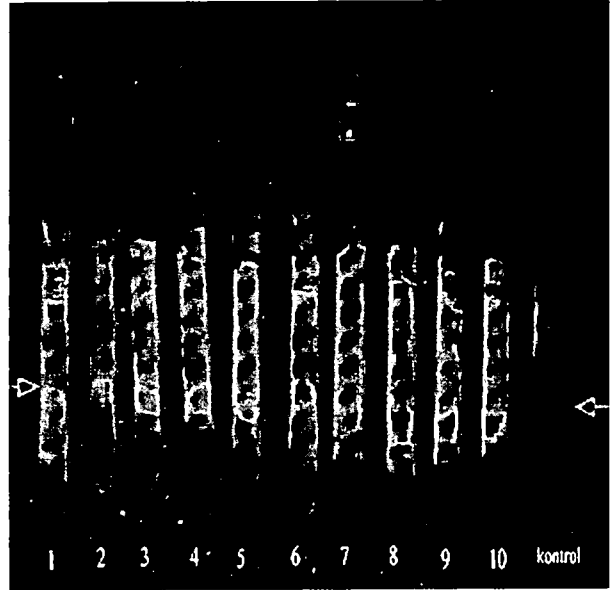
Tartışma ve Sonuç

Karma yemler, yağlı tohumlar ve tahılların tek hücreli mantarların invazyonuna uğraması sonucu ortaya çıkan küflenme olayları bütün dünyada sıklıkla karşılaşı-



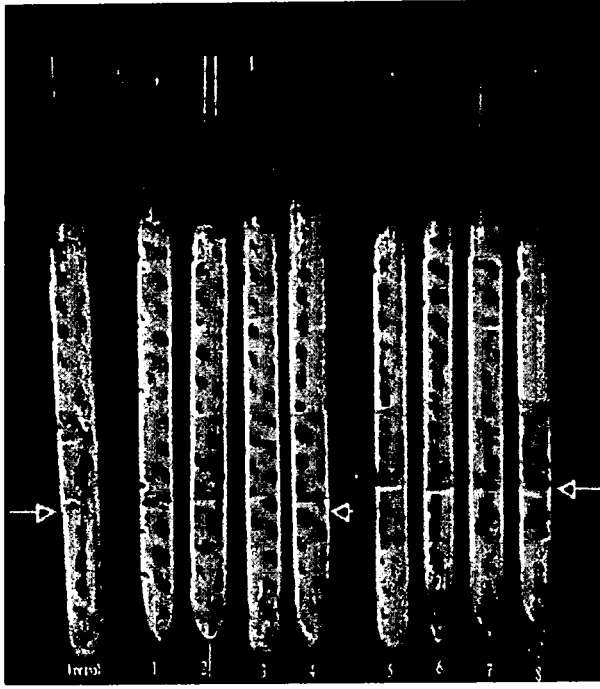
Şekil 2. Farklı yem örneklerine 50 ppb düzeyinde katılan aflatoksinin görünümü (1. Arpa, 2. Buğday, 3. Mısır, 4. Pamuk tohumu küspesi, 5. Kepek, 6. Soya küspesi, 7. Yumurta civev yemi, 8. Kuzu büyüme yemi, 9. Sığır besi yemi, 10. Buzağı büyüme yemi).

Figure 2. The appearance of aflatoxin added at a level of 50 ppb to different feed samples (1. Barley, 2. Wheat, 3. Corn, 4. Cottonseed meal, 5. Bran, 6. Soybean meal, 7. Feed (layer chick starter), 8. Feed (lamb grower), 9. Feed (beef fattening), 10. Feed (calve grower).



Şekil 3. Farklı yem örneklerine 50 ppb düzeyinde katılan aflatoksinin H₂SO₄ geçirildikten sonraki görünümü (1. Arpa, 2. Buğday, 3. Mısır, 4. Pamuk tohumu küspesi, 5. Kepek, 6. Soya küspesi, 7. Yumurta civev yemi, 8. Kuzu büyüme yemi, 9. Sığır besi yemi, 10. Buzağı büyüme yemi).

Figure 3. The appearance of 50 ppb aflatoxin applied to different feed samples after passing through H₂SO₄: (1. Barley, 2. Wheat, 3. Corn, 4. Cottonseed meal, 5. Bran, 6. Soybean meal, 7. Feed (layer chick starter), 8. Feed (lamb grower), 9. Feed (beef fattening), 10. Feed (calve grower).

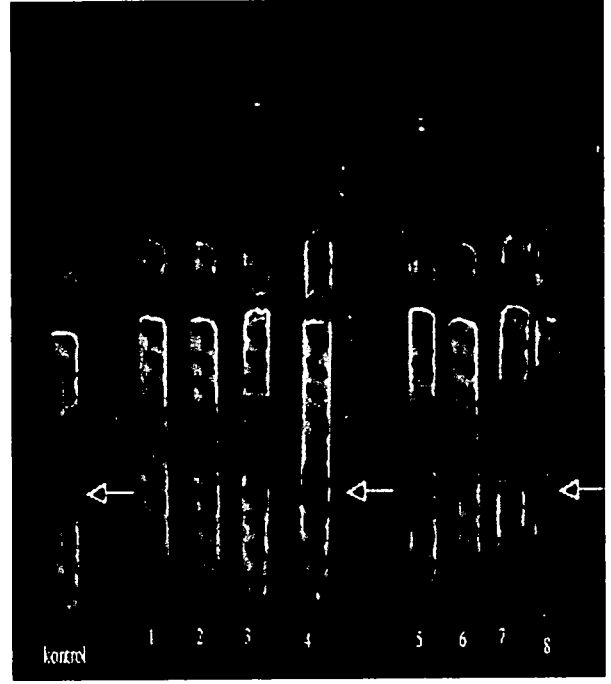


Şekil 4. Buğday ve mısır farklı yoğunluklarda katılan aflatoksinin görünümü (1-4. Buğday, sırasıyla 10, 20, 50 ve 100 ppb aflatoksin; 5-8. Mısır, sırasıyla 10, 20, 50 ve 100 ppb aflatoksin).

Figure 4. The appearance of aflatoxin added at different amounts to wheat and corn (1-4. Wheat, 10, 20, 50, and 100 ppb aflatoxin, respectively; 5-8. Corn, 10, 20, 50, and 100 ppb aflatoxin, respectively).

lan doğal küflenme olgularıdır. Küflenme olayının 1960'lı yıllara kadar besin çeşitlerinde sadece estetik yönden bozulma yaptığı kabul edilmekteydi. Ancak, bu tarihte İngiltere'de hindilerde görülen ve 100.000'den fazla hindinin toplu halde ölümüyle sonuçlanan olayın nedeninin aflatoksinlerden kaynaklandığının belirlenmesi mikotoksinlerin toksikolojik yönden önemlerini de ortaya çıkarmıştır (3,8,16,19). Bu tarihten itibaren de mikotoksikozis olaylarına ve bunların etkeni durumundaki toksik maddelerin (mikotoksinlerin) tespitine yönelik çalışmalar yoğun şekilde yürütüle gelmiştir (5,6,15,20).

Mikotoksinlerin ve dolayısıyla bu grubun en önemli üyesi konumundaki aflatoksinlerin analizine yönelik uygulamalar biyolojik ve kimyasal analizler şeklinde 2 grupta toplanabilir. Bunlardan biyolojik denemeler sadece kalitatif ve yarı kantitatif niteliktedir ve çoğu zaman da non-spesifiktir. Farklı mikotoksin çeşitlerinin belirlenmesi söz konusu olmaz. Kimyasal analizler daha fazla çeşitlilik gösterir, daha hızlı, ucuz, daha spesifik ve duyarlıdır. Bununla birlikte, ayrı bir grupta değerlendirilen immunolojik metotlar ise kimyasal ve biyolojik yöntemlerin karışımı şeklinde ifade edilirler. Immunolojik metotlar da yine duyarlı ve seçici, spesifik yöntemlerdir (12-14,18).



Şekil 5. Buğday ve mısır farklı yoğunluklarda katılan aflatoksinin H_2SO_4 geçirildikten sonraki görünümü (1-4. Buğday, sırasıyla 10, 20, 50 ve 100 ppb aflatoksin; 5-8. Mısır, sırasıyla 10, 20, 50 ve 100 ppb aflatoksin).

Figure 5. The appearance of aflatoxin added at different levels to wheat and corn after passing through H_2SO_4 (1-4. Wheat, 10, 20, 50, and 100 ppb aflatoxin, respectively; 5-8. Corn, 10, 20, 50, and 100 ppb aflatoxin, respectively).

Kimyasal yöntemlerle aflatoksinlerin analizi, analiz için örnek alınmasından başlayarak kantitatif yönden miktar tayininin yapıldığı aşamaya kadar bir dizi aşamayı içerir. Örnek alma, analizlerin doğru yapılabilmesi ve değerlendirilebilmesi için en önemli aşamadır. Bu amaçla farklı yöntemler uygulanır ve bunlar arasında en bilinenleri uniform örnekleme, seçici örnekleme ve rasgele örneklemedir. Bu aşamadan sonra laboratuara gönderilen örnekler ekstraksiyon işleminden başlayarak analize tabi tutulur. Ekstraksiyon işlemi çeşitli organik solventlerle yapılır ve bu amaçla en çok kloroform, asetonitril, metanol ve aseton kullanılır. Ekstraksiyon işleminin ardından; analiz örneğinde bulunabilecek kirliliklerin, yabancı maddelerin ve yağların uzaklaştırılabilmesi amacıyla temizleme işlemi uygulanır ve bu amaçla da en fazla kolon kromatografisi tatbik edilir (13,14,18).

Miktar yönünden tayin aşamasına gelince, mikotoksinler ve aflatoksinler UV ışığı (254 nm) altında floresan veren maddelerdir ve bu nedenle analizleri de genellikle bu prensibe dayanır. Kalitatif yönden belirlemede, ince tabaka kromatografisi (İTK) ya da minikolon kromatografisi gibi metotlar uygulanır. Aynı şekilde, İTK yarı-kantitatif belirleme amacıyla da kullanılan bir yöntemdir. Tamamen kantitatif belirleme, bilinen bir stan-

darın kullanılmasıyla olur ve bunun için de yine kromatografik temele dayanan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK), yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi ve fluorotoksinmeter gibi yöntemler kullanılabilir (6,14,15,20,21). Doğrulama testleri amacıyla da, trifloro asetik asit ya da daha sıklıkla kullanılan sülfürik asit gibi ayraçlar denenebilir (8,13).

Yukarıda belirtilen ve aflatoksinlerin kalitatif ya da kantitatif yönden belirlenmesi esasına dayanan yöntemlerin her birinin avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Aflatoksinlerin analizi amacıyla yararlanılan ilk metot 1964'de yayınlanmıştır (6). İTK olarak isimlendirilen metot ile düşük miktardaki aflatoksinlerin dahi ölçülmesi mümkün olmuştur. İTK aflatoksinlerin analizi amacıyla uzun süre kullanılmış yarı-kantitatif bir metot olmuştur. Bu metot ile yaklaşık 0,5 ng aflatoksin varlığı standart ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edilebilir. Ülkemizde de bu metot rutin analiz amacıyla toksikoloji laboratuvarlarında yaygın şekilde kullanılmış; her türlü laboratuvar şartlarında uygulanabilen kolay, ucuz, hızlı ve fazla bir laboratuvar ekipmanı gerektirmeyen bir metot olarak değerlendirilmiştir (1.5,13,14,18). Şanlı ve ark. (18) esaslı Roberts ve Patterson (13) tarafından belirlenen bu metodu modifiye ederek kendi laboratuvar şartlarına uygun hale getirmişlerdir. Daha sonraki dönemlerde de ülkemizde yem ve yem hammaddelerindeki mikotoksin kirliliğinin belirlenmesi amacı ile yürütülen çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir metot olmuştur (9,10). 1960'lı yıllardan başlayarak 1970 ve 1980'lerde yaygın şekilde kullanılan bu metot bugün için yerini YBSK, gaz kromatografi, RIA ve ELISA gibi yöntemlere bırakmıştır (12,18,21).

Tarama niteliğinde ve kalitatif bir yöntem olarak değerlendirilen minikolon tekniği ise özellikle saha şartlarında ve hızla sonuç alınması gereken durumlarda kullanılmak için geliştirilmiş bir metottur. İTK'da olduğu gibi ucuz, kolay uygulanabilir, fazla bir ekipman gerektirmeyen ve aflatoksinlerde yaklaşık 20 ppb'lik tolerans limitlerini de saptayabilen bir metottur. 1976 yılından itibaren geliştirilmeye çalışılmış bir yöntemdir (20). Yöntemle ilgili çalışmalar özellikle kolon içeriğinde bulunan adsorban maddelerin geliştirilmesi yönünde olmuştur; aynı şekilde kolonlar da cam ya da plastik olacak şekilde geliştirilmiştir. Yöntem tarama niteliğinde ve kalitatif bir metot olarak kabul edilmekle birlikte, tarama sonucunda pozitif çıkan örneklerin flurotoksimeter gibi kantitatif yönden değerlendirmeye olanak sağlayan metotlara uygulanabilmesi açısından da ön metot olarak kullanılabilir (6,15,20).

Saha şartlarında kolayca ve fazla ekipman gerektirmeden uygulanabilen bu tekniğin geliştirilmesi ve standardize edilmesi ve aynı şekilde laboratuvar şartlarımızda ve sahada kullanılabilir bir yöntem haline getirilmesi amacıyla planlanan ve sonuçlandırılan bu çalışmada; farklı çeşitten yem ya da yem hammaddelerine farklı yoğunluklarda ilave edilen aflatoksin standardının kolonun florasil tabakasında UV ışığı altında görülebildiği tespit edildi. Çalışmada ülkemizde total aflatoksin için karma yemlerde kabul edilen 10 ppb'lik tolerans düzeyi ve bunun üst yoğunlukları çalışıldı. 10 ppb'den başlayarak artan aflatoksin düzeyleri (20, 50 ve 100 ppb) florasil tabakada da yine artan renk yoğunluğu ve şiddeti şeklinde karşımıza çıktı. Yem çeşidindeki değişiklikler ve dolayısıyla yem içeriğindeki olası pigment, yabancı madde ve yağ gibi istenmeyen unsurların, florasil tabakanın üstündeki adsorban maddelerce tutularak sonuç üzerinde herhangi bir etkiye yol açmadığı tespit edildi. Çalışma sonunda elde edilen veriler; her ne kadar kalitatif bir metot olarak kabul edilse de minikolon tekniğinin, kullanılacak standart maddelerle oluşturulacak bir renk yoğunluğu skalası yardımıyla yarı kantitatif bir metot şeklinde kullanılabileceğini ve ülkemiz şartlarında, özellikle endüstriyel ölçekte işletmecilik yapan yem fabrikaları ve benzeri yerlerde kolay, çabuk, ucuz ve hızlı cevap veren bir yöntem şeklinde değerlendirilebileceğini gösterdi.

Kaynaklar

1. **Andrellos PJ, Reir GR** (1964): *Confirmatory tests for aflatoxin B₁*. JAOAC. **47**, 801-803.
2. **Betina, V** (1983): *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier, Amsterdam.
3. **Cardeillac PI, Nair KPC** (1974): *Hazards presented by mycotoxins and toxigenic mold spores in feeds*. Toxicol Appl Pharmacol. **30**, 299-308.
4. **Demet Ö, Oğuz H, Çelik İ, Adıgüzel H** (1995): *Buğday, mısır, pirinç ve yarıstıgında aflatoksin üretimi*. Vet Bil Derg. **11**, 135-140.
5. **Karunyavanij S** (2001): *Factors affecting the TLC of aflatoxins analysis*. <http://fea.org/inpho/library/x0036c/x0036Eoh.htm#plastic%20minicolon%20for%20aflatoxin%20detection>. Erişim tarihi: 27.8.2001.
6. **Karunyavanij S** (2001): *Plastic minicolumn for aflatoxin detection*. <http://fea.org/inpho/library/x0036c/x0036Eoh.htm#plastic%20minicolon%20for%20aflatoxin%20detection>. Erişim tarihi: 27.8.2001.
7. **Kaya S** (1989): *Yem ve yem hammaddelerindeki mikotoksinler; insan ve hayvan sağlığı için önemi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg. **36**, 226-253.
8. **Kaya S** (1998): *Mikotoksinler ve mikotoksin zehirlenmeleri*. "Alınmıştır" S Kaya, I Pirinççi, A Bilgili (Eds) Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi. 35, Ankara.

9. **Kaya S, Yarsan E** (1999): *Kanatlılarda gelişme geriliği, verim azalması ve zehirlenmelere yol açabilen başlıca maddeler: 3. Mikotoksinler ve diğer zehirler*. Türk Koop Ekin, **3**, 92-98.
10. **Kaya S, Şanlı Y, Yarsan E, Özsoy A, Akkaya R, Bilgili A** (1996): *Çok yönlü hayvan yetiştiriciliğinde karma yem ve yem hammaddelerinden kaynaklanan olumsuzluk faktörlerinin araştırılması*. Etlik Vet Mikrob Derg, **8**, 59-80.
11. **Kaya S, Yarsan E** (1996): *Yem ve yem hammaddelerinde küflenmenin önlenmesi ve mikotoksinlerle kirlenmiş bu tür yemlerin değerlendirilmesine yönelik uygulamalar*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **42**, 111-122.
12. **Özpinar H, Kahraman R, Şenol HS** (1993): *Yem ve yem hammaddeleri ve fabrika yemlerinde aflatoksin B1, okratoksin A ve zearelenonun miktarının enzimimmunoanalitik yöntemlerle saptanması*. Turk J Vet Anim Sci, **17**, 239-244.
13. **Roberts BA, Patterson DSP** (1976): *Mycotoxins: Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs. Using a novel membrane clean up procedure*. JAOAC, **58**, 1178-1181.
14. **Romer TR** (1976): *Methods of detection mycotoxins in mixed feeds and feed ingredient*. Feed Stuffs, **19**, 18-22.
15. **Romer TR, Ghouri N, Boling TM** (2001): *Minicolumn screening methods for detecting aflatoxin: state of the art*. http://fao.org/inpho/vlibrary/X0036e/X0036EOihtm#_Minicolumn%20screening%20methods%20for%20detecting&20aflatoxin%20state%20of%20the%20art. Erişim tarihi: 27.8.2001.
16. **Shotwell OL, Hasseltine CW, Stubblefield RD, Sorrenson WG** (1966): *Production of aflatoxin on rice*. Appl Micro, **14**, 381-386.
17. **Şanlı Y** (1989): *Küflenmiş yem: kullanımı, tüketimi ve sakıncaları*. Çiftlik Derg, **62**, 23-35.
18. **Şanlı Y, Ceylan S, Kaya S** (1982): *Karma yemlerde aflatoksin analizi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **29**, 50-70.
19. **Şanlı Y, Kaya S** (1994): *Veteriner İlaç Rehberi ve Uygulamaları Bilgiler El Kitabı*. Medisan Yayın Serisi: 21. Ankara.
20. **Velasco J** (1975): *Fluorometric measurement of aflatoxin adsorbed of florosisil in minicolons*. JAOAC, **58**, 757-763.
21. **Wilson DM, Tabor WH, Truckles MW** (1976): *Scanning method for the detection of aflatoxin, ochratoxin, zearelenone, penicillic acid and citrinin*. JAOAC, **59**, 125-127.
22. **Yarsan E, Özdemir M** (1997): *Aflatoksinlerin insan ve hayvan sağlığı yönünden önemi ve aflatoksinlerin yıkınlanmasına yönelik uygulamalar*. Türk Koop Ekin, **1**, 41-47.

Geliş tarihi: 27.9.2001 / Kabul tarihi: 27.11.2001

Yazışma adresi:

Doç.Dr. Ender Yarsan
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
06110 Dışkapı, Ankara
e-mail: yarsan@veterinary.ankara.edu.tr