

## SÜT VE SÜT MAMÜLLERİNDE AFLATOXİNE M<sub>1</sub> ve B<sub>1</sub> ARANMASI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Mehmet Aziz Demirer\*

### Research on the Determination of Aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in Liquid Milk and Dairy Products

**Summary:** A method is described that is suitable for the analysis of aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in liquid milk and dairy products. Liquid milk, cheese, powder milk, butter, yogurt, buttermilk were treated with various levels of aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> and these were recovered by chloroform extraction. A cellulose aqueous methanol partition column was used to purify the chloroform extract, when necessary for samples requiring further purification. The aflatoxin levels were quantitatively measured by visual comparison with aflatoxin standards on TLC plates. Concentrations of aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in liquid milk 0.1 ppb, in cheese, butter, powder milk, yogurt and butter milk as to sample 0.5-1 ppb could be detected with this method.

The study showed that the method was simpler, shorter and more economic than the other methods and reliable.

On our milk and milk products were studied by this method and so extracts of 334 samples were tested and no toxicity was found in any.

**Özet:** Muhtelif aflatoksin araştırma metodlarını mukayeseli olarak inceleyerek süt ve süt mamülleri için uygun bir metod geliştirmeye çalıştık. Süt, peynir, süttozu tereyağ, yoğurt ve ayranı muhtelif seviyelerde aflatoksin M<sub>1</sub> ve B<sub>1</sub> ile muamele ederek, bu toksinleri kloroform ekstraksiyonu ile tekrar geri aldık. İlave bir temizleme ihtiyacı gösteren numuneleri sellüloz bir kolondan geçirerek temizledik. Aflatoksin seviyelerini, ince tabaka kromatografisi plaklarında, aflatoksin standartları ile göz vasıtasıyla mukayese ederek miktarı olarak ölçtük. Bu metodla sütte litrede 0,1 mikrogram, diğerlerinde numuneye göre 0,5-1 mikrogram aflatoksin M<sub>1</sub> ve B<sub>1</sub> i tesbit edebildik.

Çalışmalarımız metodun diğer metodlardan daha basit, daha kısa ve daha ekonomik ve aynı zamanda onlar kadar hassas olduğunu gösterdi.

Süt mamüllerimiz üzerinde bu metodla araştırma yaparak muhtelif tür süt ve süt mamülünü analizledik. Teste tâbi tuttuğumuz 334 numunenin hiç birinde tesbit edilebilir sınırlar içerisinde aflatoksine rastlamadık.

\* A. Ü. Veteriner Fakültesi Besin Kontrolü ve Hijyen Kürsüsü Doçenti

## Giriş

Son 10-12 senenin aktüel ve önemli bir konusu haline gelen aflatoksinlerin, en kıymetli gıdalarımız olan süt ve süt mamüllerindeki durumunu tesbit etmenin gerekli ve faydalı olacağı kanisiyle bu konu üzerine eğilmiş bulunuyoruz.

Diğer taraftan aflatoksin araştırma metodlarının çok pahalı olması, fazla zaman ve emek istemesi, bizi daha ekonomik ve daha az zaman isteyen ve aynı zamanda yeteri kadar hassas olan bir metodu geliştirme çabası içerisine itti. Bu nedenlerle bu araştırmayı yapmış bulunmaktayız.

1960 yılında İngiltere'de 100.000 kadar hindi palazının ölmesiyle derinleştirilen araştırmaların sonucu olarak aflatoksinler ilim düzeyine çıkarılmışlardır. Daha sonraları Allcroft ve Carnaghan<sup>1,2</sup> in araştırmalarıyla da aflatoksin B<sub>1</sub> ihtiva eden yemleri yiyen süt hayvanlarının, sütleriyle aflatoksin M<sub>1</sub> çıkardıkları anlaşılmıştır.

Allcroft ve arkadaşları<sup>1,2,3</sup>, süt hayvanı tarafından alınan aflatoksin B<sub>1</sub> miktarı ile inek sütünde ekskrete edilen aflatoksin M<sub>1</sub> arasında doğru orantılı bir münasebet bulunduğunu, kullandıkları metodlarla sütte idantifiye edilebilir aflatoksin B<sub>1</sub> in günlük en az alınma miktarının 0,6-0,9 mg olabileceğini, toksinli sütü Flash ve Kolder metodlarına göre pastörize etmenin zehirliliği ehemmiyetli nisbette azaltmadığını, toksinin yalnız peynir mayasıyla presipite olmuş fraksiyonda mevcut olduğunu, kendi süt ve mamüllerinde yaptıkları araştırmalar sonunda bunlarda tesbit edilebilir miktarda toksin bulunmadığını, sütün muhtelif çiftliklerden temin edilmesinin, tek çiftlik sütünde her hangi bir toksin mevcut olsa da onun zararsız seviyede sulanmasını sağladığını bildirmişlerdir. Diğer bir araştırmalarında ise, süt tozlarından ekstre ettikleri ekstraktlarla 1 günlük ördek palazlarında yaptıkları yedirme denemelerinde, ekstraktların öldürücü olduğunu görmüşlerdir<sup>4</sup>. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmalarında ise koyunda aflatoksin metabolizmasını tetkik etmişlerdir<sup>5</sup>.

Jacquet ve arkadaşları tek tek ineklerden yahut az karışım olması için aynı rejime tâbi tutulmuş ineklerin kapsadığı ayrı ayrı çiftliklerden temin ettikleri 156 süt numunesinin 80 inde M<sub>1</sub>, 5 inde B aflatoksinlerini temsil edebilir flöresan lekelerle rastladıklarını, miktarlarının zayıf olduğunu, litrede birkaç mikrogram, âzamı 23 mikrogram kadar bulunduğunu, üç defa aynı sütte B ve M aflatoksinlerine birlikte rastladıklarını, pastörize sütlerde 36 numunenin zayıf olmakla beraber 14 ünün pozitif olduğunu, 150 den daha fazla peynir numunesi

üzerindeki araştırmalarına rağmen bunlarda aflatoksinlerin en az izini dahi bulmadıklarını, *Aspergillus*'ların peynirde çoğalma konusunun çok nadir olduğunu, sahanın evvelâ *Penicillium*'lara ondan sonra da *Mucor*'lara ait bulunduğunu, sterilize sütlerde, süt tozlarında, kremlerde, tereyağlarda da yine hiç bir ize dahi rastlamadıklarını bildiriyorlar<sup>2,4,25,26</sup>.

Kiermeier<sup>29</sup>, bilhassa süt ineklerinde fazla süt elde etmek için verim rasyonu olarak verilecek yemler, yüksek miktarda aflatoksin ihtiva ettiği takdirde, bu ineklerin sütlerinde aflatoksin M<sub>1</sub> müşahade edildiğini, ayrıca ocak ayından mart ayına kadar süre içerisinde küflü silaj yemlerin ve otların da aflatoksin mevcudiyetinden sorumlu olduklarının görüldüğünü, böyle yemler kullanılmakla her ne kadar sütün litresinde aflatoksin miktarı 0,25 mikrogramı aşıyorsa da, henüz sütte bulunmasından sakınmak gayesiyle mümkün olabilen bütün tedbirlerin alınması için alarm verecek derecede olmadıklarını bildiriyor.

Bunlara benzer çalışmaların daha bir çok araştırıcı tarafından yürütülmüş olduklarını görmekteyiz<sup>6,17,22,31,33</sup>. Diğer taraftan Purchase<sup>40,42</sup> aflatoksin B<sub>1</sub> ile albino ratlarda 80 hafta sonunda hepatomların geliştiğini, aflatoksin M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub>'nin 1 günlük ördek palazlarında B<sub>1</sub> inki gibi öldürücü olduğunu ve aynı acut zehirlenme semptomlarını, otopsi bulgularını ve histopatolojik bozuklukları meydana getirdiğini bildirmiştir.

Aflatoksinler ve araştırma metodları üzerinde de bir çok neşriyata rastlamaktayız<sup>8,13,14,15,16,20,21,27,30,32,44,51</sup>. Bir kısım araştırmalarda aflatoksinlerin ince tabaka kromatografilerinin nasıl yapılaçağını<sup>34,49</sup>, bazıları flöresansın fluorodensitometrik olarak nasıl ölçüleceğini<sup>10,11,12</sup>, bir kısmı rastlanan aflatoksin spotlarının nasıl doğrulanacağını<sup>7,28,35,36,37,47</sup>, bir kısmı da aflatoksin standardlarının nasıl hazırlanacağını ve korunacağını bildirmişlerdir<sup>43,46</sup>.

### Materyal ve Metod

Materyal olarak cetvel 1 de dökümü verilen 150 süt, 102 peynir, 24 süttozu, 22 tereyağ, 21 yoğurt, 15 ayran olmak üzere toplam olarak 334 numune üzerinde çalıştık.

Muayene için, mikserde ekstraksiyon, ince tabaka ve kolon kromatografisi olarak aşağıda açıklamasını yaptığımız şekilde özel metodumuzu kullandık.

## CETVEL I.

Analizlenen numuneler (Samples)

	Süt (Milk)			Peynir (cheese)				Süttozu (powder milk)	Tereyağ (butter)	Yoğurt (Yogurt)	Ayran Butter- milk)
	Tek tek ineklerden (From individual cow)	Fabrika. frommilk (proc- essing plant)	çarşıdan (From Market)	Beyaz peynir (White Cheese)	Tulum peyniri (Tulum Cheese)	Kaşar peyniri (Kaşar Cheese)	eritme peyniri (melting Cheese)				
1972 Yaz Sezonu Summer	—	—	30	8	—	—	2	3	5	4	3
Sonbahar Autumn	10	—	20	6	3	3	3	15a	4	4	2
1973 Kış Sezonu Winter	1	—	20	8	3	3	3	2	4	5	2
İlkbahar Spring	1	—	20	10b 10c	20d	3	3	2	4	3	3
Yaz sezonu Summer	1	7	40	8	—	3	3	2	5	5	5
Toplam Total	13	7	130	50	26	12	14	24	22	21	15
	150			102				24	22	21	15
334											

- a: Amerikan yardımı süt tozları (aid american).  
b: Diyarbakırdan getirilen otlu peynirler. From Diyarbakır.  
c: Konyadan getirilen küflü peynirler. From Konya.  
d: Erzincandan getirilen tulum peynirleri. From Erzincan.

*Metodlar için gerekli reaktif, malzeme ve aletler :*

1- Solventler: Metanol, Kloroform, Hekzan (68-69 °C), susuz di etil eter (alkol % 0,01 den az), Benzen, Acetonitrile, Aseton, 2-Propanol, Butanol, asetik asid (glasial), acetic anhydride, Piridin, Konsantre hidroklorik asid. (ACS saflık derecesinde ve renkli cam şişede).

2- Sodyum klorür (ACS saflık derecesinde ve cam şişede).

3- Sodyum klorür solüsyonu (% 5): Saf sodyum klorürü bidistile suda eriterek hazırladık.

4- Sodyum sulfat (ACS saflık derecesinde ve susuz).

5- Sodyum sulfat solüsyonu (doymuş): 300 g saf ve susuz sodyum sulfatı balon jojeye koyduk, bidistile su ilâve edip çalkalayarak litreye tamamladık ve üzerinden kullandık.

6- Kurşun asetat (ACS saflık derecesinde, nötr ve 2 sulu).

7- Kurşun asetat solüsyonu (% 40): Litrelik balon jodede 400 g kurşun asetatı bidistile su ile erittik, 3 ml glasial asetik asid ilâve edip su ile litreye tamamladık.

8- Aflatoksin M<sub>1</sub> standard solüsyonu: Aflatoksin M<sub>1</sub>'i R.D. Stubblefield'ten temin ettik. AOAC<sup>9</sup>'un tavsiye ettiği gibi ml de 0,5 mikrogram M<sub>1</sub> olacak şekilde kloroformda hazırladık. Buharlaşmayı asgariye indirmek için ufak bir renkli şişeye koyup ağzını sıkı olarak kapattuktan sonra, zemininde kloroform emdirilmiş pamuk bulunan renkli bir kavanoza yerleştirdik. Kavanozun ağzını iyice kapayarak onu da ışıktan korumak için kapaklı tahta bir kutuya koyduk. Kutuyu da -18 °C lik dipfirizde muhafaza ettik.

9- Aflatoksin B<sub>1</sub> standard solüsyonu: Aflatoksin B<sub>1</sub>'i A.D. Campbell'den temin ettik. Bunun içindeki aflatoksin B<sub>1</sub> konsantrasyonunu AOAC<sup>9</sup> da tarif edilen metod ile, spektrofotometre vasıtasıyla tayin ettik. Yine AOAC<sup>9</sup> un tavsiye ettiği gibi ml de 0,5 mikrogram B<sub>1</sub> olacak şekilde benzene-acetonitrile (98:2) ile sulandırarak standard damlatma solüsyonumuzu hazırladık. Ufak bir renkli şişeye koyup, zemininde benzene-acetonitrile emdirilmiş pamuk bulunan renkli bir kavanoza yerleştirdikten sonra, onu da ışıktan korumak için kapaklı bir tahta kutuya koyarak 0 °C de muhafaza ettik.

10- Filtre kâğıdı (Whatman No.1 yahut Carl Schleicher and Schull 2043 a.)

11- Numune şişeleri: Numune şişelerini özel olarak yaptırdık. Bunların dipleri sivri olup 8 ml kapasiteli ve ayaklı (Foto. 5).

12- İnternasyonal santrifüj ve 100 ml lik uzun tip santrifüj tüpleri.

13- Mikser. Yüksek devirli ve patlamaya karşı mücehhez.

14- Azot bombası, sıcak su banyosu (termostatlı ve elektrikli) ve su trompu sistemi (Foto. 4).

15- İnce tabaka kromatografisi takımı (Desega marka) (yayıcı, cam plaklar 20 x 20 x 0,4 cm, yayma çerçevesi, şablon, plak taşıyıcısı, plak muhafaza desikatörü, plak muhafaza kutusu ve developman tankı.)

16- Mikrometrik şırınga takımı (Agla marka, 0,2 mikrolitre tatbik edebilir hassasiyette.)

17- Uzun dalga ultraviyole lambası.

18- Silica-Gel-G Merck (ince tabaka kromatografisi için).

19- Hot plate (elektrikli ve termostatlı).

20- Kolon kromatografisi kolonları (500 mm. uzunlukta, 22 mm. iç çapında, camdan ve musluklu).

21- Sellüloz (toz). Sellülozu 2 saat sıcak kloroformla ıslattık, sonra süzüp kloroformla yıkıyarak havada kuruttuk.

22- Saç kurutma makinası

23- Elektrikli fırın (50-250 °C de çalışır).

24- Pipet doldurucusu (pipet filler).

25- Santrifüj terazisi ve adi terazi.

26- Ayırma hunileri (250-500 ml lik), beherglaslar (100 ml lik), huniler (7 cm çapında), erlenmeyerler (250 ml lik), pipetler (1, 2, 10, 25, 50 ml lik), mikro pipetler (100 mikrolitrelik), silindirler (100 ml lik).

*Numunenin ekstraksiyonu* : Numuneyi iyice homojenize ettikten sonra cetvel II de yazılı miktar kadar alıp mikserin kavanozuna koyduk (Foto. 1) Gerekli olanlarda ilâve su miktarı kadar bidistile su ilâve ettikten sonra yine cetveldeki miktarlar kadar metanol, hekzan ve 1 g tuz koyduk. Mikseri yüksek devirle 2 dakika çalıştırdıktan sonra durdurarak 3 ml kurşun asetat solüsyonu ilâve edip alçak devirle 1 dakika çalıştırdık. Tekrar durdurup 3 ml doymuş sodyum sulfat solüsyonu ilâve edip 1 dakika daha alçak devirle karıştırdıktan sonra karışımı hemen 100 ml lik iki santrifüj tüpüne, santrifüj terazisinde taksim ederek koyduk. Tüpleri 5 dakika, 2000 devirle santrifüje ettik. Karışımı

CETVEL II.

Süt ve Mamüllerinin ekstraksiyonu için müracaat cetveli

Süt ve Mamülleri. (Milk product).	Numune Miktarı (Sample Volume or Weight)	İlave su (Water Added Befor ext.) ml.	Methanol ml	Hexane ml	NaCl g	Kurşun asetat solüsyonu. (Lead- acetate solution) ml	Doymuş Sodyum Sulfat Solüsyonu. (Sodium sulfate sol. sat'd. ml.)	Temsil ettiği miktar (son eks- trakta) Sample equivalent in final extract.
Süt (milk)	50 ml	—	60	50	1	3	3	25 ml
Yoğurt (Yogurt)	50 g	3 ml	60	50	1	3	3	25 g
Ayran (Butter-mik).	50 ml	—	57	50	1	3	3	25 ml
Tereyağ (Butter)	10 g	42 g	60	60	1	3	3	5 g
Süttozu (powder milk)	10 g	44 g	60	60	1	3	3	5 g
Beyaz peynir (White cheese)	10 g	38 g	60	60	1	3	3	5 g
Diğer peynirler (other cheese)	10 g	41 g	60	60	1	3	3	5 g

Not: İlave su = 44-numuneden gelen su. (Water added = 44-water sample.)

böylece tüpün en altında tortu, onun üzerinde aflatoksinlerin bulunduğu su-metanol fazı, onun üzerinde hafif katı maddelerin teşkil ettiği katı bir tabaka, en üstte de hekzan tabakası bulunacak şekilde fazlara ayırdık (Foto. 2). En üstteki hekzan fazını pipetle tamamen alarak bertaraf ettik. 50 ml lik bir pipetle, üst pıhtıyı aralayarak metanol su fazından alıp, 100 lük ölçü silindirine süzgeç kâğıtından 55 ml süzdük. Bu 55 ml süzüntü, almış olduğumuz numunenin yarısını temsil etmekte olup, bunu 250 ml lik ayırma hunisine aktardık. Silindiri 5 ml tuzlu su ile çalkalayarak onu da ayırma hunisine ilâve ettik. Temiz bir silindirle 30 ml kloroform alıp bununla yukardaki silindiri 3 defa çalkalayarak ayırma hunisine aktardık. Yıkadığımız silindiri ayırma hunisinin altına koyduk. Metanol su fazında bulunan aflatoksinleri kloroformla ekstre etmek için ayırma hunisini 1 dakika müddetle kuvvetle çalkalayıp birkaç dakika istirahatete terkettik. Fazlar ayrılınca aflatoksinlerin geçmiş bulunduğu alttaki kloroform fazını silindire akıttık. Ayırma hunisine tekrar 30 ml kloroform koyarak yine 1 dakika çalkalayıp, istirahatten sonra ayrılan kloroform fazını evvelkinin üzerine akıtarak birleştirdik. İçerisinde artık aflatoksin kalmayan ayırma hunisindeki metanol-su fazını, huninin ağzından dökerek bertaraf ettik. Silindirdeki kloroform ekstresini tekrar ayırma hunisine aktardık. Silindiri 50 ml tuzlu su ile yıkayarak ayırma hunisine ilâve ettik. Kloroform ekstresini tuzlu su ile yıkamak için 1 dakika müddetle ayırma hunisini şiddetle çalkalayıp birkaç dakika istirahatete terkettik. Diğer taraftan 250 ml lik bir erlenmeyer alıp üzerine 7 cm lik bir huni koyduk. Huninin içerisine süzgeç kâğıtı yerleştirip, kâğıtın içine de 20 g anhidr sodyum sulfat koyduk. Bunu ayırma hunisinin altına yerleştirerek, tuzlu su ile yıkanmış ve alt fazı teşkil eden kloroform ekstresini damla damla erlenmeyere süzdük (Foto. 3). Sodyum sulfatı, süzgeç kâğıdını ve huniyi 3 er ml kloroform porsiyonlarıyla 3 defa yıkadıktan sonra, kloroform ekstresinin toplandığı erlenmeyeri alarak su banyosuna yerleştirdik (Foto. 4). Su trompu ile temin edilen vakum ve azot bombasından gelen azot akımı altında 2-3 ml kalıncaya kadar buharlaştırdık. Erlenmeyeri sistemden ayırmayarak su banyosundan çıkardık ve azot gazı altında soğumasını temin ettik. Soğuma nihayetinde erlenmeyerde 0,5-1 ml kadar kloroform ekstresi kalabilecek şekilde buharlaşmayı ayarladık. Erlenmeyerdeki konsantre kloroform ekstresini numune şişesine aktardık (Foto. 5). Erlenmeyeri 1 er ml lik kloroform porsiyonlarıyla 4 defa yıkayarak yine numune şişesine dikkatlice aktardık. Numune şişesindeki ekstreyi vakum ve azot gazı altında su banyosunda kuruyuncaya kadar buharlaştırdık. Sisteme bağlı olmak şartı ile banyodan çıkararak azot gazı altında soğuttuk. Süt,



yoğurt ve ayran numunelerinde, böylece ince tabaka kromatografisi yapacak duruma getirmiş olduk. Diğer cins numunelerde gerektiği takdirde (bilhassa küflü numunelerde) ekstrenin ikinci bir temizleme ameliyesi için kolon kromatografisine tâbi tuttuk.

*Ekstraktların pürifikasyonu için kolon kromatografisi:*

Kolon kromatografisini, önemli derecede daha temiz ekstraktlar elde etmek ve M<sub>1</sub> ile B<sub>1</sub> aflatoksinlerinin çok daha aşağı seviyelerinin tesbiti için yaptık. Metod olarak A.D. Campbell vasıtasıyla W.A. Pons'tan privileged communication olarak 7 nisan 1972 tarihinde temin etmiş olduğumuz Pons ve arkadaşlarına ait metodun<sup>38,39</sup> kolon kromatografisi ile ilgili bölümünü kullandık. 1973 yaz sezonunda R.D. Stubblefield ve G.M. Shannon'un süt ve mamüllerinde aflatoksin M<sub>1</sub> tesbiti için bu metodu ve M<sub>1</sub> in konfirmasyonu (doğrulanması) hususunda Stack ve arkadaşlarının<sup>47</sup> metodunu konu alan, AOAC için yürüttükleri ve bizim de bizzat iştirak ettiğimiz milletler arası kollaratif bir çalışmada, bu metodun tümü tetkike tâbi tutulmuştur.

Bu metoda göre kolon kromatografisini şöyle yaptık: Evvela kromatografi kolonunu hazırladık. Bunun için kolonu alıp alt kısmına cam pamuğundan bir yastık yerleştirdik. Cam bagelele uygun darbelerle sertleştirdik. Metanol: su (70+30) dan takriben 70 ml içinde 10 g sellüloz tozunu bulamaç yaparak kolonun içine döktük. Sulu metanolla kolonun duvarlarını yıkadık. Sellülozun üstündeki metanol aktıktan sonra 100 ml kadar hekzan ilâve ettik. Kolondan takriben yarısının akması için bekledik ve kolonun üstüne de ufak bir cam pamuk yastığı yerleştirdik. Sellülozu sıkılaştırmak ve kanallaşmayı önlemek için yavaş hafif darbelerle kolonu kompaktlaştırdık. Hekzanın akmasını bekledik. Sonra yukarıda elde etmiş olduğumuz kuru numune ekstraktına 1 ml kloroform koyarak erittik ve üzerine 2 ml benzen ile 10 ml hekzan ilâve ettik. Bu numune ekstraktını yukarıda hazırlamış olduğumuz kolona aktardık. Numune erlenmeyerini 2 şer ml hekzan: benzen (3+1) porsiyonlarıyla 3 defa yıkayarak onları da kolona ilâve ettik. Numune solüsyonu üst cam pamuğu yastığına eriştiği zaman, kolonu birinci defa 150 ml hekzan: benzen (3+1) ile yıkadık. Bu solüsyon üst cam pamuğuna eriştiği zaman bu defa 150 ml hekzan: eter (2+1) ilâve ederek kolonu ikinci defa yıkadık. Bu da aktıktan sonra bu solüsyonları bertaraf ettik. Kolonun altına temiz bir 250 ml erlenmeyer koyup, aflatoksin M<sub>1</sub> i ve eğer mevcutsa aflatoksin B<sub>1</sub> i elüe etmek için 200 ml hekzan: kloroform (1+1) i kolona döktük. Bu solvent tamamen akıp kolondan akma durduğu zaman, erlenmeyeri alarak, vakum ve azot gazı altında su banyosunda yukarıda tarif ettiğimiz gibi kon-

santre ederek, numune şişesine geçirip onu da buharlaştırarak ince tabaka kromatografisi için hazır bir duruma getirdik.

*İnce tabaka kromatografisi:* Numunede aflatoksin M<sub>1</sub> ve B<sub>1</sub> in varlığının ve miktarının tesbiti için ince tabaka kromatografisini kullandık. Gerek doğrudan doğruya ve gerekse kolon kromatografisi ile elde edip numune şişelerine geçirdiğimiz numune ekstraktlarını özel ince tabaka kromatografisi metodumuzla tetkike tâbi tuttuk.

*İnce tabaka plaklarının hazırlanması:* Silica-Gel-G den 25 g alıp 50 ml bidistile su ile sulandırıp, usulüne göre 0,250 mm kalınlığında 20x 20 cm lik cam plaklara yaydık. Havada kuruttuktan sonra 105 °C de 2 saat aktive edip kendi desikatöründe muhafaza ettik.

Muayene yapacağımız zaman bu plaklardan alıp her iki kenarını 2 mm mesafeden ince, sivri ve sert bir kalemle çizdik. Bu kenarlar üzerinde alt kenardan 3 cm ve 13 cm mesafeleri işaretledik. 13 cm işaretleri birleştirerek solventin front sınırını tesbit ettik. Alt kenara 3 cm mesafede hayali bir hat üzerinde 14 mm aralıklarla numuneleri ve standartları tatbik ettik. Front çizgisinin üst tarafındaki bölgede de kayıtları yaptık.

*Birinci ince tabaka kromatografisi:* Bu muayeneyi, numunede aflatoksin olup olmadığının kontrolü için yaptık. Numune şişesindeki kuru ekstreye 100 mikrolitre kloroform koyup, tıpasını kapayarak 20 saniye dikkatlice ve iyice çalkaladık. Hemen Agla mikrometrik şırıngasına çekerek, hot plate üzerinde 50 °C ısınmış olan plağın alt kenarından 3 cm üstündeki hayali hattımız boyunca baştan başlayarak 3 noktaya 20 şer mikrolitre tatbik ettik (Foto. 6). İnternal standard olarak birinci nokta üzerine 6 mikrolitre aflatoksin M<sub>1</sub> standard solüsyonu, ikinci nokta üzerine de 6 mikrolitre aflatoksin B<sub>1</sub> standard solüsyonu ilave ettik. İkinci numuneyi de aynı şekilde tatbik ettikten sonra, eksternal standard olarak plağa, aflatoksin M<sub>1</sub> ve B<sub>1</sub> standard solüsyonlarından 1 er noktaya 6 şar mikrolitre koyduk. Ondan sonra, 3. ve 4. numuneleri de ilk numuneler gibi plağa tatbik ettik. Gerek numunelerin ve gerekse standartların orijin spotlarının küçük olması için, mikrometrik şırınga ile 2 şer mikrolitrelik porsiyonlar halinde tatbik noktasına damlattık.

Plağı kısa bir müddet soğuttuktan sonra, numunelerde kalabilecek eseri yağ vesair yabancı maddelerin bertaraf edilmesi için, evvela kromatografi tankına 100 ml dietil eter koyarak plağı yerleştirip developpe ettik. Çıkarıp açık havada ve karanlıkta kuruttuktan sonra bu defa temiz tanka developman solventi olarak kloroform: metanol (97:3 v/v) den 100 ml koyup , plağı yerleştirerek tekrar developpe et-

tik. Aynı şekilde kuruttuktan sonra uzun dalga ultraviyole ışık altında muayene ettik. Aflatoksin tesbit ettiğimiz numunelerde, aflatoksin miktarını tayin için ikinci bir ince tabaka kromatografisi yaptık.

*Miktari ince tabaka kromatografisi*: Aflatoksin tesbit edilen yahut recovery deneyi için içerisine aflatoksin koyduğumuz numunelerde bu muayeneyi yaptık. Numunenin tekrar ekstresini hazırlayıp, ilk muayenedeki tahmine göre gerekli sulandırmasını yaptıktan sonra, plağa 2 noktaya 20 şer mikrolitre tatbik ettik. İnternal standard olarak 1. nokta üzerine numunede hangi aflatoksin bulunuyorsa onun standard solüsyonundan 6 mikrolitre ilave ettik. Eksternal standard olarak, yine aynı aflatoksinin standard solüsyonundan plağa sıra ile 2, 4, 6, 8, 10 mikrolitre miktarlarında 5 noktaya koyduk. Yukarıdaki gibi develope ettikten sonra ultraviyole ışık altında muayene ettik. Numunede gördüğümüz flöresan spotun (lekenin), aflatoksin standard solüsyonunun spotlarının hangisiyle eşit flöresans kesafetinde olduğunu mukayese ettik. Numune spotunun flöresansı ile eşit olan standard solüsyonun flöresans spotunun tekabül ettiği tatbik noktasına koyduğumuz aflatoksin miktarından ve numune spotuna tekabül eden noktaya koyduğumuz 20 mikrolitre numune ekstraktından hareket ederek, numunedeki aflatoksin miktarını hesap ettik.

M<sub>1</sub> ve B<sub>1</sub> aflatoksinleri ile aynı R<sub>f</sub> değerli herhangi bir flöresan spotun hakikaten aflatoksin olup olmadığını, yani sonucun doğrulanması için, çeşitli doğrulama (teyit, confirmation) testleri uyguladık (19, 25, 47). Ayrıca muhtelif solvent sistemleriyle kontroller yaptık. Esas kullandığımız solvent sisteminden başka, kloroform:aseton 90:10 v/v, metanol:su 60:40 v/v, kloroform:aseton:2-propanol 85:10:5 v/v/v, butanol:asetik asit:su 4:2:1 v/v/v, benzol:etanol % 95:su 46:35:19 v/v/v gibi solvent sistemlerinden istifade ettik.

Diğer taraftan metod kontrolü için, önceden muayene edip herhangi bir aflatoksin bulunmayan numunelerin cetvel II de ki miktarlarına 50, 100, 200 ng seviyelerinde aflatoksin M<sub>1</sub> ve B<sub>1</sub> ilave ederek sayısız recovery deneyleri yaptık. Mesela 50 ng M<sub>1</sub> lik deney için mikser kavanozuna koyduğumuz numuneye 100 mikrolitre aflatoksin M<sub>1</sub> standard solüsyonundan ilave ederek ekstre ettik. Plağa 2,4, 8, 12, 16, 20 mikrolitre numune ekstraktından ve 1,2,4,6,8,10 mikrolitre standard M<sub>1</sub> solüsyonundan ve aynı şekilde işlenmiş toksinsiz numune ekstresinden 20 mikrolitre tatbik ettik. Develope ettikten sonra okuduk. Aflatoksin B<sub>1</sub> için de aynı işlemleri uyguladık.

Ayrıca, Roberts ve Allcroft (45), Jacobson et al. (23), Purchase ve Steyn (41), Stubblefield et al. (48,50), Pons et al. (38,39) ve AOAC (9) tarafından bildirilen metodları ele alarak sayısız metod mukayesesi denemeleri yürüttük.

Işığa hassas olan bu aflatoksinlerin parçalanmalarını önlemek için çalışmalarımızı karartılmış laboratuvarda zayıf ve sarı bir ışık altında çeker ocak içinde yaptık.

Kullandığımız malzemeyi yıkamaya vermeden evvel detoksifikasyonu için Fischbach ve Campbell (18) in tavsiye ettikleri gibi evvela kısa bir müddet % 5 sodyum hipokloritli su içerisinde tuttuk ve sonra yıkanmaya gönderdik. Böylece gerekli olan korunma tedbirlerini aldık.

### Sonuçlar

Mukayeseli metod çalışmaları sonucu süt ve süt mamüllerinde aflatoksin  $M_1$  ve  $B_1$  araştırması için özel bir metod geliştirdik. Bu metodumuzu uygulayarak muayene ettiğimiz 334 numunenin hiç birinde gerek aflatoksin  $M_1$ 'e ve gerekse aflatoksin  $B_1$ 'e rastlamadık. Bazı peynir numunelerinde  $R_f$  0,22-0,28 arasında ve bazılarında  $R_f$  0,40-0,50 arasında mavi flöresans veren spotlara tesadüf ettik. Bunlar %20 sülfürik asit ile muamele neticesi koyu parlak sarı bir renk veriyor ve bu renk sonradan normal ışıktaki dahi gözle görülebiliyordu. Halbuki aflatoksin  $M_1$  ve  $B_1$  de böyle bir durum olmuyordu. Bunların sülfürik asitle muamelelerinde mavi-viyole olan flöresansları açık kanarya sarısına dönüşüyor ve bu renk ultraviyole lambası kalktıktan sonra artık görülmüyordu.

Yine bazı numunelerde 0,12-0,22  $R_f$  değerleri arasında mavi flöresans veren maddelere rastladık. Bunlar ise % 20 sülfürik asitle muamele edilince mavi renklerini kaybediyorlardı.

Bazı tulum peynirlerinde ise 0,20-0,25  $R_f$  değerleri arasında bir takım mavi lekeler rastladık. Bunlar da % 20 sülfürik asitle muamele edilince daha da parlak mavi renk alıyorlardı.

Ayrıca, bu gibi aflatoksin şüpheli numuneleri diğer solvent sistemleriyle kontrole tâbi tuttuğumuzda böyle flöresan lekeler aflatoksin  $M_1$  ve  $B_1$  den değişik  $R_f$  değerleri veriyorlardı.

Diğer taraftan, Stack et al. (47) in aflatoksin  $M_1$ 'in doğrulanması için tarif ettikleri metodu  $M_1$  den şüpheli bu gibi numunelere uyguladığımızda da, aflatoksin  $M_1$  in vermiş olduğu  $R_f$  değerlerini ver-

mıyor ve bazıları da değişik reaksiyonlar gösteriyorlardı. Durum aflatoksin B<sub>1</sub> için de aynı idi. Böylece bütün doğrulama reaksiyonlarının menfi sonuçlar vermesi, bu yalancı spotların M<sub>1</sub> ve B<sub>1</sub> olmadığı hakkındaki kanılarımızı doğruluyordu.

Metodumuzun hassasiyetini tesbit için, evvela muayene edip her hangi bir aflatoksin bulunmayan süt, peynir, tereyağ, süttozu, yoğurt ve ayran numunelerine aflatoksin ilave ederek yaptığımız sayısız recovery tecrübelerinde çok iyi sonuçlar elde ettik.

Mesela mikser kavanozuna koyduğumuz 50 ml.sütün üzerine, 100 mikrolitre aflatoksin M<sub>1</sub> standardından (50 ng) ilave edip analizledikten sonra plağı ultraviyole ışık altında tetkik ettiğimizde, 2 mikrolitrelik süt numunesi ekstresinde bile recovery'yi aynen standard'ta kendisine tekabül eden 1 mikrolitrelik spottaki kadar tesbit ettik. Yani 0,5 ng standard M<sub>1</sub>'i gözle tesbit edebildiğimiz gibi, 2 mikrolitrelik recovery'li spotta da aynı kesafette flöresan lekeyi gördük. Numunenin 4 mikrolitresinde 1 ng aflatoksin M<sub>1</sub> olduğuna göre, numunede 0,5 ng M<sub>1</sub>'i tesbit etmemizden hareketle, 100 mikrolitre ekstrakt 25 ml süte, 2 mikrolitre ekstrakt 0,5 ml süte tekabül ettiğinden, 0,5 ml sütte 0,5 ng M<sub>1</sub>, 1 litre sütte 1 mikrogram M<sub>1</sub> bulunduğu anlaşılır. Biz esas metotta numune ekstraktını plağa 2 mikrolitre değil 20 mikrolitre tatbik ettiğimizden, metodumuzla süt numunesinin litresinde 0,1 mikrogram aflatoksin M<sub>1</sub>'i tesbit edebildiğimiz sonucu elde edilir.

Aynı şekilde diğer tür numunelerle yaptığımız recovery deneyleri sonucunda, kolon kromatografisi kullanmaksızın Peynir, tereyağ, yoğurt ve süttozunun kilogramında, ayranın litresinde 2 mikrogram aflatoksin M<sub>1</sub>'i rahat bir şekilde tesbit ettik. Kolon kromatografisi kullandığımız takdirde ise numunenin kilogram ve litresinde numunenin çeşidine göre 0,5-1 mikrogram M<sub>1</sub>'i tesbit edebildik.

Aflatoksin B<sub>1</sub> için yaptığımız recovery deneylerinde de durum hemen hemen aynı idi.

Bu recovery tecrübelerinde, ilave ettiğimiz aflatoksini umumiyetle % 100 olarak tekrar geri aldık.

Bütün recovery deneylerini, aflatoksin ilave etmediğimiz aynı numunenin ekstresinden 20 mikrolitre tatbik etmek suretiyle kontrollü olarak yürüttük.

Kullandığımız ince tabaka şartlarında, yani silica-gel-G, Merck ten 0,250 mm. lik plakların 105 °C de 2 saat aktive edilmesinden sonra, 22-25 °C lik laboratuvar hararetinde, Desaga tankında, kloroform:

metanol (97: 3) ile yaptığımız kromatografilerde aflatoksin  $M_1$  0,20-0,25, aflatoksin  $B_1$  ise 0,50-0,55  $R_f$  değerlerini verdiler.

### Tartışma

Süt hayvanlarının, yedikleri toksik yem içerisinde aldıkları aflatoksin  $B_1$  miktarı ile orantılı olarak sütleriyle aflatoksin  $M_1$  ekskrete ettikleri bir çok araştırmacı tarafından bildirilen ilmi bir gerçek olduğuna göre, bu gibi sütlerin diğer toksinsiz sütlerle sulanması sonucu, sütle ekskrete edilen aflatoksinlerin son derece seyredikleri anlaşılmaktadır. Nitekim dünya literatüründe, milli süt ve ürünlerinde aflatoksinlerin tehlike yaratacak kadar fazla bir miktarda rastlandığına dair hiç bir araştırmaya rastlayamadık. Sadece Jacquet et al., tek tek ineklerden aldıkları 156 süt numunesinde 80 defa  $M$  ve 5 defa  $B$  aflatoksinlerine rastladıklarını ve bunların miktarlarının zayıf olduğunu, litrede birkaç mikrogram, azami 23 mikrogram kadar, buna mukabil peynir, tereyağ, süttozu ve kremada hiç bir ize rastladıklarını bildiriyorlar (24, 25, 26),

Allcroft ve Carnaghan (1, 2), kendi milli süt ve süt mamüllerinde tesbit edilebilir miktarda toksin bulunmadığını, sütün muhtelif çiftliklerden temin edilmesinin, tek çiftlik sütünde herhangi bir toksin mevcut olsa da onun zararsız seviyede sulanmasını sağladığını kaydediyorlar.

Kiermeier 29, bilhassa süt ineklerinde fazla mahsul elde etmek için verim rasyonu olarak verilecek yemler, yüksek miktarda aflatoksin ihtiva ettiği takdirde, bu ineklerin sütlerinde aflatoksin  $M_1$  müşahade edildiğini, böyle yemler kullanılmakla her ne kadar sütün litresindeki aflatoksin  $M_1$  miktarı 0,25 mikrogramı aşılırsa da, henüz sütte bulunmasından sakınmak gayesiyle mümkün olabilen bütün tedbirlerin alınması için alarm verecek derecede olmadıklarını bildiriyor.

Bizim de, süt ve süt mahsüllerimiz üzerindeki bu araştırmamızın sonucunda hiç bir numunede aflatoksine rastlamamız nedeniyle edindiğimiz kanaat, bu mahsüllerimizde tesbit edilebilir oranlarda aflatoksin bulunmadığı ve olabilecek bir kaç vak'anın da diğer sütlerle sulanma sonucu konsantrasyonunun düştüğü merkezindedir. Hayvanlara her mevsim değişik yemler verilmesi nedeniyle araştırmalarımızı dört mevsimde temin ettiğimiz numuneler üzerinde yapıp, ayrıca iklimin ve teknolojinin rolünü tesbit etmek için, memleketimizin Erzincan, Diyarbakır ve Konya gibi muhtelif yerlerinden

yeteri kadar numune temin ederek analizlememizin nedeni bu noktaların da aydınlanmasını temin içindi.

Muayenelerden aldığımız sonuçların, süt ve süt mamüllerimiz için çok sevindirici ve sağlığımız yönünden de son derece memnun edici olduğu kanısındayız.

Roberts ve Allcroft<sup>43</sup>, Jacobson et al.<sup>23</sup>, Purchase ve Steyn<sup>41</sup>, Stubblefield et al.<sup>48, 50</sup>, Pons et al.<sup>35, 39</sup> ve AOAC<sup>9</sup> tarafından bildirilen metodları ele alarak yaptığımız mukayeseli metod araştırmaları sonucunda, bu metodların hassas olmakla beraber çok fazla solvent, reaktif ve zaman istedikleri kanısına vardık. Bu metodlardan da istifade edip, geliştirerek sunmuş olduğumuz metodumuzla 1 günde 4 numunenin işlenmesi imkân dahiline girdiği gibi, metodun memleket şartlarına uygun olduğu, diğer metodlara oranla çok daha az solvent, reaktif ve zaman gerektirdiği ve aynı zamanda yeteri kadar hassas olduğu kanısındayız. Metod, sütün litresinde 0,1 mikrogram aflatoksinin tesbit edebilecek hassasiyete sahip bulunmaktadır. Bu demektir ki milyarda 0,1 kısım aflatoksinin tesbit edebilmektedir. Kolon kromatografisi ile ilave bir pürifikasyon da yapılacak olduğu takdirde bu hassasiyet daha da artmaktadır. İnce tabaka plağına 20 mikrolitre ekstrakt tatbik etmekle, 5 ml süt, 5 ml ayran, 5 g yoğurt, 1 g peynir, 1 g yağ, 1 g süttozu tatbik ediyoruz demektir. Sütün litresinde 0,1 mikrogram aflatoksin M<sub>1</sub> olduğu takdirde, plağa 5 ml süt ekstraktına tekabül eden 20 mikrolitre ekstrakt tatbik etmekle 0,5 ng aflatoksin M<sub>1</sub>'i tatbik etmiş oluyoruz ki bu miktar, aflatoksin M<sub>1</sub>'in gözle tayin sınırının üstündedir.

Sütün litresine ilave ettiğimiz 1 mikrogram aflatoksinin hemen tamama yakın bir seviyede tekrar geri alabilmekte yani recovery edebilmekte olmamız da metodun hassasiyetini ve sağlamlığını göstermektedir.

Diğer taraftan, çok küflü peynir vs gibi numunelerde kolon kromatografisi kullanarak ilave bir saflaştırma yapmak zaruretini olduğu kanısına vardık. Zira aflatoksinleri diğer yabancı flöresan maddeler örtetek görünmemelerine ve teşhis edilememelerine sebebiyet vermektedirler. Nitekim, plağa tatbik esnasında numune ekstresinin konduğu noktalardan biri üzerine internal standard olarak ilave ettiğimiz 3 ng aflatoksin M<sub>1</sub>'i bile, kolondan geçirmediğimiz böyle çok küflü bir peynir numunesinde, developmandan sonra, yabancı flöresan maddelerin fazlalığı ve aflatoksin M<sub>1</sub>'i örtmesi nedeniyle teşhis edemedik. Bu bakımdan küflü numunelerin mutlaka sellüloz kolondan geçirilerek saflaştırılması gerekmektedir. Kolon kromatografisinin fazla

solvent ve zaman istemesi nedeniyle küfsüz normal numunelerde sarfinazar edilebileceği kanısındayız.

### Teşekkür

Aflatoksin ve literatür temini hususunda yardımlarından dolayı A. D. Campbell ve R. D. Stubblefield'e teşekkür ederiz.

### Literatür

- 1- **Allcroft, R., Carnaghan, R. B. A.** (1962): *Groundnut Toxicity. Aspergillus flavus toxin (aflatoxin) in Animal Products.* Preliminary Communication. Vet. Rec. 74, 863-864.
- 2- **Allcroft, R., Carnaghan, R. B. A.** (1963): *Groundnut Toxicity. An Examination for Toxin in Human Food Products from Animals Fed Toxic Groundnut Meal.* Vet. Rec. 75, 259-263.
- 3- **Allcroft, R., et al.** (1966): *Metabolism of Aflatoxin in Sheep. Excretion of the Milk Toxin.* Nature 209, 154-155.
- 4- **Allcroft, R., et al.** (1967): *Work in Progress. Aflatoxin in Milk.* Food Cosmet. Toxicol. 5, 597
- 5- **Allcroft, R., Roberts, B. A.** (1968) *Toxic Groundnut Meal. The Relationship between Aflatoxin B<sub>1</sub> Intake by Cows and Excretion of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milk.* Vet. Rec. 82, 116-118.
- 6- **Allcroft, R., et al.** (1968): *Excretion of Aflatoxin in a Lactating Cow.* Food Cosmet. Toxicol. 6, 619-625.
- 7- **Andrellos, P. J., Reid, G. R.** (1964): *Decomposition (chemical indexes) Confirmatory Tests for Aflatoxin B<sub>1</sub>.* J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 47, 801-803.
- 8- **Anon** (1973): *Method for the Determination of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Fluid Milk and Milk Powder. Changes in Methods.* J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 56, 485 Sec. 26. CO9-26. C. 14.
- 9- **AOAC** (1970): *"Natural Poisons. Mycotoxins. Aflatoxins. "426-438"* As quoted" Official Methods of the Association of Official Agricultural Chemists. 11 th Edi. Washington.
- 10- **Ayres, J. L., Sinnhuber, R. O.** (1966): *Fluorodensitometry of Aflatoxin on Thin-Layer Plates.* J. Am. Oil Chemists'Soc. 43, 423-424.



- 11- **Beckwith, A. C., Stoloff, L.** (1968): *Fluorodensitometric Measurement of Aflatoxin Thin Layer Chromatograms*. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 51, 602-608.
- 12- **Beljaars, P. R., Fabry, F. H. M.** (1972): *Quantitative Fluorodensitometric Measurements of Aflatoxin B<sub>1</sub> with a Flying-Spot Densitometer. I. Fluorodensitometric Study of the Behavior of Aflatoxin B<sub>1</sub> Standard Spots on Different Types of Silica Gel*. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 55, 775-780.
- 13- **Boutibonnes, P., et al.** (1969): *Chromatographie Rapide en Couche Mince des Flavatoxines Contenues dans les Aliments*. Bull. Acad. Vét. 42, 825-833.
- 14- **Campbell, A. D.** (1967): *Mycotoxins*. Report on Mycotoxins. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 50, 343-346.
- 15- **Campbell, A. D.** (1967): *Natural Food Poisons*. FDA Papers.
- 16- **Campbell, A. D.** (1971-1973): *Communications personnelles*.
- 17- **Fehr, P. M., et al.** (1968): *Effet de la Consommation de Tourteau d'Arachide pollué par Aspergillus flavus chez le Ruminant en Lactation*. Le Lait 48, 477, 377-392.
- 18- **Fischbach, H., Campbell, A. D.** (1965): *Aflatoxins. Note on Detoxification of the Aflatoxins*. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 48, 28.
- 19- **Frank, H. K., Eyrich, W.** (1968): *Über den Nachweis von Aflatoxinen und das Vorkommen Aflatoxin-vortäuschender Substanzen in Lebensmitteln*. Z. Lebensmittel-Untersuch. u. Forsch. 138, 1-11.
- 20- **Goldblatt, L. A.** (1972): *Aflatoxin scientific background, control, and implications*. Second Ed., Academic Press, New York and London, 1-472.
- 21- **Holzappel, C. W., et al.** (1966): *Isolation and Structure of Aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>*. Tetrahedron letters 25, 2799-2803.
- 22- **Longh, H., et al.** (1964): *Milk of Mammals Fed an Aflatoxin-Containing Diet* Nature 202, 466-467.
- 23- **Jacobson, W. C., et al.** (1971): *Determination of Aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in Milk*. J. Dairy Science 54, 21-24.
- 24- **Jacquet, J., et al.** (1970): *Sur la Présence des Flavatoxines dans les Aliments d'Origine Animale Destinés à l'Homme*. Bull. Acad. Vét. 43, 35-43.
- 25- **Jacquet, J., et al.** (1971): *Recherche des Flavacoumarines par Chromatographie en Couche Mince*. Importance de la Discrimination des Autres Taches Fluorescentes. Bull. Acad. Vét. 44, 263-275.

- 26- **Jacquet, J.** (1973): *Les Aflatoxines ou Flavacoumarines et leur Propriétés. Cas du Lait et des Produits Laitiers. Technique Laitière* 28, 775, 27-29.
- 27- **Kiermeier, F.** (1970): *Zum Nachweis von Aflatoxinen in Käse* Z. Lebensmittel-Untersuch. u. Forsch. 144, 293-297.
- 28- **Kiermeier, F., Böhm, S.** (1971): *Zur Aflatoxinbildung in Milch und Milchproducten. V. Anwendung des Hühnerembryo-Testes zur Sicherung des dünn-schichtchromatographischen Aflatoxin-Nachweises in Käsen.* Z. Lebensmittel-Untersuch. u. Forsch. 147, 61-64.
- 29- **Kiermeier, F.** (1972): *Aflatoxin Residues in Fluid Milk.* Paper presented at the recent IUPAC sponsored International Mycotoxin Symposium held in Goteborg, Sweden.
- 30- **Masri, M. S., et al.** (1968): *Mycotoxins. Analysis for Aflatoxin M in Milk.* J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 51, 594-600.
- 31- **Masri, M. S., et al.** (1969): *The Aflatoxin M Content of Milk from Cows Fed Known Amounts of Aflatoxin.* Vet. Rec. 84, 146-147.
- 32- **Masri, M. S., et al.** (1969): *Modification of Method for Aflatoxins in Milk.* J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 52, 641-643.
- 33- **Nabney, J., et al.** (1967): *Metabolism of Aflatoxin in Sheep. Excretion Pattern in the Lactating Ewe.* Food Cosmet. Toxicol. 5, 11-17.
- 34- **Nesheim, S.** (1969): *Conditions and Techniques for Thin Layer Chromatography of Aflatoxins.* J. Am. Oil. Chemists' Soc. 46, 335-338.
- 35- **Pohland, A. E., et al.** (1968): *Aflatoxin B<sub>1</sub> Hemiacetal.* J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 51, 907-910.
- 36- **Pohland, A. E., et al.** (1970): *Rapid Chemical Confirmatory Method for Aflatoxin B<sub>1</sub>. I Development of the Method.* J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 53, 101-102.
- 37- **Pohland, A. E.** (1972): *Confirmative Methods for Mycotoxins.* Abstracts of the Mycotoxin Papers presented at the AOAC Meeting, Washington, Abst. 212.
- 38- **Pons, W. A.** (1972): *Method for Aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in Liquid Milk.* Privileged communication. Communication personnelle au moyen d'A. D. Campbell.
- 39- **Pons, W. A., et al.** (1972): *Method for Aflatoxin M<sub>1</sub> in Liquid Milk and Milk Powder.* Abstracts of the Mycotoxin Papers presented at the AOAC Meeting. Washington, Abst. 208.

- 40- **Purchase, I. F. H.** (1966): *Aflatoxin in Milk*. S. A. Medical Journal 40, 774.
- 41- **Purchase, I. F. H., Steyn, M.** (1967): *Estimation of Aflatoxin M in Milk*. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 50, 363-366.
- 42- **Purchase, I. F. H.** (1967): *Acute Toxicity of Aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> in One day-old Duckling*. Food Cosmet. Toxicol. 5, 339-342.
- 43- **Purchase, I. F. H., Steyn, M.** (1972): *Fluorescence of Aflatoxin M Standards Stored in Solution and as Dry Films*. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 55, 1316-1318.
- 44- **Rehn, H. J., Schmidt, I.** (1969): *Aflatoxinbildung in Butter und Margarine*. Z. Lebensmittel-Untersuch. u. Forsch 140, 164-165.
- 45- **Roberts, B. A., Allcroft, R.** (1968): *A Note on the Semi-quantitative Estimation of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Liquid Milk by Thin-layer Chromatography*. Food Cosmet. Toxicol. 6, 339-340.
- 46- **Rodricks, J. V.** (1972): *Mycotoxin Standards*. Abstracts of the Mycotoxin Papers presented at the AOAC Meeting, Washington, D.C. U. S. A. Abst. 214.
- 47- **Stack, M. E., et al.** (1972): *Mycotoxins. Derivative Method for Chemical Confirmation of Identity of Aflatoxin M<sub>1</sub>*. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 55, 313-314.
- 48- **Stubblefield, R. D.** (1972): *Communications personnelles*.
- 49- **Stubblefield, R. D., et al.** (1972): *Aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> and Parasiticol*.  
Thin Layer Chromatography and Physical and Chemical Properties. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 55, 762-767.
- 50- **Stubblefield, R. D., et al.** (1972): *Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milk. Evaluation of Methods*. Abstracts of the Mycotoxin Papers presented at the AOAC Meeting, Washington, D.C. U. S. A. Abst. 207.
- 51- **Wissenschaftlicher Jahresbericht** (1970): *Aflatoxine in Milch und Milchprodukten*. Forschung Lehre Praxis, 10.



Foto 1. Mixer

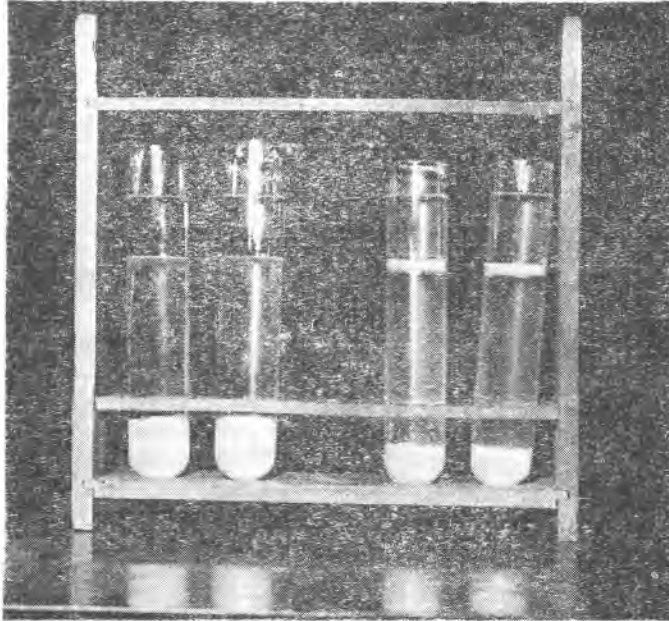


Foto 2. Metanol-su ekstraktının santrifüj edilmesinden sonraki fazları.  
(After centrifugation of the methanol-water  
extract of sample)

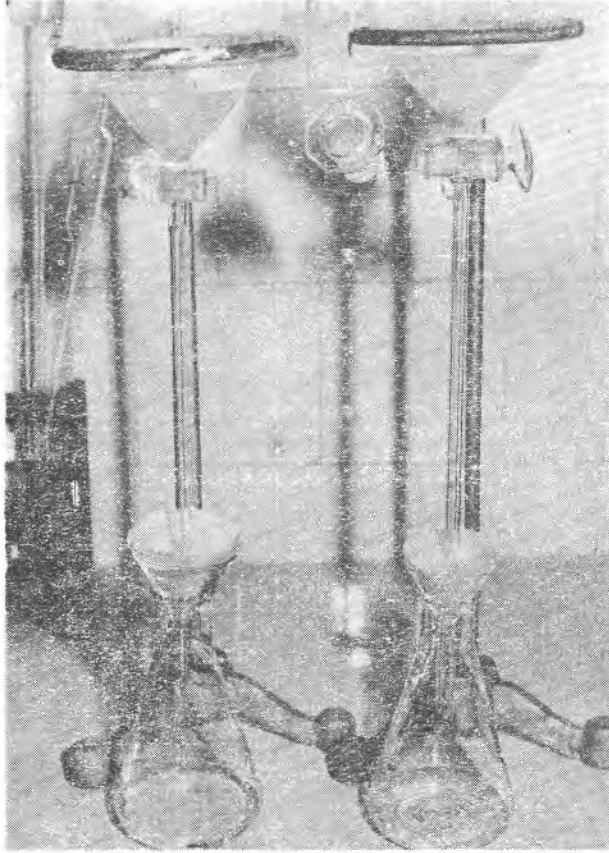


Foto 3. Kloroform ekstraktın süzülmesi.  
(Filtration of chloroform extract)

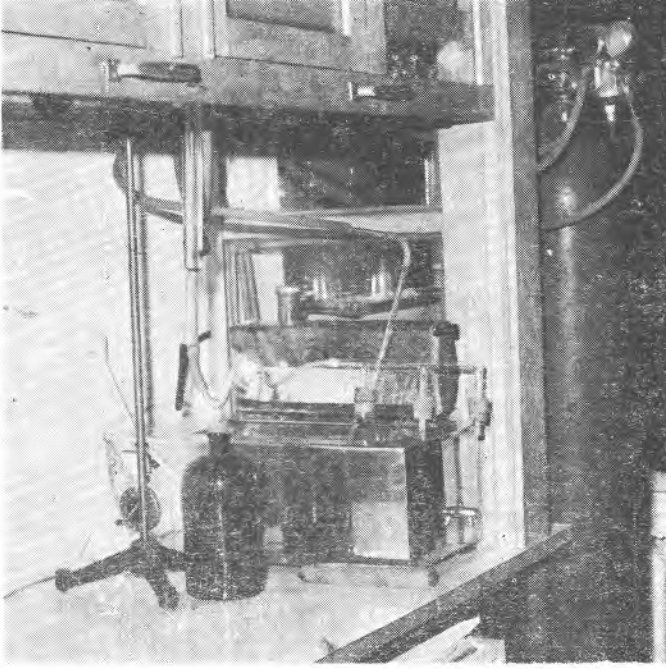


Foto 4. Kloroform ekstraktlarının buharlaştırılması için, su banyosu, su trompu ve azot bombası ile düzenlenen sistem. (Evaporation system).



Foto 5. Numune şişesi.  
(Sample bottle)

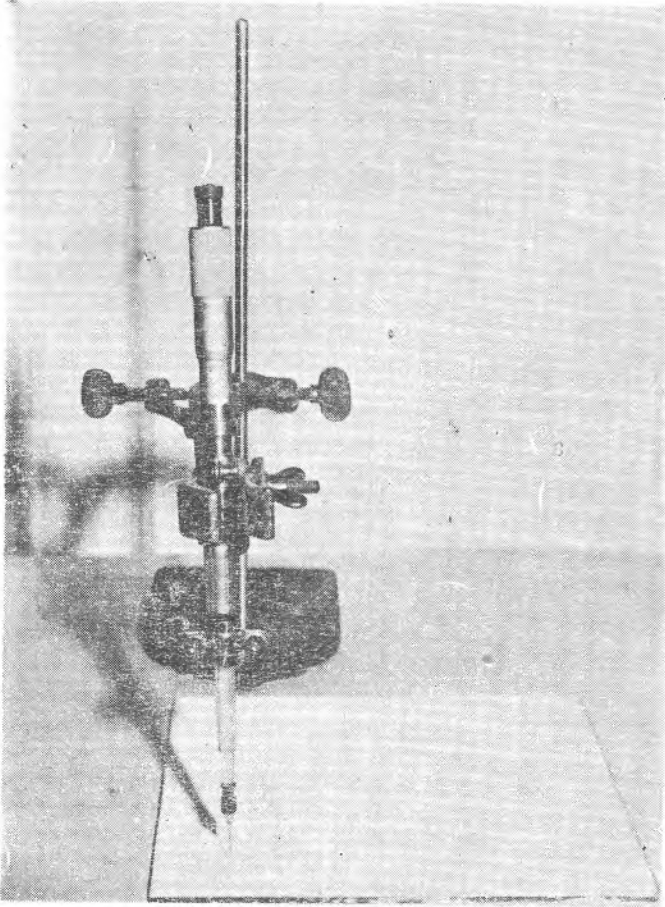


Foto 6. Numunenin ekstraktının ince tabaka plağına Agla mikro şiringası ile (tatbik edilmesi. Spotting by Agla Micrometer Syringe).