

283819

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**DEPOLAMA VE AMBALAJLAMA KOŞULLARININ,  
BESİNLERE TOKSİK MADDELER BULAŞMASI  
BAKIMINDAN İNCELENMESİ**

Analitik Toksikoloji ve Bromatoloji  
Programı

DOKTORA TEZİ

Ecz. Gönül ŞAHİN

ANKARA — 1978

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**DEPOLAMA VE AMBALAJLAMA KOŞULLARININ,  
BESİNLERE TOKSİK MADDELER BULAŞMASI  
BAKIMINDAN İNCELENMESİ**

Analitik Toksikoloji ve Bromatoloji  
Programı

DOKTORA TEZİ

Ecz. Gönül ŞAHİN

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ : Doç. Dr. SUNA DURU

ANKARA — 1978

Ö N S Ö Z

Bu araştırmada, mikotoksinler içinde en toksik olan aflotoksin B<sub>1</sub> 'in günlük diyetimize en çok giren gıda maddesi olan un örneklerine bulaşma sorunu incelenmiştir.

Bu konuyu bana vererek aydınlanmamı sağlayan, çalışmamın her safhasında her türlü yardımı esirgemeyen Bölüm Başkanı sayın hocam Doç. Dr. Suna Duru'ya en derin teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmamızda gerekli olan örneklerin toplanmasında büyük ilgi ve yardımlarını gördüğüm Dr. Doçan Benli'ye teşekkür ederim.

# İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
G İ R İ Ő _____	1
A. Aflatoksinlerin Toksisitesi _____	4
B. Etki Mekanizması _____	7
C. Hayvan Vucudundaki Yazgısı _____	7
D. Kimyasal Yapıları, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri _____	7
E. Aflatoksin Oluşumunu ve Stabilitesini Etkileyen Etmenler _____	10
F. Nitel ve Nicel Yöntemler _____	12
G E R E Ç v e Y Ö N T E M L E R _____	15
- Kimyasal Madde Listesi _____	15
- Gereç Listesi _____	16
- Yöntem _____	17
B U L G U L A R _____	34
T A R T I Ő M A _____	35
Ö Z E T _____	39
Ö N E R İ L E R _____	40
K A Y N A K L A R _____	41

## G İ R İ Ő

Tezin başlığından da anlaşıldığı üzere konunun kapsamı çok geniş olduğundan araştırmayı, sonuçlarının gerçekçi olmasını sağlamak amacıyla sınırlamak zorunluluğunu duyduk. Bu araştırmada, mikotoksinler içinde en toksik olan aflatoksin B<sub>1</sub> 'ın günlük diyetimize en çok giren gıda maddesi olan un örneklerine bulaşma sorunu incelenmiştir.

Mikotoksinlerden olan aflatoksinler, *Aspergillus flavus*'un oluşturduğu, çok toksik ve kanserojenik etkide metabolitlerdir. Bunun yanısıra diğer *Aspergillus* ve bazı *Penicillium* genus'ları da aflatoksin üretir.

*Euratiaceae* familyasının, *Euratiiales* takımından olan *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarının en çok aflatoksin oluşturan türleri :

*Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *A. parasiticus*, *A. ostianus*, *A. wentii*, *A. tamarrii*, *A. oryzae*, *Penicillium frequentans*, *P. variable*, *P. puberulum*, *P. citrinum*'dur. Bunlar saprofit kf fungusları olup, sporlanmaları çok boldur. Sporları uzun yıllar canlılıklarını korudukları gibi, su ve rüzgar gibi etkenlerle dünyanın her yerine yayılırlar (1-9).

Sağlıksız depolama koşullarında, insan ve hayvan besinlerinde kf fungusları kolaylıkla üremektedir. Bunların metabolitlerinin insan sağlığı

üzerine olumsuz etkilerini ortaya koymak için, biyolojik sistemlerdeki araştırmalar çoğunlukla aflatoksinlere yöneliktir. Aflatoksinler, sağlık açısından son yılların en önemli sorunlarından biridir. Önceleri nedenleri bilinmeyen bir çok hastalığın fungusla bulaşık besinlerin yenmesiyle ilişkili olduğunun ortaya çıkışı, aflatoksinlere güncellik kazandırmıştır.

İngiltere'de 1960 yılında 100.000 hindi yavrusunun ölmesi, aflatoksinlerin ilk uyarı işareti oldu. Daha bir çok hayvanda görülen bu hastalığa, ilk önce hindilerde gözlenmesi nedeni ile "Hindilerin X Hastalığı" adı verildi (Turkey X disease). Söz konusu hindiler ve yemleri üzerindeki çalışmalar, hastalık ile fungusla bulaşık yemler arasında direkt bir ilişki olduğunu gösterdi. 1961 yılında Weybridge'deki Veteriner Araştırma Merkezi'nde, Sargeant ve araştırma grubunun çalışmaları sonucu ilk patojenik kanıt olarak *Aspergillus flavus* Link saptanmış, ve bunun toksik bir metabolit oluşturduğu bulunmuştur (1,2).

Aflatoksinlerin biyosentezi üzerinde çalışılmış ve birçok şemalar geliştirilmiştir (10). Ancak bunların doğruluğu kesinleşmemiştir. Bu şemalardaki mekanizmaya karşı çıkanlarda vardır. Bununla beraber fenilalanin kesin olarak aflatoksin B<sub>1</sub> biyosentezinde prekürsör rol oynadığı saptanmıştır. Şikimik asidin ise aflatoksin B<sub>1</sub> biyosentezindeki prekürsör rolü tartışmalıdır (11).

Aflatoksin B<sub>1</sub> ve diğerleri, margarin, kuru incir, hurma, marmelat, meyva suyu, fındık fıstık, ayçiçeği çekirdekleri, mısır, buğday, bezelye, soya unu, sığır ve koyun sütlerinde saptanmıştır (1,12).

Depolanan her gıda maddesinde, özellikle yüksek karbonhidrat içeren buğday ve pirinçte aflatoksin B<sub>1</sub> ve diğerlerinin oluşma olasılığı çok yüksektir.

Ülkemizde bu tür ilk problem, 1967 yılında Kanada'ya sattığımız 10 ton iç fındığın aflatoksinle bulaşık olması neden gösterilerek geri çevrilmesi ile ortaya çıkmıştır. 1971'de de Amerika Birleşik Devletleri'ne sattığımız 45 parti antep fıstığınının 36 partisi aynı nedenle geri çevrilmiştir. Daha sonra 1972 yılında Danimarka'ya satılan kuru incirlerde de 938 µg/kg gibi yüksek düzeyde aflatoksin bulunduğu saptanmış olup bu yıllardan itibaren ürünlerimiz aflatoksin içermesi bakımından önem kazanmıştır (13).

Türkiye'nin 1975 yılı için tahıl üretimi 13.189.320 ton, buğday üretimi 8.750.000 tondur (14). Kişi başına tüketilen buğday miktarı 1973 yılı için 200 kg/yıl'dır (15).

Buğdayın beslenmemizde bu denli büyük yer tutmasına karşın bu gıda maddesinde aflatoksin üzerine yapılan bilimsel çalışma yalnız bir tanedir (16).

Sunulan bu çalışmamızda, Ankara Çevresinden toplanan, değirmen, bak-  
kal, ev gibi yerlerde depolanmış un örneklerinin üzerinde çalışılmıştır. Bu örneklerde, insan sağlığına çok zararlı olan Aflatoksin B<sub>1</sub>, nitel ve yarı nicel yöntemlerle araştırıldı. Bir aylık aralarla yinelenen tayinlerle, aflatoksin B<sub>1</sub> miktarının, depolama süresine bağlı değişimi, bunun yanı sıra nem tayinleri ile, aflatoksin B<sub>1</sub> üzerinde nemin önemi, laboratuvar koşullarımıza ve elimizdeki standart madde miktarına en uygun yöntemle araştırılmaya çalışılmıştır.

#### A. Aflatoksinlerin Toksisitesi

Aflatoksinlerin insan ve hayvan sağlığı açısından büyük tehlike olduğunun saptanmasından sonra, zararlı etkilerinin, test sistemi, doz ve temas süresiyle ilişkileri araştırılmıştır. Sonuçta, akut ve yüksek dozda aflatoksin, test hayvanlarına ve kültürdeki hayvan hücrelerine letal etki de olduğu, daha düşük dozların, önemli histolojik değişmelere, kronik temasın ise, tümör indüksiyonuna neden olduğu saptanmıştır.

Aflatoksin B<sub>1</sub>, üzerinde çok durulan en kuvvetli hücre zehiridir. Aflatoksin B<sub>1</sub> 'in akut toksisite ölçütü olarak bir günlük ördekler kullanılır. lt olarak alınan bir günlük ördek yavrularında aflatoksin B<sub>1</sub> için LD<sub>50</sub> 18.2 µg/50 gm olarak saptanmıştır. 72 saat sonra yapılan otopsi de, intestinal bölgede ve peritoneal boşlukta hemoraji, karında su toplanması, safra proliferasyonu, karaciğerde temel histolojik bozukluklar görülmüştür (17-19).

Buttler ve Wogan, subletal dozlarda, haftalarca aflatoksin B<sub>1</sub>, alan çeşitli hayvan türlerinde, ciddi karaciğer hasarı, safra hiperplazisi gözlemişlerdir (20,21).

Tulpule ve Madhavan, genç maymunlarda subakut toksisite araştırması yapmışlardır. Maymunlar, 0.5 mg/gün dozda aflatoksin B<sub>1</sub> ile 18 gün temasta bırakılmıştır. 14-28 günde letal etki gözlenmişlerdir. Aflatoksikoz, anoreksi ile başlamıştır. Histopatolojik bulgu olarak karaciğer lezyonları (portal inflamasyon, safra sirozu, yağ dejenerasyonu gibi) saptamışlardır (22).

Lancaster ve arkadaşları, % 20 oranda aflatoksin B<sub>1</sub> ile kontamine diyetle beslenen sıçanlarda, kısa zaman sonra karaciğer tümörü, akciğer



metastazi kesin olarak saptamışlardır (23). Aynı bulgular daha birçok hayvanlarda gözlenmiştir (24-27).

Doz-cevap ilişkileri kesinleşmemekle beraber, 0.06-1.8 ppm dozda bile aflatoksin B<sub>1</sub> 'in % 90 oranda karaciğer tümörü oluşturabileceği bilinmektedir.

Ashley, alabalıklarda, aflatoksin B<sub>1</sub> ile yaptığı araştırmalarda, hepatom oluşma olasılığının 2 ppm dozda toksin ile büyük olduğunu saptamıştır (28,29).

Dickens, sıçanlarda aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub> 'in birden fazla subkütanoz enjeksiyonu şeklindeki uygulamasını içeren araştırmalarında, enjeksiyon bölgesinde sarkom, fibrosarkom geliştiğini gözlemiştir. Hatta enjekte edilen doz yükseldiği takdirde subkütanoz dokularda kanser oluşmuştur (30).

Yüksek doz aflatoksin alan ineklerde, süt üretiminde belirgin azalma, vücut ağırlığında azalma, sütlerinde aflatoksin M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> fraksiyonları gözlenmiştir. Erkek danalarda aflatoksin B<sub>1</sub> ile bacaklarda güç kaybı, gelişmede azalma saptanmıştır. Domuzlarda aflatoksine hassas hayvanlardır. Doza bağlı olarak, karaciğer hasarı görülmüştür. Düşük doz aflatoksin B<sub>1</sub> ile, orta lob, büyük dozlardaki toksin ile tüm loblarda hasar görülmüştür. Buna bağlı olarak serum enzim seviyelerinde yükselme saptanmıştır. Kümes hayvanlarında aflatoksine duyarlıdır. Bu hayvanlarda sadece karaciğer değil, böbrek hasarı da gözlenmiştir (31).

Aflatoksinlerin, özellikle aflatoksin B<sub>1</sub> 'in en önemli etkilerinden birisi de, Ensefalopati ve Viscera'nın yağ dejenerasyonudur (EFDV). Bu etkiyi destekleyen birçok veri vardır (34,35). Bu konuda ilk veri Tayland'ta Ensefalopati ve yağ dejenerasyonundan ölen 23 çocuktan 22'sinin çeşitli organ ve içeriğinde çok yüksek düzeyde aflatoksin B<sub>1</sub> saptanmış olmasıdır (36,37).

Aflatoksinlerin etkileri, bazı etmenlerle değişkenlik gösterebilmektedir. Kobaylarda toksinin esas hedef organı, böbrekler, farelerde akciğer, sıçanlarda karaciğer ve kolon'dur (38-40).

Yanlış beslenme ile aflatoksin hasarı arasında, direkt bir ilişki vardır. Çocuklarda, protein eksikliği, Kwahiskor hastalığına neden olmaktadır. Bu arada aflatoksinle bulaşık gıdalarda alınırsa, infantile sirozun oluşması kesindir (41). Düşük oranda protein alınması, aflatoksine duyarlılığı artırmakta, zira protein, aflatoksin hasarını perdelemektedir (42).

Vitamin B<sub>6</sub> eksikliği, aflatoksin hasarını çok arttırmaktadır. Vitamin B<sub>6</sub> azlığı, transaminasyonun azalmasına neden olmaktadır (43).

Yağ oranı düşük diyet de aflatoksin etkisini önemli ölçüde arttırmaktadır (44).

Vitamin B<sub>12</sub> azlığı veya tamamen noksanlığı, aflatoksinlerin karaciğer karsinoma riskini arttırmaktadır (45,46).

Vitamin A oranı düşük diyet, aflatoksinin oluşturduğu kolon kanserinin oluşmasını kolaylaştırmaktadır (47).

Hipofizektomi, dietilstilboesterol, % 0.2 oranındaki Metionin, karaciğer karsinomasının oluşma riskini çok arttırmaktadır (31,48,49). Buna karşılık % 00.1 - 0.6 oranda Üretan, fenobarbital, aflatoksin B<sub>1</sub> 'e duyarlılığı önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (50,51).

Lasiocarpin (pirazolidin alkaloitlerinden), aflatoksin B<sub>1</sub> ile oluşan nekrotik sirozun oluşumunu hızlandırmaktadır (52).

### B. Etki Mekanizması

Aflatoksinlerin etki mekanizmaları tam aydınlığa kavuşmamakla beraber, büyük bir olasılıkla DNA ile birleşip RNA aktivitesini bozarak, protein sentezini önemli ölçüde azaltmaktadır. DNA ya bağlanma kanserojenik etkinin kesin bir görünüşüdür (53).

Aflatoksin B<sub>1</sub> 'in kromozom kopmasına, kromozom aberasyonlarına neden olduğu saptanmıştır. Yine aynı toksinle farelerde yapılan denemelerde, çok sayıda çaprazlamalar sonucunda, hücre bölünmesinin post ve premeiosis basamağında mutajen olduğu gözlenmiştir (54).

### C. Hayvan Vücudundaki Yazgısı

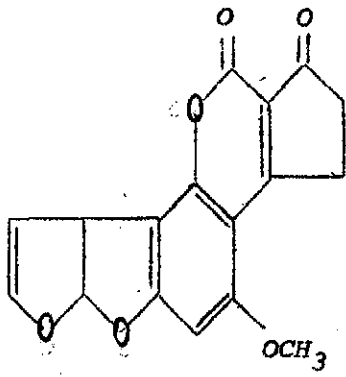
Aflatoksin B<sub>1</sub> 'in metabolik yazgısında, O-demetilasyonun büyük payı vardır. Halka dayanıklıdır. % 25 oranında karbondioksit (CO<sub>2</sub>) şeklinde yıkılmaktadır. Büyük kısmı safra ile itrah edilmektedir. Çok az kısmı aflatoksin B<sub>1</sub> şeklinde, bir kısmı da idrar ve feçeste çözünürlükleri farklı, kromatografik özellikleri değişik ürünler şeklinde atılmaktadır. % 6-8 oranda karaciğerde tutulmaktadır (55,56). 15 µg aflatoksin B<sub>1</sub> 'in 24 saat içinde idrarda aflatoksin M<sub>1</sub> şekline dönüştüğü saptanmıştır (57).

Grice, aflatoksinlerin ve metabolitlerinin plasenta ve süte geçtiğini göstermiştir (58).

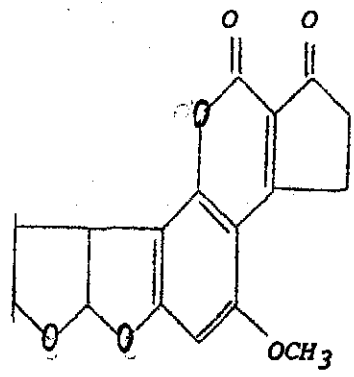
### D. Kimyasal Yapıları, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Aflatoksinler, furan ve piranon halkalarından meydana gelmiş, dihidrofuran türevi, büyük moleküllü kimyasal bileşiklerdir.

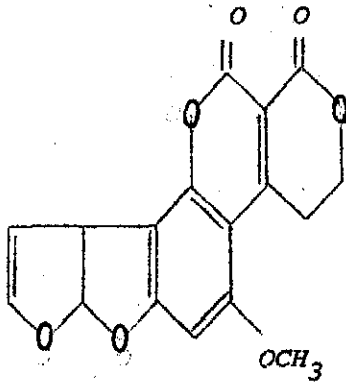
Aflatoxin B<sub>1</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)



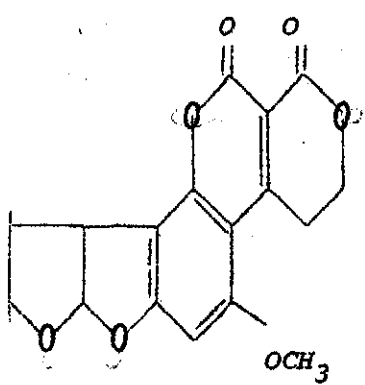
Aflatoxin B<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>)



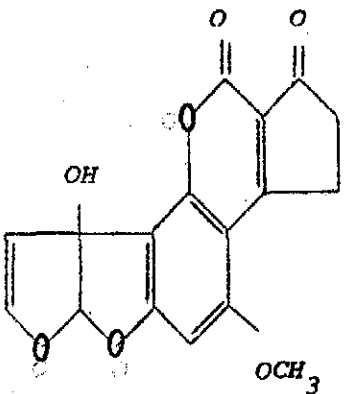
Aflatoxin G<sub>1</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>)



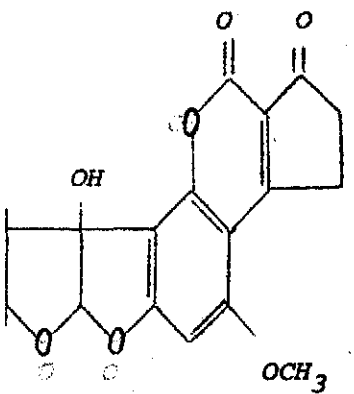
Aflatoxin G<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>)



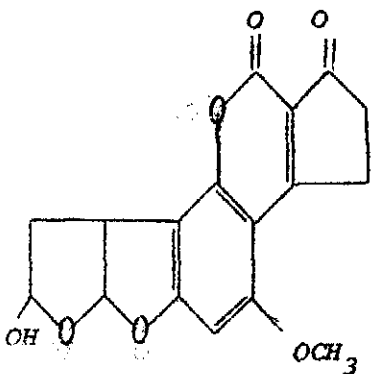
Aflatoxin M<sub>1</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>)



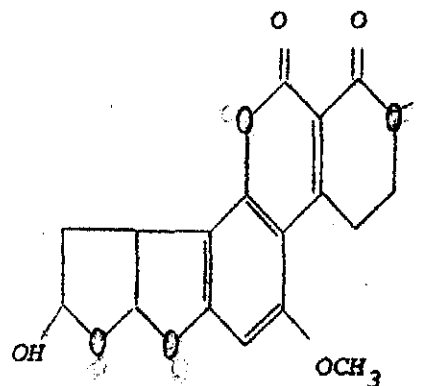
Aflatoxin M<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>)



Aflatoxin B<sub>2a</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>)



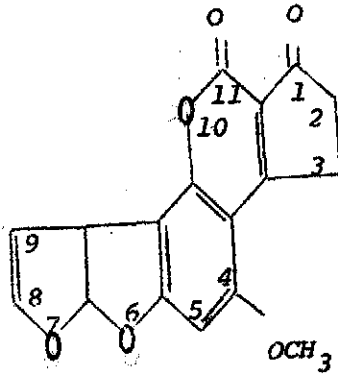
Aflatoxin G<sub>2a</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>)



Wogan ve çalışma grubunun toksikologlarla beraber çalışmaları sonucu, aflatoksinlerin yapısı aydınlatıldı. Aflatoksinlerin, önce dört ana komponenti olduğu saptandı (59-61). Ultraviyole ışığı altında, kuvvetli mavimsi floresans verenlere aflatoksin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> yeşil floresans verenlere ise aflatoksin G<sub>1</sub> ve aflatoksin G<sub>2</sub> adı verildi. Daha sonra sütden bulunan, küçük R<sub>f</sub> değerli, ultraviyolede mor floresans veren aflatoksin M<sub>1</sub> ve aflatoksin M<sub>2</sub> türevleri de aydınlatıldı. Son olarak, çok az toksisiteye sahip aflatoksin B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub> 'nin hidroksi türevleri olan aflatoksin B<sub>2a</sub> ve aflatoksin G<sub>2a</sub> saptanmıştır. Tüm bu aflatoksin türevlerinin kimyasal yapısı, Şekil 1 de gösterilmiştir.

Aflatoksinler, kimyasal yapı bakımından az, toksik etkileri bakımından çok fark gösterirler. Monolakton yapısındaki aflatoksin B<sub>1</sub>, dilakton yapısındaki aflatoksin G<sub>1</sub> 'e oranla iki katı kadar, toksisiteye sahip olduğu bulunmuştur. (8,9) arasındaki çifte bağ, toksisite düzeyini belirleyen önemli faktörlerden biridir (1).

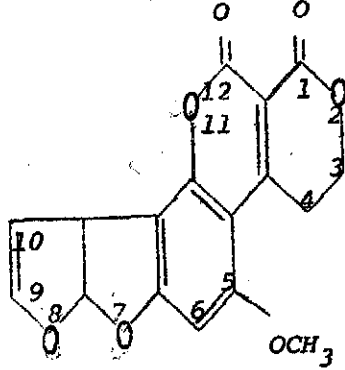
Aflatoksin B<sub>1</sub> ve aflatoksin G<sub>1</sub> 'in kimyasal numaralandırması ve okunuşu Şekil 2 ve 3 de gösterilmiştir (62).



ŞEKİL - 2 : Aflatoksin B<sub>1</sub>

(2,3,6 a α, 9 a α -Tetrahidro-4 metoksiksisiklopenta [c] furo

[3',2':4,5] furo [2,3-h] [1] benzopiran 1,11-dion)



ŞEKİL - 3 : Aflatoksin G<sub>1</sub>

(3,4,7 a , 10 a - Tetrahidro-5 metoksi-1 H, 12 H - furo  
[3',2':4,5] furo [2,3-h] pirono [3,4-c] [1] benzopiran-1,12-dion)

Kapalı formülü C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> olan aflatoksin B<sub>1</sub> ; DMSO (dimetilsülfoksit), etanol, metanolde iyi, kloroformda çok iyi çözünür. Petrol eterinde çözünmez. Işığa duyarlıdır. Sodyum hipoklorit, kromsülfürik asit, derişik sodyum hidroksit ile bozunur (62).

#### E. Aflatoksin Oluşumunu ve Stabilitesini Etkileyen Etmenler

Aflatoksin oluşumu, üç evrede incelenir.

Hasat öncesi etmenler; Sulama, gübreleme, uygun olmayan iklim koşulları, zararlı ve patojenlerin etkileridir. Bitkinin zarar görmeyecek şekilde sulanmasına özen göstermek gerekir. İyi beslenmeyen bitki, fungusların saldırısına daha çok uğrayabilir. Üründeki parazit ve patojenlerin etkileri aflatoksin oluşumuna yol açar (63).

Hasattan depolamaya kadar olan süredeki etmenler; Erken veya geç yapılan hasat, aflatoksin oluşumuna büyük ölçüde olumlu etkendir. Olgunlaşmadan önce incirlere *Aspergillus flavus* aşılendiğinde, meyvalar olgunlaştıkça aflatoksinin en yüksek düzeye çıktığı saptanmıştır (64). Ağır çiğden sonraki hasat, aflatoksin yönünden önemlidir. Hasat biçimi, kurutma, taşıma ve işleme tekniği, aflatoksin oluşumunu etkiler. Hasat sırasında yaranma, kırılma, kurutmada gecikme, taşıma sırasında ezilme, bulaşma, karışma aflatoksin oluşumunu arttırıcı etmenlerdir.

Aflatoksin oluşumunda en önemli etmenlerden biri de depolama koşullarının uygun olmayışıdır. Aflatoksinler depo fungusları olduğu için, depolama koşulları çok önem kazanır. Depolanan ürünlerdeki nem oranı, sıcaklık, depolama süresi, deponun bağıl nemi, depolanan ürünlerdeki zararlı oranı, fungusların gelişmesinde ve metabolitlerinin oluşmasında etkendir.

Fungusun üründe etkili olabilmesi için, bir miktar neme gerek vardır. Mısırdaki % 16-25, unlarda % 16, pirinçte % 20-22, buğdayda % 17-18 oranda nem oluşu aflatoksin miktarını doruk seviyeye çıkarır. Mısır üzerinde yapılan bir araştırmada, % 9.4 nem içerdiği zaman 114 mg/kg aflatoksin B<sub>1</sub> saptanmıştır (65).

Aflatoksin oluşumunda, depo sıcaklığı da önemli etmendir. Aflatoksin 13<sup>o</sup>-42<sup>o</sup>C ler arasında oluşabilir. En yüksek düzeyde aflatoksin oluşumu için 24<sup>o</sup>C ve 4-7 gün süre yeterlidir. En düşük sıcaklık 6<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>C, en yüksek sıcaklık ise 45<sup>o</sup>C olarak da belirtilmektedir (66).

Depolama süresi de önemli etmenlerdendir. Aflatoksin, en fazla olarak, depolamanın 1-4 aylık devresinde oluşmaktadır.

Depolanan ürünlerdeki zararlı miktarı, nitel ve nicel kayıplara neden olduğu gibi, ürünlerdeki aflatoksin oranının artmasında etmendir. Zira afla-

toksin oluşturan funguslar, zarar görmüş üründe daha kolay gelişebilmek-  
te ve metabolit oluşturmaktadır.

Fungusun gelişmesinde, metabolit oluşturmasında substrat yapısının  
rolü büyüktür. Yüksek karbonhidrat içeren pirinç, buğday gibi maddelerde,  
fıstık ve pamuk gibi ürünlere oranla daha fazla oluşma olasılığı vardır.  
Aspergillus flavus, fazla orandaki yağı metabolize edememektedir. Mannoz,  
ksiloz aflatoksin oluşumunu arttırmaktadır.

Biyolojik etmenlerde aflatoksin oranına etkilidir. Depo rnde Asper-  
gillus flavus ve birçok mikroorganizmalar beraber bulunabilir. Bunlar mik-  
robial yarışmaya girip aflatoksin oluşumunu sınırlar.

Abdalla, Aspergillus kültürüne Rhizopus oryzae ve Sclerotium bato-  
ticola aşılandığı zaman toksik üretiminin azaldığını göstermiştir (66,67).

Aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub> 'in sudaki çözeltileri karanlıkta oldukça daya-  
nıklıdır. Buna karşın ışıkta % 50 si bir günde, tamamı dokuz günde bozuldu-  
ėu saptanmıştır. Tarçın'ın da aflatoksin oluşumunu engellediği gösteril-  
miştir. % 0.2-20 oranında ekmeğe katılan tarçın kf gelişimini ve toksin  
oluşumunu önemli ölçüde azaltmaktadır. Ekmek yapımındaki işlemlerin, afla-  
toksin B<sub>1</sub> zerine etkileri incelenmiştir. En fazla % 27 oranında, yoğurma  
ve pişirme sırasında aflatoksin B<sub>1</sub> miktarının azaldığı saptanmıştır (16,  
68,69).

#### F. Nitel ve Nicel Yöntemler

Aflatoksinlerin, insan ve hayvan sağlığı açısından büyük tehlike ol-  
duğunun, özellikle kanserojen etkisinin anlaşılmasından sonra üzerinde araş-  
tırmalar yoğunlaşmıştır. En az biyolojik sistemlerde olduğu kadar, gıdalarda



da araştırma konusu olmuştur ve olmaktadır. Gıdalarda, ana dört aflatoksin nitel ve nicel yöntemlerle belirlenmeye ve ayrılmağa çalışılmıştır. En fazla ince tabaka kromatografisi yöntemi geliştirilmiş ve uygulanmıştır (1,16,70-110). Bu araştırmaların çoğu aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 'nin ayırımına yöneliktir. Çok az olarak fluorodensitometrik (111-115) ve yüksek basınç likit kromatografi (HPLC) yöntemleri uygulanmıştır (116,117).

Sadece buğday ve ürünlerinde, en toksik metabolit olan aflatoksin B<sub>1</sub> 'in saptanması araştırmaları çok azdır (1,16,95,108,110).

Atlı, A., araştırmasında, buğday örneklerinin, mikroflorasını ve aflatoksin B<sub>1</sub> oluşumunu, stabilitesini esas almıştır. Örneklerde U.V. lambasında 366 nm de mavi floresans vermesi esasına dayanarak aflatoksin B<sub>1</sub> nitel olarak araştırılmıştır. Son nokta yöntemiyle nicel olarak saptanmıştır (16).

Frank, H.K., kuru gıdalara uygulanabilecek ekstraksiyon, temizleme, belirleme yöntemi vermiştir. Silikajel adsorban olarak kullanılmaktadır. İnce tabaka kromatografisi yöntemiyle, U.V. lambası altında 366 nm de aflatoksin B<sub>1</sub> 'in mavi floresans vermesi esasına dayanarak nitel tayin yapılmıştır. Kloroform-Metanol (91 : 9) çözücü sisteminde aflatoksin B<sub>1</sub> için R<sub>f</sub> değerleri 0.35-0.55 olarak saptandığı bildirilmektedir (1).

Odette, tahıl cinsi gıdalarda ekstraksiyon ve belirleme yöntemi uygulamıştır. Silikajel G-HR adsorban olarak kullanılan araştırmada aflatoksin B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> Metanol-kloroform (3 : 97) çözücü sisteminde saptanmıştır (109).

Engstrom, G.W., çalışmasında 3 çözücü sistemi geliştirmiştir. Adsorban olarak silikajel H, silikajel HR, silikajel G-HR kullanılmıştır. Dört, ana aflatoksin ayırımı ve belirlemesi gerçekleştirilmiştir (78).

Pons, W.A., ise araştırmasında uyguladığı ince tabaka kromatografisi yönteminde, adsorban olarak alüminyum oksit kullanmıştır. Metanol -

Kloroform (3 : 97) çözücü sisteminde, aflatoksin  $B_1$  için  $R_f$  değeri olarak 0.5 değerini vermektedir (91).

Reddy, T.V. ve arkadaşları, yine 4 ana aflatoksin olan  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  ve  $G_2$  ayrımı ve belirlenmesi için değişik çözücü sistemleri geliştirmişlerdir. Silikajel adsorban olarak kullanılmıştır. Toluen-iso-amil alkol-metanol (90 : 32 : 3) çözücü sisteminde, aflatoksin  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$  için sırası ile  $R_f$  değerleri olarak 0.56, 0.48, 0.42, 0.34 olarak saptanmışlardır (95).

Ayrıca tahıllara uygulanabilen bir başka, ekstraksiyon ve belirleme yöntemi de vardır. Mikotoksinler ve özellikle aflatoksinlerin ayrımı ve belirlenmesi için, benzen-metanol-asetikasit (90 : 5 : 5), eter - metanol - su (96 : 3 : 1), kloroform - isopropanol (99 : 1), kloroform - aseton - isopropanol - su (88 : 12 : 1.5 : 1), kloroform - aseton - su (88 : 12 : 1.5), kloroform - trikloroetan - n-amilalkol - formik asit (80 : 15 : 4 : 1) gibi çözücü sistemleri geliştirilmiştir (110).

G E R E Ç v e Y Ö N T E M L E R

Kimyasal Madde Listesi

Aflatoksin B<sub>1</sub> (Frank, H.K.)<sup>\*</sup>

Kieselgur (BDH)

Kloroform (Merck)

Susuz sodyum sülfat (Merck)

Hekzan (Merck)

Metanol (Merck)

Dietil Eter (Merck)

Kieselgel G (Merck)

Florisil (0.150-0.250 mm) (Merck)

Alüminyum oksit 150 nötral (Merck)

Benzen (Merck)

Etilasetat (Merck)

Metalik Sodyum (Merck)

% 7-5 lik Sodyumhipoklorit çözeltisi (Merck)

Demir-3-klorür, 6 H<sub>2</sub>O (Merck)

Sodyum hidroksit (Merck)

Aseton (Merck)

---

<sup>\*</sup> (75/KALSRUHE - DEUTSCHLAND)

Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm) (Merck)

Asetonitril (Merck)

der.Sülfürik Asit (Merck)

Potasyum ferrisiyanür (Merck)

2,4-dinitrofenilhidrazin (Merck)

Gereç Listesi

Plak çekme apareyi (Shandon unoplan)

Cam kolon (2 x 35 cm)

Mini cam kolon (0.3 x 10 cm)

Çalkalatör (MAS Laborteknik)

Tank (Camag)

Nuçe erleni

Buchner hunisi

Etüv (Dedeoğlu)

U.V. lambası (Camag-29200)

Su banyosu (Dedeoğlu)

Vakum pompası (Karl Kolb)

pH metre (Beckman)

Enjektör (10-15 ml)

Mikropipet (5-10 - 25 µl)

Rotovapor (Buchler Instruments L, N.J. U.S.A.)

Disposable pipet (25 µl)

## Y Ö N T E M

### A- Nitel Tayin Yöntemi

Uyguladığımız nitel yöntem ana olarak üç bölüm halindedir :

1. Ekstraksiyon
2. Temizleme
3. İnce Tabaka Kromatografisine Uygulanış ve Tanı

#### 1. EKSTRAKSİYON

Un örneğinden 50 g. tartıldı. 500 ml'lik kapaklı erlene aktarıldı. Üzerine 25 ml distile su ilave edildi. Ayrıca 25 g kiselgur ve 250 ml kloroform konularak erlenin kapağı sıkıca bantlandı. Kuvvetli olarak çalkalanıp, çalkalatörde 30-40 dakika çalkalanmaya bırakıldı. Sonra, süzgeç kağıdı, kiselgur ve cam pamuğu/<sup>ile</sup> hazırlanan buchner hunisi ile vakumdan süzülürdü. Süzüntünün ilk 50 ml'lik kısmı renkli şişeye alındı. Renkli şişelerin etrafı kağıtla sarılarak, temizleme safhasına kadar buzdolabında saklandı. Her örnek için ekstraksiyon yöntemi aynen ve ayrı ayrı uygulandı. Burada uygulanan ekstraksiyon yöntemi, koşullarımıza, olanaklarımıza göre değişiklikler yapılarak kullanılmıştır (92,97,110).

#### 2. TEMİZLEME

Kolon kromatografisiyle temizleme yapıldı.

a) Kolon Hazırlığı : İç çapı 2 cm, uzunluğu 35 cm cam kolon kullanıldı. Yeterli cam pamuğu ve çapa uygun süzgeç kağıdı önce yerleştirildi. 5 g susuz sodyum sülfat tartıldı ve kolona yerleştirildi iyice. Sonra kloroform içinde bulamaç haline getirilen silikajel (0.063 - 0.2 mm)

dikkatli olarak aktarıldı. İyice yerleşmesi için üzerine 5-7 cm kloroform ilave edildi. 15 g susuz sodyum sülfat dikkatli ve yavaş olarak kolona aktarıldı. Ve kloroform kolondan geçirildi. Silikajel (0.063 - 0.2 mm), kolona yerleştirilmeden önce etüvde 110°C de 2 saat aktive edilip, soğutuldu, desikatörde saklandı.

b) Kolondan Geçirme İşlemi

Hazırlanan kolondan, önce ekstraksiyon sonucu kazanılan ve buzdolabında saklanan 50 ml ekstrakt geçirildi.

Sonra 150 ml. hekzan geçirildi. Daha sonra fosforpentaoksit ( $P_2O_5$ ) veya metalik sodyum ile hazırlanan susuz eter, 50 g örnek için 150 ml hesabı ile kolondan geçirildi. Bunu takiben, 150 ml Metanol+Kloroform(3+97), geçirilirken aflatoksin olması mümkün kısım elüe edildi. Metanol+Kloroform (3+97), geçirilirken esas toplama kabımız kolon musluğu altına yerleştirildi.

Uçurma işlemine kadar yine renkli şişede kağıtla sarılı olarak buzdolabında saklandı.

Çalışmamızın her safhası dikkat, titizlik gerektirmekte idi. Devamlı % 5-6 lık sodyum hipoklorit çözeltisi ile eller, eldivenler, tüm kullanılan gereçler yıkanmakta, sonra temizlik malzemesiyle gerekli şekilde temizlenmekte idi. Zira çok tehlikeli, kanserojen etkili aflatoksin B<sub>1</sub>, sodyum hipoklorit çözeltisinden zarar görmektedir. 150 ml Metanol+Kloroform (3+97) ile kazanılan eluat, rotovaporda kuruluğa dek uçuruldu. Artık, 2-3 ml kloroformda çözülerek flakon şişesine enjektör yardımıyla aktarıldı ve makinada ağız kapatıldı. Tel ile sarılıp, buzlukta, ince tabaka kromatografisine tatbik safhasına kadar saklandı. Burada uygulanan kolon kromatografisi ile temizleme yöntemi yine şart ve olanaklarımıza göre değiştirilip uygulanmıştır (86,110),

### 3. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİNE UYGULANIŞ VE TANI

#### a) Kromatografi Plaklarının Hazırlanışı :

30 g. Silikajel G, 62 ml distile su ile iyice çalkalandı. Homojen bir bulamaç haline getirildi. Bu karışım plak yayma apareyi ile 20 x 20 cm boyutlu 5 plağa veya 10 x 20 cm boyutlu 10 plağa 0.3 mm kalınlıkta yayıldı. Oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Sonra 110°C ye ayarlı etüvde bir saat aktive edildi, soğuduktan sonra nem geçirmeyen dolaba alındı.

Hazırlanan plaklar ısı ve nemi değişmeyen, dolapta saklanıp, bir hafta süre ile kullanımları mümkündür.

#### b) Kromatografik Çözücü Sistemlerinin Hazırlanışı :

I. Sistem : Benzen-Asetonitril (80 : 20) Bu oranlarda çözücü karışımı hazırlandı. Kromatografi kuvetinde bir gece doyurulmaya bırakıldı ve sonra kullanıldı.

II. Sistem : Etilasetat - Su (50 : 50) Bu oranlarda hazırlanan çözücü karışımı iyice çalkalanıp kromatografi kuvetlerinde bir gece doyurulmaya bırakıldıktan sonra kullanıldı. Uygulanan iki çözücü sistemi tarafımızdan geliştirilmiş olup tartışma bölümün de ayrıca üzerinde durulmaktadır.

#### c) Laboratuvar Şartları :

Tüm kromatografi çalışmaları sırasında, oda sıcaklığının 22°-24°C olmasına özellikle dikkat gösterildi.

#### d) Standart Aflatoksin B<sub>1</sub> Çözeltisinin Hazırlığı :

1.85 mg standart aflatoksin B<sub>1</sub>, önce 3 ml kloroformda çözüldü .

Sonra yapılan seyreltmeleri ile 0.74 µg/ml standart aflatoksin B<sub>1</sub> havi flaskon kromatografi plağına tathik edilme işlemine kadar tel ile sarılı olarak buzlukta saklandı.

#### ÖN ÇALIŞMA

Araştırmamıza önce 74 µg/kg miktarda aflatoksin B<sub>1</sub>, aflatoksin B<sub>1</sub> içermeyen örneğe ilave edip, yöntemimizi uyguladık. Minikolon kromatografisi ile aldığımız sonuç yarı nicel olarak 30 µg/kg dan fazla aflatoksin B<sub>1</sub> havi olduğunu gösterdi. Sonuç, yöntemimizde ekstrasyon ve temizleme basamaklarındaki kayıp ihmal edilebilecek kadar az olduğunu kanıtıdır.

#### e) Kromatografi İşlemi :

Hazırlanan plaklara, önce standart aflatoksin B<sub>1</sub> ve örneklerden ele geçen, buzlukta saklanan bilinmeyen çözelti uygulandı. Noktaların kurumasından sonra, çözücü sistemlerine konup, sürüklenme yapıldı. Çözücünün plak üzerinde 13 cm yükselmesi için geçen süre, Benzen-Asetonitril (80 : 20) çözücü sistemi 15-17 dakika, Etilasetat-Su (50 : 50) çözücü sisteminde aynı miktarda yükselmesi için ise 17-22 dakikadır. Bu süre sonunda küvetten çıkarılan plaklar, oda sıcaklığında 10-15 dakika kurumaya bırakıldı.

U.V. lambası altında 366 nm'de görülen mavi floresans lekeler incelendi, yerleri saptandı.

Aflatoksin B<sub>1</sub>, U.V. lambası altında 366 nm'de verdiği belirgin mavi floresans ile kolayca belirlenebilir. R<sub>f</sub> değerleri, standart aflatoksin B<sub>1</sub> 'in verdiği mavi floresans lekelerinin yerleri ile karşılaştırılıp, örneklerde aflatoksin B<sub>1</sub> 'in olup olmadığı incelendi. Her iki sistemde elde edilen R<sub>f</sub> değerleri Tablo 1 de verilmiştir. Kromatoplakların U.V. ışığı



altında 366 nm'de çekilmiş fotoğrafları ise Şekil 4 a,b,c, 5 a,b,c ve 6 a,b,c de görülmektedir. Ayrıca, aflatoksin B<sub>1</sub> 'in verdiği mavi floresans çok belirgin ve özel olmasına, R<sub>f</sub> değerleri aynı olmasına rağmen belirteçlerle de kanıtlandı. % 25 lik Sülfürik asit, 2,4-dinitrofenil hidrazin şimdiye dek denenmiş olup (108), çalışmamızda biz de plaklara uyguladık. 2,4-dinitrofenil hidrazin ile mavi, sülfürik asit ile sarı renk oluştu. Ayrıca literatürde aflatoksinlerin belirlenmesinde kayıtlı olmayan Potasyum-demir-3-siyanür, demir-3-klorür belirteci uygulandı. Belirgin mavi renkli lekeler oluştu. Kullanılan belirteçlerin hazırlanışı şöyledir (118) :

1) 2,4-Dinitro fenilhidrazin Belirtecinin Hazırlanışı :

2 N HCl asit içinde % 4 lük 2,4-dinitrofenil hidrazin çözeltisi ile, 10 ml % 36 lık HCl asitte çözülüp 1000 ml etanole ilave edilen 1 g 2,4-dinitrofenil hidrazin çözeltisi ayrı ayrı hazırlanır. Kullanırken eşit oranlarda karıştırılıp plak üzerine püskürtülür.

2) % 25 Sülfürik asit Belirtecinin Hazırlanışı :

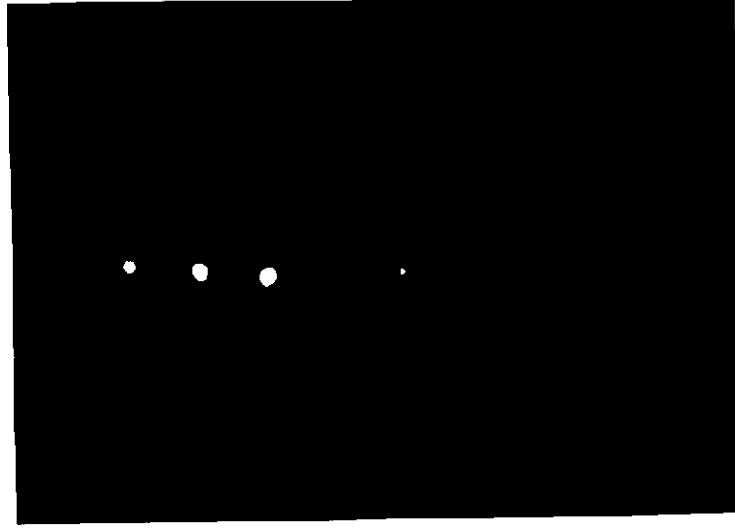
Sülfürik asitin n-butanoldeki % 25 çözeltisi hazırlanır ve plak üzerine püskürtülür.

3) Potasyum demir-3-siyanür-demir-2-klorür Belirtecinin Hazırlanışı :

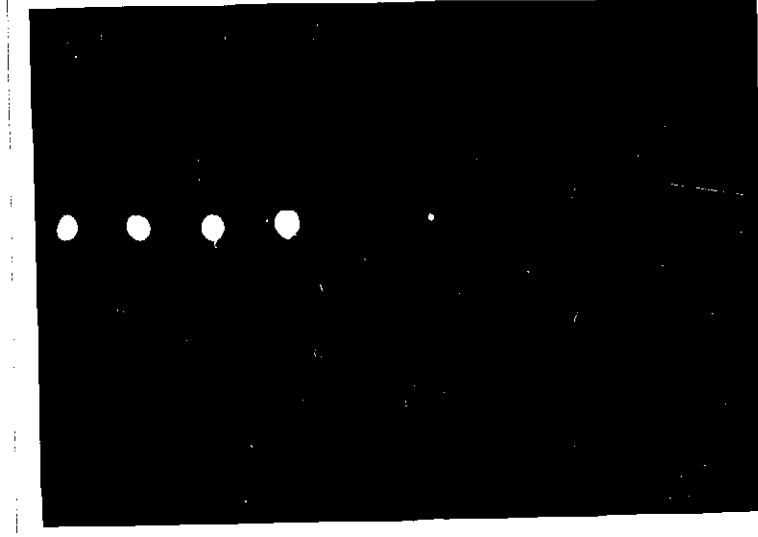
Potasyum ferri siyanür % 1 lik sulu çözeltisi ile % 2 lik demir-3-klorürün sudaki çözeltisi hazırlanır. Kullanacağı zamanı eşit oranlarda karıştırılır, püskürtülür, 2 N HCl ile renk belirginleştirilir.

Örnek	1. (Çözücü Sistemi)	2. (Çözücü Sistemi)
	Benzen-Asetonitril (80:20) aflatoksin B <sub>1</sub> 'in R <sub>f</sub> değeri	Etil Asetat-Su (50:50) aflatoksin B <sub>1</sub> 'in R <sub>f</sub> değeri
A	0.30 - 0.32	0.48 - 0.51
B	0.31 - 0.32	0.45 - 0.47
C	0.31 - 0.33	0.47 - 0.48

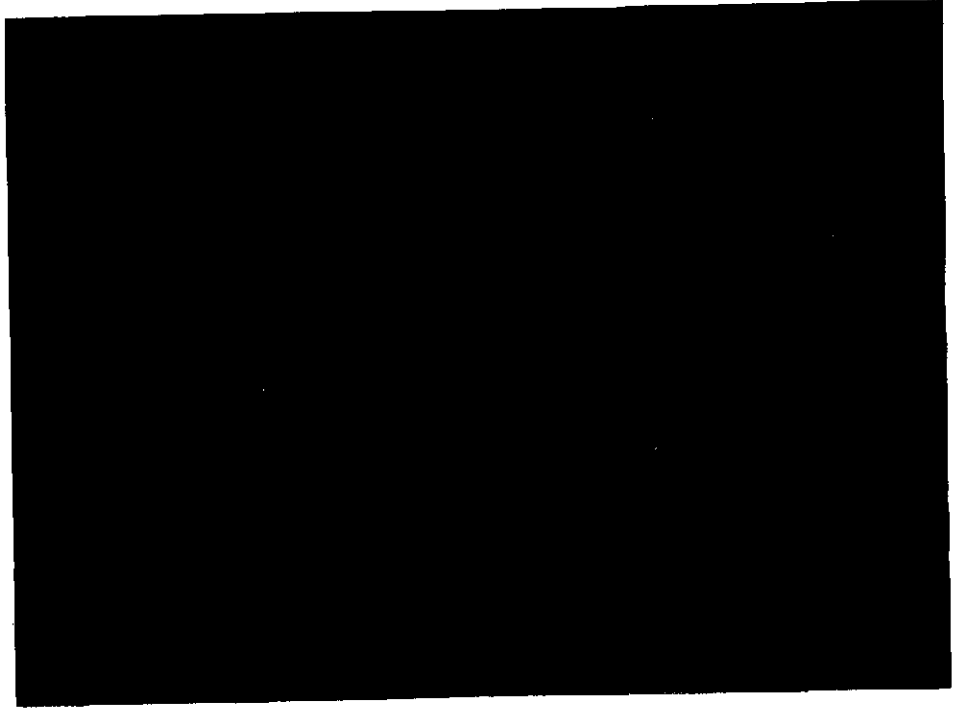
Tablo-1 Aflatoksin B<sub>1</sub> saptanan 3 un örneğinin, iki ayrı çözücü sisteminde R<sub>f</sub> değerleri görülmektedir.



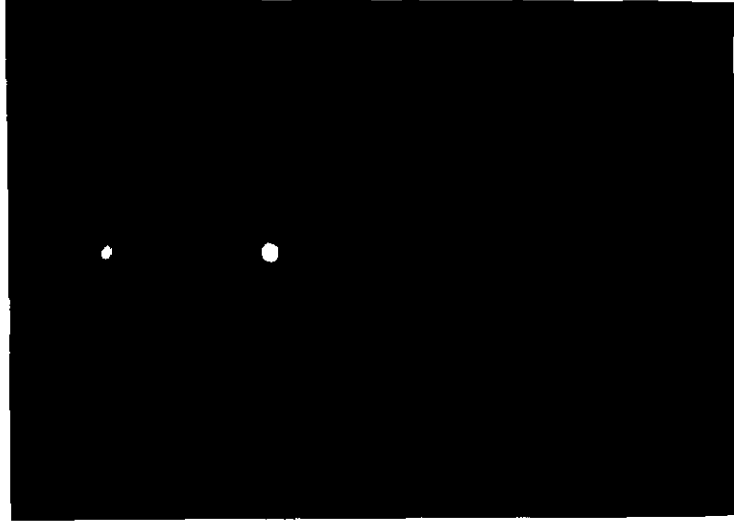
ŞEKİL (4 a) : A örneğinde saptanan aflatoksin B<sub>1</sub>'in, silikajel G adsorban kullanarak hazırlanan (20x20 cm) lik plakların, Benzen:Asetonitril (80:20) çözücü sisteminde sürüklenmesi sonucu U.V. lambası altında 366 nm de verdiği mavi floresans lekeler görülmektedir. Sol lekeler standart aflatoksin B<sub>1</sub> 'e aittir. Sağdaki lekeler ise A örneğine aittir.



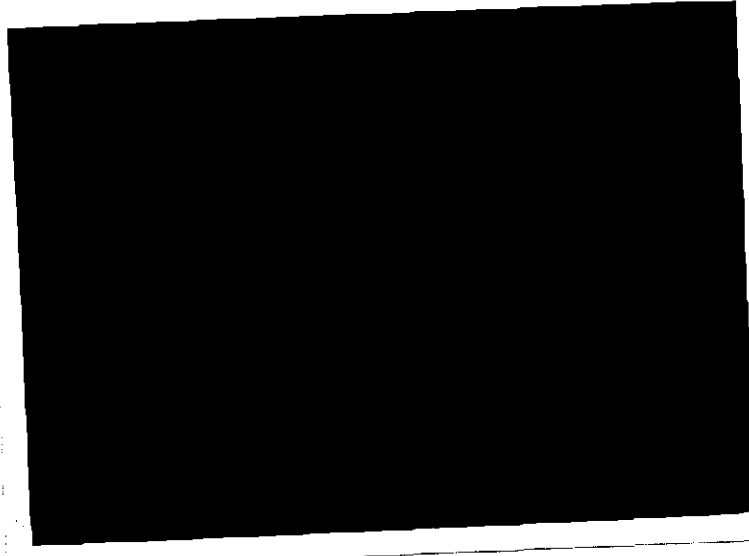
ŞEKİL (4 b) : A örneğinde saptanan aflatoksin B<sub>1</sub>'in, Silikajel G adsorban kullanarak hazırlanan (20x20 cm) plakların, Etilasetat-Su (50:50) çözücü sisteminde sürüklemesi sonucu, U.V. lambası altında 366 nm de verdiği mavi floresans lekeler görülmektedir.



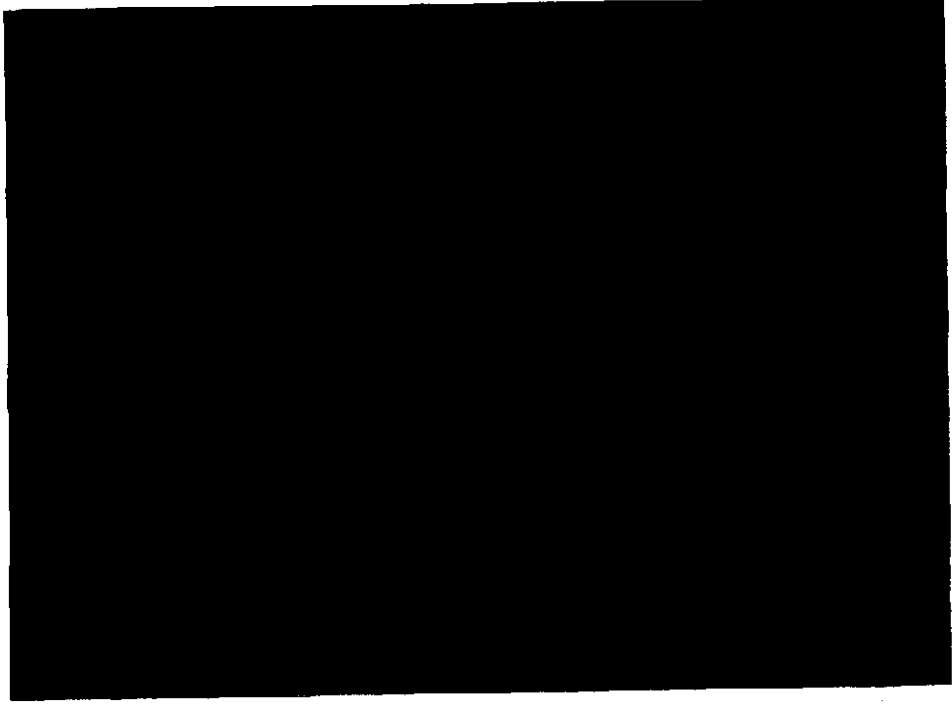
ŞEKİL (4 c) : A örneğinin silikajel G adsorban kullanarak hazırlanan (20x20 cm) lik plakların benzen-asetonit- ril (80:20) çözücü sisteminde, sürüklenmesi sonucu, içerdiği aflatoksin B<sub>1</sub>'in verdiği mavi floresans lekeler görülmekte (renkli).



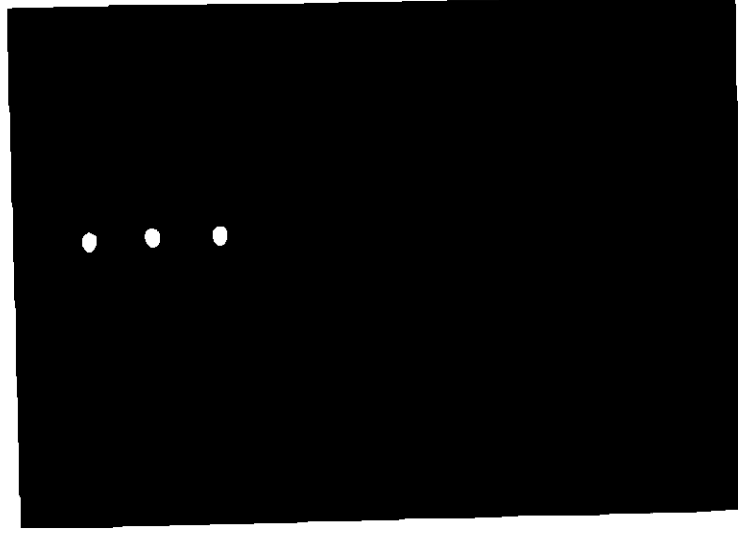
ŞEKİL (5 a) : B örneğinde saptanan aflatoksin B<sub>1</sub>'in silikajel G adsorbantı ile hazırlanan (20x20 cm) plaklara uygulanıp Benzen-Asetonitril (80 : 20) çözücü sisteminde sürüklenmesi sonucu U.V. lambası altında 366 nm de verdiği mavi floresans görülüyor. Sol leke standarta aittir. Sağdaki lekeler B örneğine aittir.



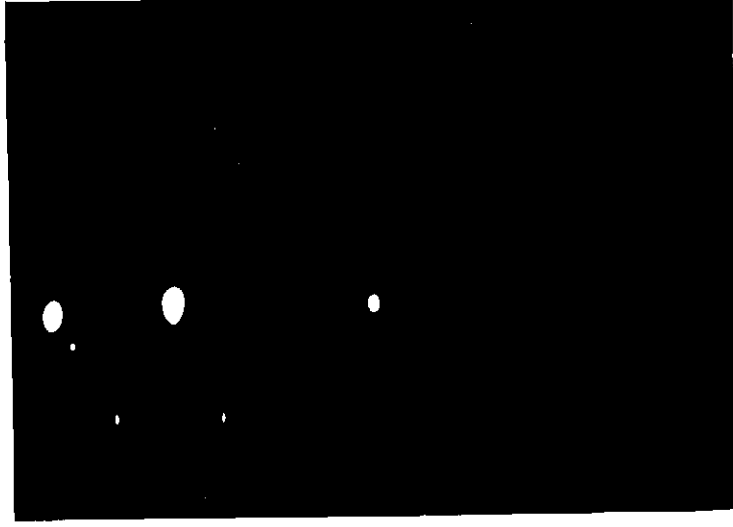
ŞEKİL (5 b) : B örneğinde saptanan aflatoksin B<sub>1</sub>'in silikajel G adsorbantı ile hazırlanan (20x20 cm) lik plaklara uygulanıp, Etilasetat-Asetonitril (50:50) çözücü sisteminde sürükledikten sonra U.V. lambası altında 366 nm de verdiği mavi floresans lekeler görülmektedir.



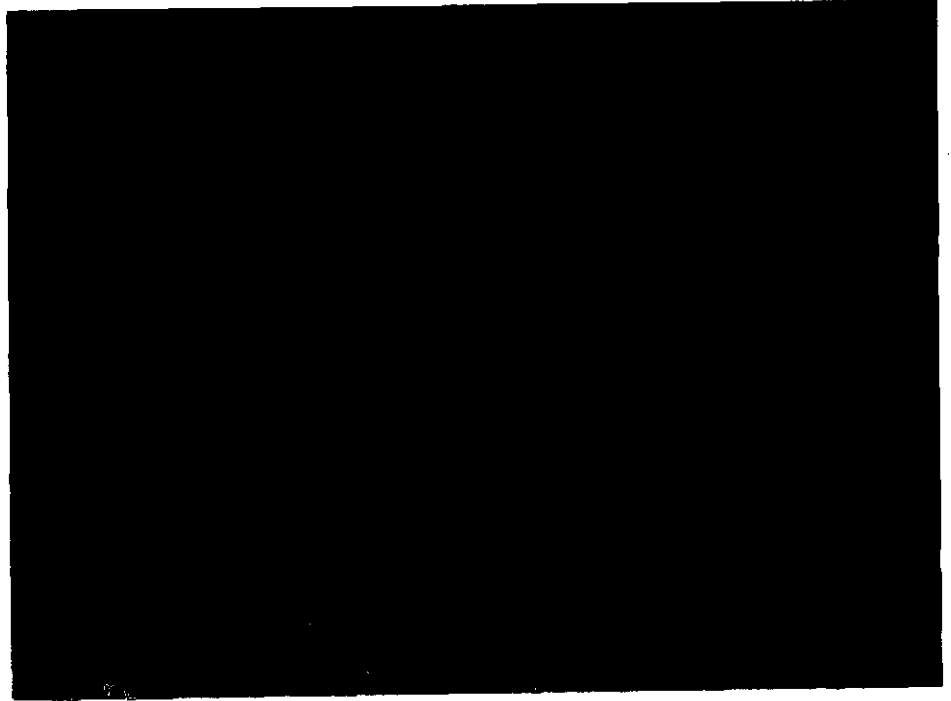
ŞEKİL (5 c) : B örneğinin içerdiği aflatoksin B<sub>1</sub>'in Benzen-Asetonitril (80:20) çözücü sisteminde U.V. lambasında 366 nm de verdiği lekeler görülmektedir (Renkli olarak).



ŞEKİL (6 a) : C örneğinde saptanan aflatoksin B<sub>1</sub>'in silikajel G adsorban kullanarak hazırlanan (20x20 cm) lik plakların, benzen-asetonitril (80:20) çözücü sisteminde sürüklenmesi sonucu, U.V. lambası altında 366 nm de verdiği mavi floresans lekeler görülmektedir. Soldaki lekeler standart aflatoksin B<sub>1</sub>'e aittir. Sağdaki lekeler ise C örneğine aittir.



ŞEKİL (6 b) : C örneğinde saptanan aflatoksin B<sub>1</sub>'in Etilasetat-Su (50:50) oranda hazırlanan çözücü sistemde sürüklenmesi sonucu, U.V. lambası altında 366 nm de verdiği mavi floresans lekeler görülmektedir.



ŞEKİL (6 c) : C örneğinde saptanan aflatoksin B<sub>1</sub>'in, Benzen-asetonitril (80:20) çözücü sisteminde, sürüklenmesi sonucu, U.V. lambası altında 366 nm de verdiği lekeler görülmektedir (Renkli).

B. Yarı Nicel Tayin Yöntemi :

Mini kolon kromatografisi yöntemi ile yarı nicel olarak, un örneklerinde daha önce nitel olarak tayin ettiğimiz aflatoksin B<sub>1</sub> miktarını saptamaya çalıştık.

Uyguladığımız yarı nicel tayin yöntemi, iki bölüm içerir.

1. Ekstraksiyon
2. Minikolon Hazırlığı ve Kolondan Geçirme.

1. Ekstraksiyon :

50 g. örnek tartıldı, 500 ml'lik kapaklı erlene alındı. 250 ml Aseton+Su (85 + 15) çözelti karışımı üzerine ilave edildi. 30 dakika çalkatörde çalkalandı. Süzüldü ilk 90 ml'lik süzüntü alındı, içinde jel bulunan behere aktarıldı. Artık süzüntü su ile yıkayarak behere aktarıldı. 1-2 dakika kuvvetle çalkalandı. Süzüldü. Bulanıklık olursa süzme işlemi yinelenir. Süzüntü 500 ml'lik ayırma hunisine alındı. Süzüntü kadar distile su ve 50 ml kloroform ilave edilip 1-2 dakika ekstre edildi. Kloroform tabakası behere alındı, uçuruldu. Artık, 2 ml kloroform + aseton (9 + 1), çözücü karışımı yardımıyla ufak şişeye alındı. Aynı gün kullanıldı veya buzlukta saklandı.

a- Jel Hazırlığı

10 ml distile su, 10 ml % 15 lik  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  çözelti karışımına pH metrenin elektrotları daldırıldı. % 4 lük NaOH çözeltisi bir büret yardımıyla pH'yu 4.6 ya ayarlamak üzere damlatılarak ilave edildi (Yaklaşık olarak 16-18 ml % 4'lük NaOH çözeltisi ile pH 4.6 ya ayarlanabilmektedir.

Şayet pH 4.6 değerini aşarsa geri titrasyon yapılamaz. İşlem baştan tekrar edilir.

## 2. Mini Kolon Hazırlığı

3 mm iç çapı, 10 cm uzunluğunda cam kolonlar kullanıldı. Kolonun en altına gayet az cam pamuğu, filtre kağıdı yerleştirildi. Bunu takiben 5-7 mm yüksekliğinde kieselgur yerleştirildi. Sonra 5-9 mm, etüvde 2 saat 110°C de aktive edilmiş florisil ilave edildi. 2 cm yüksekliğinde silikajel (0.063-0.2 mm), 105°C de 1 saat etüvde aktive edildikten sonra koyuldu. Bunun üzerine etüvde 110°C de 2 saat aktive edilen Alüminyum oksit nötral 1.0-1.5 cm yüksekliğinde yerleştirildi. 1 ml daha önce hazırlanan örnek ekstraktından mini kolona aktarıldı. Sonra 1 ml, kloroform-aseton (9 + 1) oranda hazırlanmış karışım geçirildi. Kolondan musluk yardımıyla aktarıldı. Ve U.V. lambası altında aflatoksin B<sub>1</sub> 'in verdiği mavi floresans bandının yeri, 366 nm de gözlemlendi. A, B, C un örneklerine ait bu bantların yeri Şekil 7, 8, 9 da görülmektedir.

Şayet mavi floresans bandı, florisil katında ise 5 µg/kg dan daha fazla aflatoksin B<sub>1</sub> vardır. Floresans bandı silikajel-florisil arasında ise 20 µg/kg'dan fazla, eğer floresans bandı florisilden silikajele iyice yayılmış ise 30 µg/kg dan fazladır. Bu yöntemle örnekte 5 µg/kg'a kadar aflatoksin B<sub>1</sub>, yarı nicel olarak saptanabilir (105,110).

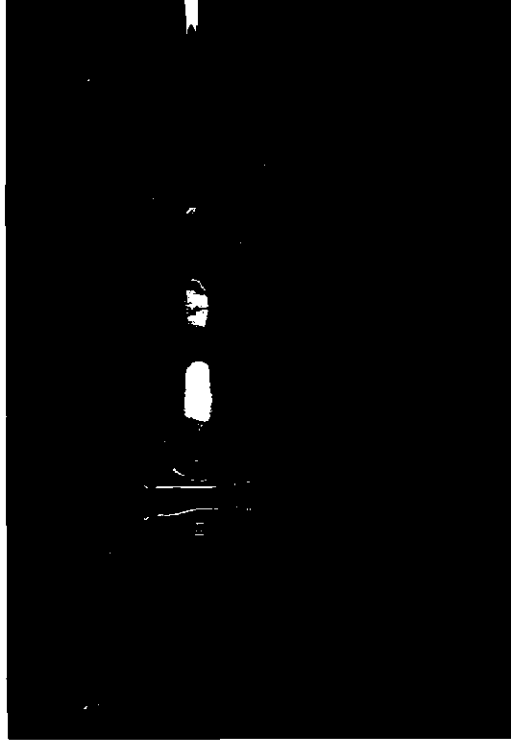
Aflatoksin B<sub>1</sub> saptanan örneklerimizden elde edilen temizlenmiş ekstraktlar flokonlar içinde buzlukta ve tatbik edilen ince tabaka plakları üzerinde, nem ve ısı sabit karanlıktaki dolapta saklanmıştır. U.V. lambası altında 366 nm de 3 ay süre ile yapılan gözlemede, mavi floresans'ın şiddetinin hiç bir azalma olmadı.



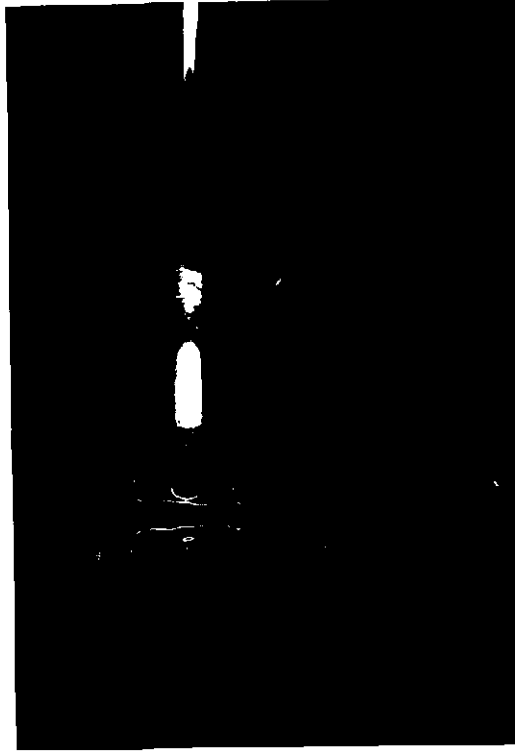
Yine aflatoksin B<sub>1</sub> saptanan örnekler, nem ve sıcaklığı oldukça değişmeyen, ışıktan uzak olarak, isole odada saklandı. Uygulanan yöntem ay-  
nen, her ay olmak üzere 3 ay süre ile yinelendi. Aflatoksin B<sub>1</sub> miktarında  
bir değişiklik gözlenemedi. Yöntem tekrarlanabilirdi, saptanan R<sub>f</sub> değer-  
lerinde sapma yoktu.



ŞEKİL-7 : A örneğinde yarı nicel saptanan aflatoksin B<sub>1</sub>'in mini kolon kromatografisinde oluşturduğu band ve yayılma durumu, U.V. lambası altında, 366 nm de verdiği floresans görülmektedir.



ŞEKİL-8 : B örneğinde yarı nicel saptanan aflatoksin B<sub>1</sub>'in mini kolon kromatografisinde, U.V. lambası altında, 366 nm de verdiği floresans, yayılma durumu görülmektedir.



ŞEKİL-9 : C örneğinde mini kolon kromatografisi ile yarı nicel saptanan aflatoksin B<sub>1</sub>'in U.V. lambası altında 366 nm de verdiği mavi floresans band görülmektedir.

Örneklerimizin içerdiği nem miktarı, yapılan ayrı ayrı nem tayinleriyle saptandı. Bunun için 2 gram tartılan un örneği, darası belli por-selen kapsüllerde 135°C deki etüvde 2 saat bekletildi. Desikatörde soğuduktan sonra tekrar tartımı alındı. Ve % olarak nem miktarları hesaplandı. Her örnek için işlem en az 3 defa tekrarlandı.

Tablo 2 de örneklerin ortalama % nem miktarları verilmiştir.

Örnek No.	Ortalama % nem miktarı	Örnek No.	Ortalama % nem miktarı
1	% 9.18	21	% 8.79
2	% 9.055	22	% 9.48
3	% 8.78	23	% 11.98
4	% 9.01	24	% 10.01
5	% 10.05	25	% 8.29
6	% 8.93	26	% 12.12
7	% 8.81	27	% 11.28
8	% 11.21	28	% 8.27
9	% 8.98	29	% 10.88
10	% 9.90	30	% 11.09
11	% 8.21	31	% 13.56
12	% 12.12	32	% 12.48
13	% 11.98	33	% 8.77
14	% 10.18	34	% 11.41
15	% 11.78	35	% 9.56
16	% 9.62	36	% 10.81
17	% 9.12	37	% 11.07
18	% 11.56	38	% 12.41
19	% 10.48	39	% 12.11
20	% 8.01	40	% 8.61

Örnek No.	Ortalama % nem miktarı	Örnek No.	Ortalama % nem miktarı
41	% 8.02	68	% 8.11
42	% 11.01	69	% 9.25
43	% 12.13	70	% 9.50
44	% 9.61	71	% 11.48
45	% 9.20	72	% 10.78
46	% 8.93	73	% 8.33
47	% 9.62	74	% 8.49
48	% 11.08	75	% 9.34
49	% 10.15	76	% 10.40
50	% 12.03	77	% 10.01
51	% 13.10	78	% 8.98
52	% 9.05	79	% 9.07
53	% 9.17	80	% 8.16
54	% 9.28	81	% 8.22
55	% 8.17	82	% 9.13
56	% 12.69	83	% 10.10
57	% 8.00	84	% 9.09
58	% 8.41	85	% 9.17
59	% 9.16	86	% 9.42
60	% 8.81	87	% 10.51
61	% 8.01	88	% 9.22
62	% 9.19	89	% 9.68
63	% 9.28	90	% 10.00
64	% 11.03	91	% 11.73
65	% 10.35	92	% 9.68
66	% 10.03	93	% 9.19
67	% 11.53		

## B U L G U L A R

Gereç ve yöntem bölümünde anlatılan nitel ve yarı nicel tayin yöntemi, farklı yerlerde depolanmış 93 un örneğine uygulanmıştır.

Tayini yapılan 93 örneğin, 19 tanesi bakkal, 57 tanesi ev, 7 tanesi un fabrikası, 5 tanesi un ve kepek toptancısı, 3 tanesi değirmen, 2 tanesi pastaneden alınmıştır.

Bu örneklerden 3 tanesinde yarı nicel tayin yöntemi ile, B örneğinde 20 µg/kg dan fazla, A ve C örneğinde 30 µg/kg dan fazla aflatoksin B<sub>1</sub> saptanmıştır. Bir aylık aralarla yinelenen tayinlerde, aflatoksin B<sub>1</sub> miktarında belirgin bir değişme gözlenememiştir. Bu da aflatoksin B<sub>1</sub>'in dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Yine örneklerin ortalama % nem miktarları saptanmıştır. Türkiye'nin atmosfer nem ortalaması % 9 dur (119). Bizim örneklerimizde ise nem yüzde miktarı % 8.00 - 13.56 arasında değişmektedir. Bu ise depolama ve ambalajlamanın ne kadar kötü olduğunu göstermektedir. Tablo 2 de görüldüğü gibi en düşük nem % 8.00 en yüksek oran ise % 13.56 dir. Örneklerden 39 tanesinin nemi % 10 üstündedir. Aflatoksin B<sub>1</sub> saptanan 3 örneğin nem yüzde miktarı % 11'in üstündedir. A örneğinin ortalama nem miktarı % 11.98, B örneğinin ortalama nem miktarı % 12.12, C örneğinin ortalama nem miktarı % 11.28 dir.

## T A R T I Ş M A

Gıdalarda, aflatoksinlerin ayrımı, belirlenmesi, nicel tayini ile ilgili çok yöntem vardır. Bunlar içinde biyolojik yöntemler de sayılabilir. Özellikle aflatoksin B<sub>1</sub> 'in oldukça duyarlı olarak nicel tayinini yapmağa olanak sağlamada gerekli deney ortamının bulunmasındaki güçlük kullanımı kısıtlar.

Yumuşakça yumurtaları ile yapılan yöntem, 0.05 µg/ml aflatoksin B<sub>1</sub> 'e kadar duyarlıdır. Ancak çok düşük sıcaklık, bol deniz suyu gerektirmektedir. Yumuşakça yumurtası bulmakta çok güçtür (120).

Embriyone tavuk yumurtaları da aflatoksin B<sub>1</sub> 'e duyarlıdır. Ama ölüm oranı çok fazla olması nedeniyle kullanılım kısıtlıdır. Nicel tayin için civcivde görülen ödem, hemoraji, beyin gelişiminde gecikme ve gaga anomalisi gibi gözlenen belirtiler de aflatoksin B<sub>1</sub> 'e özgü değildir (121).

Doku kültürü yöntemi, 0.5-1 ppm aflatoksin B<sub>1</sub> miktarına kadar duyarlıdır. 5 ppm aflatoksin B<sub>1</sub> ile embriyonik akciğer hücrelerinde mitoz bölünmede belirgin olarak yavaşlamaktadır. Tavuk embriyon hücrelerinde, bu dozda aflatoksin B<sub>1</sub> ile temasdan 12 saat sonra ise nükleol hacim çok azalmakta ve nihayet nükleoller kaybolmaktadır (122).

Bazı bitkiler, aflatoksin B<sub>1</sub> 'e duyarlıdır. Örneğin *Lepidium stivum*

bitkisinde, 1-10 µg/ml aflatoksin B<sub>1</sub> ile albinizm görülmektedir (123).

Yukarıda kısaca değindiğimiz ve sonuçta aflatoksin B<sub>1</sub> 'in yarı nicel miktarı hakkında bizi aydınlatacak biyolojik yöntemler, deney materyeli bulma güçlüğü gözlenen belirtilerin, çok spesifik olmayışları, deney ortamı şartlarının sağlanmasındaki güçlükler nedeniyle pratik değildir.

Birçok araştırmacı, 4 ana aflatoksini ayırma belirleme yöntemi geliştirmeye yönelik çalışmalar yapmıştır. Hemen hemen tüm çalışmalarda ince tabaka kromatografisi yöntemi esas alınmıştır.

Kromatografik yöntemlerde, alüminyum oksit, Silikajel G-HR, Silikajel-HR, Silikajel H ve Silikajel G, polyamid gibi adsorbanlar kullanılmış ve en iyi sonuç, bu araştırmada kullanıldığı gibi silikajel G ile alınmıştır (71,72,74,75,78,79,81,95,96).

Çalışmamızda, adsorban kalınlığı sonuçlara etkili önemli bir etken olarak karşımızda çıkmıştır. En iyi sonuçlar, 0.3 mm adsorban kalınlığı olan plaklarla alınmıştır.

Bu araştırmada karşılaşılan en büyük güçlüklerden biri de standart madde temininde olmuştur. Çok toksik ve kanserojenik madde olması nedeniyle temini zor gerçekleşmiştir\*. Çalışmanın her basamağı aşırı titizlik, temizlik, dikkat gerektirmektedir. El ve gereçlerin yıkanması uzun süre ve önce sodyum hipoklorit çözeltisi ile yapılmıştır.

Literatürde geliştirilen çeşitli çözücü sistemleri kayıtlıdır. En çok kullanılanları, ter-butyl-alkol-formikasit-Su (10:1:25), kloroform-triklor etilen-n-amil alkol-formikasit (80:15:4:1), Metanol-kloroform

---

\* Dr. Frank, H.K.'a, aflatoksin B<sub>1</sub> standardı sağlamada yakın ilgilerini gördüğümüzden çok teşekkür ederiz.



(3:97), kloroform-metil isobutil keton (6:1) 'dur.

Bu çözücü sistemleri ile normal sürükleme zamanı 40-75 dakika olarak saptanmıştır (78,95,102).

Bizim araştırmamızda geliştirdiğimiz iki çözücü sisteminde ise, sürükleme zamanı 15-22 dakikadır. Ki yukardaki süre ile kıyaslanacak olursa, oldukça daha az bir zaman gerektirmektedir. Geliştirdiğimiz çözücü sistemlerimizle, yinelenen tayinlerinde  $R_f$  değerlerinin sapması çok az oluşu, mavi floresans leke sınırlarının bariz oluşu, tekrarlanabilirliği ile aflatoksin  $B_1$  saptanmasında uygun görünmektedir.

U.V. lambası altında 366 nm de mavi floresans veren aflatoksin  $B_1$  lekelerini literatürde kayıtlı olan 2,4-dinitrofenil hidrazin ve % 25 lik sülfürik asit belirteçleri püskürtmek suretiyle verdiği, sırasıyla mavi ve sarı renklerle kanıtladıktan başka, bir başka belirteç olan ve literatürde aflatoksin  $B_1$  'e uygulanış kaydı olmayan Potasyum demir-3-siyanür-demir-3-klorür ile de mavi renk vermesi ile kanıtladık.

Yarı nicel tayin yöntemi olarak son nokta usulü diye tariflenen yöntem çeşitli araştırmacılar tarafından uygulanmıştır (16). Ancak bu yöntemde ufak hacimli seyreltmeler hazırlanılışındaki kısıtlı standart madde kayıpları, az da olsa yapılabilecek kişisel hatalar olabileceğinden ve renk kıyaslaması göze dayandığından, daha uzun süre gerektirdiğinden güvenilir değildir.

Mini kolon kromatografisi ile yarı nicel tayin daha emin, daha çabuk uygulanabilir ve sonuç alınabilir bir yöntemdir. Bu çalışmada geliştirmeye çalıştığımız ekstraksiyon temizleme, belirleme ve yarı nicel tayin yöntemi, bütün yöntemlerin/<sup>bir</sup> yorumu ve standart madde miktarına, laboratuvar şart ve olanaklarımıza göre değişiklikler sonucu ortaya çıkmıştır (1,16, 84,86,92,104,105,110).

Üzerinde çalışılan un örneklerinde uyguladığımız yöntemle 3 örnekte Aflatoksin B<sub>1</sub> saptadık. Nem yüzde miktarı ile aflatoksin B<sub>1</sub> arasında olumlu bir ilişki vardır. Zira % 11 'in üstünde nem içeren örneklerde bu çok toksik metabolit bulunmuştur. Bulgularımızda da belirttiğimiz üzere örneklerimizdeki 20 ve 30 µg/kg üzerindeki aflatoksin B<sub>1</sub>, F.A.O., W.H.O. ve OMS gibi kuruluşların, dünya gıda açığına gözönüne alınarak hoşgörü içerisinde tanıdığı emniyet limiti olan 30 µg/kg'a aşmaktadır ve limite yakın değerlerdedir (124).

Araştırma sonucunda, kötü depolama koşullarında, çok toksik, kanserojenik aflatoksin B<sub>1</sub>, unlarda oluşabileceğini kanıtladık. Ayrıca yinelenen tayinlerimizde, uzun süre aflatoksin B<sub>1</sub> stabilitesini koruduğu anlaşılmıştır. Aflatoksinli unların ne şekilde olursa olsun tüketilmesi insan ve hayvan sağlığı için çok sakıncalıdır.

## Ö Z E T

Bu araştırmada un örneklerinin çok toksik ve kanserojenik etkisi olan aflatoksin B<sub>1</sub> içerip içermediği saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla şartlarımıza uygun, oldukça hızlı bir yöntem geliştirmeye çalışılmıştır. Nitel tayin yöntemi olarak ince tabaka kromatografisi, yarı nicel yöntem olarak mini kolon kromatografisi uygulanmıştır.

İncelenen un örneklerinin 3'nde söz konusu fungal metabolit F.A.O., W.H.O., OMS nin tanıdığı limitlere yakın ve onun üzerinde bulunmuştur.

## Ö N E R İ L E R

Mikotoksinler, özellikle aflatoksinler üzerinde çalışmalar son yıllarda yoğunlaşmıştır ama bu konuda henüz aydınlanmamış noktalar çoktur. Sorunun çözümü; öncelikle fungal enfeksiyonu önlemek gereklidir. Bu da üreticilerin ve hasat sonrası ürünü elde tutanların sorumluluğundadır. Şayet bitki hastaliksız olarak yetiştirilir, hasat dikkatli ve bilgili olarak gerçekleştirilirse, kurutma çabuk depolama ve nakliye de çok dikkatli bir şekilde sağlık koşullarına uygun yapılırsa, sorun kısmen de olsa halledilmiş olur.

Konu, önce diğer ülkelerde olduğu gibi, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, S.S.Y.Bakanlığı, Ticaret Bakanlığı işbirliği ile ülkemizde gıdalarda aflatoksin tolerans limitlerinin saptanması ile ele alınmalıdır.

Sonuç olarak, böylesine önemli bir konuya gösterilecek köklü, planlı, ciddi yaklaşımlar halk sağlığı ve ekonomimiz açısından faydalı olacaktır kanısındayım.

K A Y N A K L A R

1. Frank, H.K. (1966). "Aflatoxine in Lebensmitteln". Arch. für Lebensmittelhygiene., 17: 237-242.
2. Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., and Carnaghan, R.B.A., (1961). "Toxicity associated with certain samples of groundnuts". Nature, 192: 1095.
3. Diener, U.L., and Davis, N.D. (1966). "Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*". Phytopathol., 56: 1930.
4. Taber, R.A., and Schroeder, H.W. (1967). "Aflatoxin producing potential of isolates of the *Aspergillus flavus oryzae* group from peanuts". Appl. Microbiol., 15: 140.
5. Scott, P.M., Wallbeek, W., and Forgacs, J. (1967). "Formation aflatoxin by *Aspergillus ostianus*". Appl. Microbiol., 15: 945.
6. Wilson, B.J. (1968). "Investigation of reported aflatoxin production by fungi outside the *Aspergillus flavus* group". Appl. Microbiol., 16: 819.
7. Kulik, M.M., and Holaday, C.E. (1967). "Aflatoxin a metabolic product of several fungi". Myco. Appl., 30: 137-140.

8. Van Walbeek, W., Scott, P.M., and Thatcher, F.S. (1968). "Mycotoxins from food-borne". *Can. J. Microbiol.*, 14: 131-137.
9. Hodges, F.A., Zust, J.R., Smith, H.R., Nelson, A.A., Armbrrecht, B.H., and Campbell, A.D. (1964). "Mycotoxins : Aflatoxin isolated from *penicillium puberulum*". *Science*, 145: 1439.
10. Holker, J.S.E., and Underwood, J.G. (1964). "Synthesis of a Cylopentanocoumarin structurally related to aflatoxin B". *Chem. and Industry.*, 1865-1866.
11. Donkersloot, J.A., Hsieh, D.P.H., and Mateles, R.I. "Incorporation of precursors into Aflatoxin B<sub>1</sub>". *J. Amer. Chem. Soc.*, 90: 5020.
12. Campbell, Colin T., and Leonard Stoloff (1974). "Implication of mycotoxins for Human Health". *J. Agr. Food. Chem.*, 22: 1006-1013.
13. Köşker, Ö. (1974). "Gıda Maddelerinde Aflatoksin". Köy İşleri ve Kooperatifler Bakanlığına verilen rapor.
14. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü (1975). "Türkiye İstatistik Yıllığı". Ankara, Yayın No: 750, Sayfa: 165.
15. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı (1973). "III.Beşyıllık Kalkınma Planı", Ankara.
16. Atlı, A. (1977). "Buğday, Un, Ekmekte Aflatoksin Oluşumu ve stabilitesi.
17. Banes, D. (1966). "Foodtoxins of fungal origin". *Methodology and regulatory aspects. Food. Techn.*, 20: 755-756.
18. Carnaghan, R.B.A., Hartley, R.D., O'Kelly, J. (1963) "Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 200: 1101.

19. Butler, W.H. (1964). "Acute toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in rats".  
*J. Cancer*, 18: 756-762.
20. Butler, W.H. (1964). Acute liver injury in ducklings as result of aflatoxin poisoning. *J. Pathol. Bacteriol.*, 88: 189-196.
21. Wogan, G.N., and Newborne, P.M. (1964). "Characteristics of the bile duct hyperplastic response to aflatoxine in ducklings". *Federation Proc.*, 23: 200.
22. Tulpule, P.G., Madhavan, T.V., and Gopalan, C. (1964). "Effect of feeding aflatoxin in young monkeys. *Lancet*, 1: 962.
23. Lancaster, M.C., Jenkins, F.B., and Philip, J.Mol. (1961). "Toxicity associated with certain samples of groundnuts". *Nature*, 192: 1095-1096.
24. Barnes, J.M., and Butler, W.H. (1964). "Carcinogenic activity of aflatoxin to rats". *Nature*, 202: 1016.
25. Butler, W.H., and Barnes, J.M. (1964). "Toxic effects of groundnut meal containing aflatoxin to rats and guinea pigs". *Brit. J. Cancer*, 17: 699-710.
26. Salmon, W.D., and Goldblatt, L.A. (1963). "Occurrence of hepatomas in rats fed diets containing peanut meal as a major source of protein". *Cancer. Rec.*, 23: 571-575.
27. Schoental, R. (1961). "Liver changes and primary liver tumors in rats given toxic guinea pig diet". *Brit. J. Cancer*, 15: 818-815.
28. Ashley, L.M., Halver, J.E., and Wogan, G.N. (1964). "Hepatoma and aflatoxicosis in trout". *Federation. Proc.*, 23: 105.

29. Ashley, L.M., Halver, J.E., Gardner, W.K., Wogan, G.N. (1965).  
"Crystalline aflatoxins cause trout hepatoma". *Fed.Proc.*, 24: 627.
30. Dickens, F., and Jones, H.E. (1964). "The carcinogenic action of aflatoxin after its subcutaneous injection in the rat". *Brit. J. Cancer*, 17: 691-698.
31. Newberne, P.M. (1974). "Mycotoxins : Toxicity, Carcinogenicity, and the influence of various Nutritional Conditions". *Environ. Health Perspectives*, 9: 1-32.
32. Lewis, G., Markson, L.M., and Allcroft, R. (1967). "The effect of feeding toxic groundnut meal to sheep over a period of five years". *Vet. Rec.*, 80: 312.
33. Newberne, P.M., Russo, R., and Wogan, G.N. (1966). "Acute toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in the dog". *Pathol. Vet.*, 3: 331.
34. Bourgeois, C.H., Shank, R.C., Grosman, R.A., Johnsen, D.O., Wooding, W.L., Chandavimol., P. (1971). "Acute aflatoxin B<sub>1</sub> toxicity in the Macaque and its Similarities to Rey's Seyndrome". *Lab. Invest.*, 24: 206-215.
35. Bourgeois, C.H., L Lodyd, M.D., Dhira Comer, M.D., Hilary Evans, M.D., Nijom Keschamras, M.D., Robert Cotton, M.D., Richard Grossman, M.D., Thomas Smith, M.D. (1971). "Encephalopathy and Fatty Degeneration of the Viscera". *A.J.C.P.*, 56: 560-571.
36. Shank, R.C., Bourgeois, C.H., Keschamtas, N., and Chandavimol, P. (1971). "Aflatoxins in outopsy specimens from Thai children with an acute disease of unknown aetiology". *Food Cosmet. Toxicol.*, 9: 501.



37. Munro, I.C. (1976). "Naturally Occurring Toxicants in Foods and Their Significance". *Clin. Toxicology*, 9: 647-663.
38. Madhavan, T.V., Rao, K. (1967). "Tubular epithelial reflux in the kidney in aflatoxin poisoning". *J. Pathol. Bacteriol.*, 93: 329.
39. Wieder, R., Wogan, G.N., Shimkin, M.B. (1968). "Pulmonary Tumors in strain A Mice Given Injections of Aflatoxin B<sub>1</sub>". *J. Nat. Cancer Inst.*, 40: 1195.
40. Newberne, P.M., Rogers, A.E. (1972). "vit A liver and Colon Carcinoma in Rats Fed low levels of aflatoxin". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 22: 280.
41. Madhavan, T.V., Rao, S., and Tulpule, P.G. (1965). "Effect of dietary protein level on susceptibility of monkeys to aflatoxin liver injury Indian". *J. Med. Res.*, 53: 984.
42. Madhavan, T.V., and Gopalan, C. (1968). "Effect of dietary protein on carcinogenesis of aflatoxin". *Arch. Pathol.*, 85: 133.
43. Foy, H. (1966). "Hepatic injuries in riboflavin and pyridoxine deficient baboons-possible relations to aflatoxin induced hepatic cirrhosis and carcinomas in Africans. *Nature*, 212: 150.
44. Newberne, P.M., Harrington, D.H., and Wogan, G.N. (1966). "Effects of cirrhosis and other liver insults on induction of liver tumors by aflatoxin in rats". *Lab. Invest.*, 15: 962.
45. Rogers, A.E., and Newberne, P.M. (1969). "Aflatoxin B<sub>1</sub> carcinogenesis in lipotrope-deficient rats". *Cancer. Res.*, 29: 1965.
46. Rogers, A.E., and Newberne, P.M. (1971). "Nutrition and aflatoxin carcinogenesis". *Nature*, 229: 62.

47. Newberne, P.M., and Rogers, A.E. (1973). "Rat colon carcinomas associated with aflatoxin and marginal Vit A". *J. Natl. Cancer Inst.*, 50: 439.
48. Newberne, P.M., and Williams, G. (1969). "Inhibition of aflatoxin carcinogenesis by diethylstilboesterol in male rats". *Arch. Environ. Health.*, 19: 489.
49. Goodall, C.M., and Butler, W.H. (1969). "Aflatoxin carcinogenesis, Inhibition of liver cancer induction in hypophysectomized rats". *Int. J. Cancer*, 4: 422.
50. Newberne, P.M., Hunt, C.E., and Wogan, G. (1967). "Neoplasma in the rat associated with administration of uretan and aflatoxin". *J. Exptl. Molec. Pathol.*, 6: 285.
51. Reddy, J.K., and Svoboda, D. (1972). "Effect of lasiocarpine on aflatoxin B<sub>1</sub> carcinogenicity in the rat". *Arch. Pathol*, 93: 55.
52. Mc Lean, A.E., Marshall, A. (1971). "Reduced carcinogenic effects of aflatoxin in rats given phenobarbitone". *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 52: 322.
53. Sporn, M.B., Dingman, W., Phelps, H.L., Wogan, G.N. (1966). "Aflatoxin B<sub>1</sub> : Binding to DNA in vitro and alteration of RNA metabolism in vivo". *Science*, 151: 1539-1541.
54. Epstein, E., Steinberg, M.P., Nelson, A.I., and Wei, L.S. (1970). "Aflatoxin production as affected by environmental conditions". *J. Food. Science*, 35: 389-392.
55. Shank, R.C., and Wogan, G.N. (1965). "Distribution and excretion of C<sup>14</sup>-labeled aflatoxin in the rat". *Fed. Proc.*, 24: 827.

56. Falk, H.L., Thompson, S.J., and Kotin, P. (1965). "Metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> in the rat". *Am. Assoc. Cancer Res. Proc.*, 6: 18.
57. Campbell, T.C. (1970). "Aflatoxin M<sub>1</sub> in human urin". *Nature*, 227: 403.
58. Grice, H.C., Moodie, C.A., Smith, D.C. (1973). "The carcinogenic potential of aflatoxin pre-and post partum". *Cancer Res.*, 33: 262.
59. Aso, O.T., Buchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Emily, L.W., and Wogan, G.N. (1963). "The structures of aflatoxin B and G". *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 1705.
60. Aso, T., Buchi, G., Wogan, G.N. (1965). "The structures of aflatoxin B and G". *J. Amer. Chem. Soc.*, 87: 882-886.
61. Chang, S.B., Abdel-Kader, M.M, Emily, L.W., and Wogan, G.N. (1963). "Aflatoxin B<sub>2</sub> : Chemical identy and biological activity". *Science*, 142: 1191.
62. *The Merck Index* (1976). Ninth Edition. Sayfa 25.
63. Pettit, R.E., Ruth, A.T., Horry, W.S., and Arthur, L.H. (1971). "Influence of fungucide and irrigation on aflatoxin in peanute befor dipping". *Appl. Mic.*, 22: 629-634.
64. Aşkın, O. (1976). "İncirlerde aflatoxin oluşumu üzerine çalışmalar".
65. Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W., and Goulden, M. (1973). "Incidence of aflatoxin in southern corn". *Cereal Science to day*, 18: 192-195.
66. Jarvis, B. (1971). "Factors affecting the production of mycotoxins". *App. Bac.*, 34: 199-213.

67. Abdalla, M.H., Eltayer, N.M. (1976). "Studies on the interaction between *Sclerotium botaticola* and *Aspergillus flavus*". *Phytopathology*, 67: 922-924.
68. Bullerman, L.B. (1974). "Inhibition of aflatoxin production by cinnamon". *J. Food Science*, 39: 1163-1165.
69. Jerumali, M., and Lafont, P. (1972). "Changes in Aflatoxin B<sub>1</sub> during bead making". *Cahier. Nut. Dietetiqué*, 7: 319-322.
70. Baur, F.J., Armstrong, J.C. (1971). "Collaborative study of a modified method for the determination of aflatoxins in copra, coprameal, and coconuts". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 54: 874-878.
71. Broadbent, J.H., Cornelius, J.A., Shane, G. (1963). "The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groundnut materials, Part. II. Thin-layer chromatographic method". *Analyst.*, 88: 214-216.
72. Campbell, A.D., Funkhouser, J.T. (1966). "Collaborative study on the analysis of aflatoxins in peanut butter". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 49: 730-739.
73. Coomes, T.J., and Sanders, J.C. (1963). "The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts, and groundnut materials. *Analyst.*, 88: 209-213.
74. Coomes, T.J., Crowther, P.C., Francis, B.J., and Shone, G. (1964). "The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groundnut materials". *Analyst.*, 89: 437.
75. Cucullu, A.F., Lee, S.L., Pons, W.A., Goldblatt, L.A. (1970). "Deter-

mination of aflatoxins in peanut, and cottonseed soapstocks".

J. Am. Oil Chem. Soc., 47: 226-228.

76. De Jongh, H., Van Pelt, C.G., Ord, W.O., Barrett, G.B. (1964).  
"Asemi-quantitativ determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in groundnut meal,  
groundnuts, and peanut butter". Vet. Rec., 76: 901-803.
77. Engebrecht, R.H., Ayres, J.L., and Sinnbueher, R.O. (1965). "Isolation  
and determination of aflatoxins B<sub>1</sub> catton seed meals". J. Assoc.  
Off. Chem. Soc., 48: 815-818.
78. Enstrom, G.W. (1969). "New solvent systems for thin-Layer chromato-  
graphy of aflatoxins". J. Chromatog., 44: 128-132.
79. Eppley, R.M. (1966). "Note on a developer for thin-layer chromatography  
of aflatoxins". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 49: 473.
80. Eppley, R.M. (1966). "A Versatile procedure for assay and preparatory  
seperation of aflatoxins from peanut products". J. Assoc. Off.  
Anal. Chem., 49: 1218-1223.
81. Friedlander, A., and Gonen, M. (1970). "Use of polyamide thin-layer  
chromatography for detection of aflatoxin". Israel J. Chem., 8: 87.
82. Genest, C., and Smith, D.M. (1964). "A note on the detection of afla-  
toxins in peanut butter". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 46: 817-818.
83. Heusinkveld, M.R., Shera, C.C., and Baur, F.J. (1965). "Note on afla-  
toxin analysis in peanuts, peanut meals, and peanut products".  
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 48: 448.
84. Lee, W.V. (1965). "Quantitative determination of aflatoxin in ground-  
nut products". Analyst., 90: 305-307.

85. Levi, C.P. (1969). "Collaborative study on a method for detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in green coffee beans". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 52: 1300-1303.
86. Masri, M.S. (1970). "Extraction partition and column chromatographic separation of aflatoxin B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub>". *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 47: 61-64.
87. Mayura, K., and Sreenivasamurthy, V. (1969). "Quantitative method for the estimation of aflatoxins in peanuts and peanut products". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 52: 77-81.
88. Nabrey, J., and Nesbitt, B.F. (1964). "Determination of aflatoxins". *Nature*, 203: 862.
89. Nesheim, S., Banes, D., Stoloff, L., and Campbell, A.D. (1964). "Note on aflatoxin analysis in peanuts and peanut products". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 47: 586.
90. Nesheim, S. (1969). "Conditions and techniques for thin layer chromatography of aflatoxins". *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 46: 335-338.
91. Pons, W.A., and Goldblatt, L.A. (1965). "The determination of aflatoxin in cottonseed products". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42: 471-475.
92. Pons, W.A., Cucullu, A.F., Lee, L.S., Robertson, J.A., Franz, A.O., Goldblatt, L.A. (1966). "Determination of aflatoxins in agricultural products. Use of aqueous acetone for extraction". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 49: 554-562.
93. Pons, W.A. (1969). "Collaborative study on the determination of aflatoxins in cottonseed products". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 52:61-72.

94. Rayner, E.T., and Dollear, F.G. (1968). "Removal of aflatoxins from oilseed meals by extraction with aqueous isopropanol". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45: 622-624.
95. Reddy, T.V., Viswanathan, V.L., Venkatasbramanian, T.A. (1970). "Thin-Layer chromatography of aflatoxins". *Anal. Biochem.*, 38: 568-570.
96. Reiss, J. (1970). "Dünnschicht chromatographische Trennung von Aflatoxinen auf Kieselgel-Fertigplatten". *J. Chromatog.*, 49: 301.
97. Robertson, J.A., Lee, L.S., Cucullu, A.F., and Goldblatt, L.A. (1965). "Assay of aflatoxin in peanuts and peanut products using acetone-hexane-water for extraction". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42: 467-471.
98. Schuller, P.L., Verhulsdank, A.H., and Paulsch, W.E. (1970). "Bestimmung von Aflatoxin B<sub>1</sub> durch Zweidimensionale Dünnsicht-Chromatographie mit Fluorodensitometrischer Auswertung". *Arzneimittel-Forsch.*, 20: 1517-1520.
99. Scott, P.M., Lawrence, J.W., Van Walbeek, W. (1970). "Detection of mycotoxins by thinlayer chromatography. Application to screening of fungal extracts". *Appl. Microbiol.*, 20: 839-842.
100. Scott, P.M. (1968). "Note on analysis of aflatoxins in green coffee". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 51: 609.
101. Scott, P.M. (1969). "Analysis of cocoa beans for aflatoxins". *J. Assoc. Anal. Chem.*, 52: 71-74.
102. Steyn, P.S. (1969). "The separation and detection of several mycotoxins by thin-layer chromatography". *J. Chromatog.*, 45: 473-475.

103. Strezleck, S., and Kogan, L. (1966). "Note on thin-layer chromatography of aflatoxin". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 49: 33.
104. Teng, J.I., and Hanzas, P.C. (1969). "Note on a new developer for thinlayer chromatography of aflatoxins on silicagel plates". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 52: 83-84.
105. Velasco, J. (1970). "Determination of aflatoxin in cottonseed by ferric hydroxide gel cleanup". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53: 611-616.
106. Wiley, M. (1966). "Note on the analysis for aflatoxins". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 49: 1223-1224.
107. Frank, H.K. (1968). "Versuche mit toxischen Schimmelpilzen auf Obsterzeugnissen". *Lebensmittel-Technol.*, 1: 14-17.
108. Crisman, E.V. (1968). "2,4-dinitrophenylhydrazine spray for the identification of aflatoxin B<sub>1</sub> on thin-layer chromatograms". *Contrib. Boyce. Thom. Inst.*, 24: 37-38.
109. Odette, L., Shotwell, C.W., Hesseltine, H.R., Burmeister, Kwolek, W.F., Shannon, G.M. and Hall, H.H. (1969). "Survey of Cereal Grains and Soybeans for the Presence of aflatoxin : 1. Wheat Grain Sorghum, and oats". *Cereal. Chem.*, 46: 446-454.
110. Hortwitz, W. (1975). "Natural Poisons". *Assoc. Off. Anal. Chem.*, 26: 462-479.
111. Pons, W.A., Jones, A., Robertson, and Goldblatt, L.A. (1966). "Objective Fluorometric Measurements of Aflatoxins on TLC Plates". *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 43: 665-669.



112. Ayres, J.L., and Sinnhuber, R.O. (1966). "Fluorodensitometry of aflatoxin on thin-layer plates". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 43: 423-424.
113. Childs, E.A., Ayres, J.C., Koehler, P.E. (1970). "Fluorometric measurements of aflatoxin". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 47: 461-462.
114. Pons, W.A. (1968). "Fluorodensitometric measurements of aflatoxins on TLC plates". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 51: 913-914.
115. Pons, W.A., Cucullu, A.F., Franz, A.O. (1968). "Improved objective fluorodensitometric determination of aflatoxins in cottonseed products". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45: 494-499.
116. Garner, R.C. (1975). "Aflatoxin separation by high-pressure liquid chromatography". *J. Chromatog.*, 103: 187.
117. Kingston, D.G.I., Chen, P.N., and Verselotti, J.R. (1976). "Aflatoxin separation by HPLC". *J. Chromatog.*, 118.
118. Stahl, Egon (1969). "Thin-layer Chromatography. 2 nd. Sayfa 871, 876.
119. Tekeli, S.T. (1964). "Hububat Teknolojisi". Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını. No: 228, Sayfa 72.
120. Townsley, P.M., and Lee, E.G.H. (1967). "Response of fertilized eggs of the mollusk *Bankia setacea* to aflatoxin". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 50: 361.
121. Gabliks, J., Schaffer, W., Friedmann, L., and Wogan, G.N. (1965). "Effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on cell cultures". *J. Bacteriol.*, 90: 720.
122. Legator, M.S., and Withrow, A. (1964). "Effect on mitotic cell division in cultured embryonic lung cells. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 47:1007.

123. Schoental, R., and White, A.F. (1965). "Aflatoxins and albinism in plants". *Nature*, 205: 57.
124. Org. Mond. Santé (OMS). (1968). "Les aspects microbiologiques de L'hygiène des denrées alimentaires". Sér. Rapp-tech. Genève. No: 399, Sayfa 68.