

KARMA YEMLERDE AFLATOKSİN ANALİZİ

Yusuf Şanlı*

Selahattin Ceylan**

Sezai Kaya***

Analysis of Aflatoxins In Mixed Feedstuffs.

Summary: *Some improvements were made in the analysis of aflatoxins for the clean up of their residues from the co-extractives of mixed feedstuffs. The procedure being used consisted of the following order of analytical steps: 1) Extraction of aflatoxins from the feedstuffs with acetonitril: potassium chloride (90:10) mixtrure; 2) Precipitation with lead acetate; 3) Liquid-liquid partition between acetonitril-isooctan, and 4) Silicagel column chromatography.*

The experiments were conducted on the mixed feedstuff samples which previously determined to be not contaminated with aflatoxins. Aflatoxin B₁ was added to these samples in the concentrations between 2-40 µg/kg, and thirty-five recovery analyses were carried out on the spiked samples to determine validity of the procedure.

From the results of the experimental analyses it was calculated that the mean recovery is 84.84 per cent and the residue can be detected to the level of 2 µg/kg. The procedure has some advantages of economy and reproducibility and can be used for qualitative and quantitative estimation of aflatoxin residues in animal feedstuffs.

Özet: *Bu çalışmada, aflatoksin analizi yönünden fazlaca yanıtıcı ve maskeleyici kirlilik içeren karma yemlerde asetonitril: potasyum klorür çözeltisi (90:10) karışımıyla yapılan ekstraksiyon işlemi ile metalle çöktürme (kurşun asetat), sıvı-sıvı dağılım kromatografisi (asetonitril-izooktan) ve kolon kromatografisi aşamalarından oluşan bir temizleme tekniği denendi.*

* Doç. Dr., A. Ü. Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Birimi-
Ankara, Turkey.

** Doç, Dr., Aynı Kürsüde Öğretim Elemanı.

*** Dr., Aynı Kürsüde Araştırma Görevlisi.

Önceden aflatoksinle kirlenmediği saptanan karma yemlere 2-40 µg/kg kirlenme düzeylerine gelecek şekilde aflatoksin B₁ standardı katılarak gruplar halinde 35 rezidü kazanç analizi yapılmak suretiyle denenen uyarlamaların geçerliliği değerlendirildi. Böylece, kullanılan analiz yöntemiyle % 84.84 oranında rezidü kazancı sağlandığı 2 µg/kg düzeyine kadar inen aflatoksin kirliliklerinin nicel ve nitel olarak saptanabildiği, benzeri yöntemlerle yapılan karşılaştırmalara göre daha ekonomik olduğu, iyi sayılabilecek derecelerde tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde edildiği anlaşıldı.

Giriş

Mantar invazyonlarına bağlı olarak gelişen besin küflenmeleri pek çok ülkede sık sık karşılaşılan doğal bir kirlenme olgusudur. Önceleri insan ve hayvan yiyecelerinin estetik yönden bozulması şeklinde değerlendirilen bu sorun, 1960'da İngiltere'de küflü yer fıstıklarının hayvan yemi olarak kullanılması sonucu ortaya çıkan ve 100.000'den fazla kanatlımın kısa zamanda ölümüyle sonuçlanan toplu zehirlenme olayıyla, daha çok bir zehirlenme kaynağı olarak dikkati çekmiştir (1,2,6,22,23,39). Günümüze değin konuya ilişkin olarak yapılan yoğun araştırmalarla invazyona katılan toksijenik mantarların metabolizma ürünleri olan mikotoksinlerin izole edilerek, çok yönlü toksik etkileri açıklığa kavuşturulmuş ve sorunun insan ve hayvan sağlığını ciddi şekilde tehdit eden boyutları ortaya çıkarılmıştır (4,5,7,12,13,47,54).

Aflatoksinler, hemen her çeşit tahılda, hayvansal yiyecelerde ve karma yemlerde kolayca üreyen *Aspergillus türleri* tarafından sentezlenen metabolizma ürünüdür. Bu yüzden de sık sık besin kirlenmelerine ve dolayısıyla zehirlenmelere yol açarlar (4,12,14,15,22). Memeli, kanatlı, balık ve omurgasızlar başta olmak üzere, hemen tüm canlı türlerine karşı aşırı derecede toksisite gösterirler. Özellikle karaciğer olmak üzere, pek çok organda yaygın ve kalıcı bozukluklara yol açarlar. Daha önemlisi, günümüze değin yapılan deneysel çalışmalarda çok farklı türden deney hayvanlarında şiddetli kanserojen etki gösterdikleri anlaşılmıştır (1,2,5,10,12,15,20,24).

Aflatoksikozislerin tanısı ve aflatoksin varlığının saptanması: Akut ve kronik aflatoksikozis olgularında ortaya çıkan klinik belirtiler ve patolojik bozukluklar seçkin nitelikli olmadığından, tanıları da güçlükle yapılır. Özellikle kronik olaylar her zaman için gözden kaçabilir. Klinik belirtiler, çoğu karaciğer bozukluğu ve yetersizliğinde gö-

rülebilene tiptendir. Patolojik bozukluklar da hemorrajik ve sepsitemik hastalıklarla karıştırılabilir. Mantar invazyonları her zaman için toksijenik nitelikli olmadığından, sadece hasta hayvanlara verilen besinlerdeki görülebilir küflere dayanılarak tanıya varmak da güvenli bir uygulama sayılamaz (13,22,52). Bu nedenle belirtilen zehirlenmelerin tanısında güvenilir bir uygulama olarak aflatoksinlerin varlığını ortaya koyabilen yöntemlere başvurulur. En fazla kullanılan yöntemler arasında, şüpheli maddelerden hazırlanan ekstraktların bir günlük ördek palazları ve alabalıklara yedirilerek toksisitesinin incelenmesi, ördek ve tavuk embriyonlarında toksisite denemelerinin yapılması, doku kültürlerinde hücre dejenerasyonlarının incelenmesi, toksijenik mantar türlerinin izole ve identifiye edilmesi, indikatör bakteri suşları kullanılarak, karsinojenik etkili aflatoksin varlığının ortaya çıkartılması ve nihayet, şüpheli yem, tahıllar, çeşitli hazır besinler, süt ve süt ürünleri ile et numunelerinden tekniğine göre yapılan ekstraktların kromatografik ve fluorodansitometrik yöntemlerden biriyle nitel ve nicel olarak analiz edilmesi bulunur (4,7,12, 22,29,47,52).

Bütün mantar türleri aflatoksin sentezleyemediğinden, küflenmiş her çeşit yem ve besin maddesi aflatoksikozise yol açmayabilir. Öte yandan, aflatoksinler 300°C'ye kadar ısıtılmakla parçalanmazlar; çeşitli teknolojik ve analitik işlemler sırasında çok az oranda kayba uğrarlar. Bir kaç kilogram küflenmiş besin maddesiyle karıştırılan tonlarca yem ve diğer besinler de kirlenebilir; dolayısıyla iyi görünümü veya küflerden arındırılmış bazı yem ve besin çeşitleri de zehirlenme kaynağı oluşturabilir. Belirtilen yönler dikkate alındığında, aflatoksinlerden ileri gelen bir zehirlenme olayının tanısı veya küflenme olgusunun ortaya çıkartılması, bunların ortamdaki varlığını kesin bir şekilde nitel ve nicel olarak sergileyen fiziko-kimyasal analiz yöntemleriyle yapılır (5,7,22,29,33).

Aflatoksinlerin fiziksel-kimyasal özellikleri ve analiz yöntemleri :

Aflatoksinler yapısal yönden birbirlerine çok benzeyen birer furanokumarin türevidir (12,16). Halen izolasyonu yapılmış ve kimyasal nitelikleri açıklanmış 17 çeşit türevin varlığı bilinmekle beraber; genellikle aflatoksin terimi doğal ortamda en fazla bulunan ve en sık karşılaşılan türevler olan aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂'yi karşılar (5,12,13, 40). Bunların içerisinde en fazla sentezlenen ve dolayısıyla besinlerde en yoğun bulunan türev aflatoksin B₁ dir; diğer türevlerin yo-

ğunluğu G_1, B_1 ve G_2 sırasını izleyerek azalır (52). Yemlerle birlikte alınan aflatoksinler süt ineklerinin vücudunda biyotransformasyona uğrayarak metabolitler halinde süt ve idrarla atılırlar. Daha çok sütte bulunan bu türevler "süt aflatoksini" anlamına gelen aflatoksin M_1 ve M_2 olarak adlandırılır (11,19,21,30,31).

Uzun dalga (325 nm) ultraviyole ışığında aflatoksin B_1 ve B_2 şiddetli mavi, G_1 ve G_2 de yeşil floresans verir. Aflatoksin varlığının saptanması, türevlerin birbirinden ayırt edilmesi ve yoğunluklarının ölçülmesi amacıyla kullanılan tüm fiziko-kimyasal yöntemler bu özelliklerine dayanır (16,22,52).

Tüm aflatoksinler kloroform, metanol, etanol, benzol ve dimetil sülfoksit gibi polar çözücülerde serbestçe çözünürler. Bu özelliklerinden yararlanılmak suretiyle buldukları ortamdan ekstrakte edilerek arılaştırılabilir; deneysel çalışmalarda, tanı ve yoğunluk ölçümlerinde kullanılabilir (5,13,29,34).

Günümüzde besinlerde ve biyolojik ortamda bulunan aflatoksinler ve diğer mikotoksin çeşitlerinin ayrı ayrı veya birlikte aranmasına olanak veren ve pikogram düzeyine kadar duyarlı olan multimitoktoksin analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Halen yaygınlaşmış çok sayıda analiz yönteminin hepsi de analiz numunelerinin hazırlanması, aflatoksinlerin ekstraksiyonu, temizleme, türevlerin separasyonu, nitel ve nicel tayini gibi temel aşamalar bakımından birbirine benzerler. Sadece analiz materyalinin çeşidine ve özel sorunlara göre yapılan ufak uyarlamalar yönünden ayırım gösterirler (8, 9,14,18,28,32,33,36,37,38,42,45,46,50,51,52).

Analiz nümunelerindeki aflatoksinler kloroform, aseton, asetonitril veya metanol gibi çözücüler kullanılarak % 96-98 oranında ekstrakte edilebilir (8,9,14,17). Ekstraksiyon işlemi sırasında, belirtilen çözücüler, seçilen analiz yöntemine göre genellikle metanol: su: hekzan (50), kloroform: su (8,9,17), aseton: su (12), asetonitril: su (32,33) karışımı şeklinde öğütülmüş veya homojenize edilmiş analiz nümunesine katılarak, belli bir süre çalkalamak ya da karıştırmak suretiyle aflatoksinlerin sıvı ortamda çözünmeleri sağlanır. Santifuje edilerek (8,9,50) veya süzülerek (17,33) nümunelerden ayrılan sıvı ekstrakt, ya sıvı-sıvı dağılım tekniğiyle, ya da silikajel veya diatome toprağıyla hazırlanmış özel kolonlara uygulanarak önce eter-hekzan karışımıyla yağlar, pigmentler ve diğer maskeleyici kirlilikler bertaraf edilir ve daha sonra da kloroform: metanol (17,

33), kloroform: hekzan veya kloroform: aseton (12,13) karışımlarından biriyle elüsyonu yapılır. Böylece elde edilen eluat kuruyana kadar uçurulduktan sonra 0.1 ml benzol: asetonitril karışımında çözülür. Bu çözeltinin bir bölümü nicel olarak tekniğine göre ince-tabaka plakasına uygulanır; bilinen miktarlarda aflatoksin standartları da uygulanan plakalar, uygun tanklarda kloroform: aseton (8,9,13,50), metanol: su: eter (17) veya toluol: etilasetat: % 90'lık formik asit (32,33) çözücü sistemlerinden biriyle developce edilir. Aflatoksin varlığının saptanması, türevlerinin birbirinden ayırtdilmesi ve miktarlarının saptanması işlemi, ya bir ultraviyole ışığı kaynağı altına (320-390 nm) yerleştirilen ince-tabaka plakasındaki şiddetli mavi ve yeşil floresans veren lekelerin aynı renge ve Rf değerlerine sahip standart lekeleriyle karşılaştırılmasıyla, ya da fluoredansimetri ile yapılır (8,12,16,17,25,30,33,38,45).

İnce-tabaka plakalarında ultraviyole ışığı altında belirlenen gerçek aflatoksin lekeleri ile kirliliklerini birbirinden ayırabilmek için, her analiz yönteminde ortak olan bazı doğrulama testlerine başvurulur (36,37,38). Muhtemelen belirtilen amaçla başvuru olan testlerden ilki, developmanı yapılmış ince-tabaka plakalarına % 25 lik sülfürik asit püskürtülerek yapılanıdır (41). Bu uygulamayla plakada bulunan aflatoksin lekelerinin mavi veya yeşil olan floresans renkleri sarıya dönüşür. Belirtilen testle olumlu sonuç alındığında ise, aflatoksin varlığını kesinlikle kanıtlayacak formik asit: tionil klorür, asetik asit: tionil klorür ve trifluoroasetik asit ayıraçlarıyla yapılan testlere başvurulur (3,44). Ayıraçlarda bulunan asitlerin katalitik etkisiyle aynı renkte floresans ve farklı Rf değerlerinde dimeirik asetat ve hidrokillsi aflatoksin türevleri şekillenir. Belirtilen doğrulama testlerinin basitleştirilmesine ve iyileştirilmesine yönelik olarak *Pohland ve Arkadaşları'nın* (25) önerdiği uyarlamada belirtilen ayıraçlar yerine hidroklorik asit: asetik anhidr karışımı veya tek başına hidroklorik asit de kullanılmaktadır.

1960'lı yıllarda uygulamaya konulan yöntemlerin hemen hepsi yer fisticlarında aflatoksin varlığının araştırılmasına yönelikti. Her geçen yıl iyileştirilerek bu grup yöntemlerin hemen hepsi de sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğine dayanan dağılım kromatografisi ile kolon kromatografisi kombinasyonuyla oluşturulan CB (Contamination Branc) (8,9) metodu ile ayırma hunisi kullanılarak yapılan sıvı-sıvı dağılım tekniğini kolon kromatografisi ile birleştiren ve sıvı ekstraktın katı maddelerden ayrılmasında süzme işlemi yerine santri-

fuj uygulamasını öngören ve BF (Best Foods) olarak bilinen (50, 51,52) iki temel analiz sistemine ayrılır. Son yıllarda pamuk tohumu, soya fasülyesi, mısır, şam fıstığı çeşitleri süt ve karma hayvan yemlerinde aflatoksin analizi amacıyla geliştirilen yöntemlerin büyük çoğunluğu yukarıda belirtilen iki ayrı sistemin modifiye edilmesi temeline dayanır (18,29,32,33,36,37,38,41,43,45,46).

Yemlerle birlikte alınan aflatoksinlerin $\mu\text{g}/\text{kg}$ düzeyinde kapalı hayvan etlerine ve yumurtalara geçtiği anlaşıldıktan sonra (47,52) havansal ürünlerde de aflatoksin varlığının saptanmasına olanak veren ve proteinlerin çöktürülmesi, yağların bertaraf edilmesi ile kloroformlu ekstraktın silikajel: asidik alumina: susuz sodyum sülfatla ileri derecede arıtılması aşamalarından oluşan aşırı derecede duyarlı ve farklı ekstraksiyon ve temizleme teknikleri önerilmiştir (17,38,52).

Son yıllarda Aflatoksinlerle ilgili bilimsel verilerin artması üzerine çeşitli besinlerde ve zehirlenme olaylarında kontrol amacıyla hızla yoklamalar yapmağa uygun, basitleştirilmiş analiz yöntemlerin önemi de artmıştır. Belirtilen amaçla yaygın kullanılma alanı bulmuş belli başlı yöntemlerde küçük kolon tekniğiyle aflatoksin varlığının belirlenmesi, ince tabaka kromatografisiyle yoğunluk ölçümü ve ince tabaka plâkalarında kimyasal türevler oluşturarak doğrulama aşamaları birleştirilmiştir (37, 38).

Aflatoksin türevleri ve tüm mikotoksin çeşitlerine karşı aşırı derecede seçkinlik göstermeleri ve oldukça yüksek duyarlılık derecesine sahip olmaları nedeniyle yüksek basınçlı likid kromatografisine dayanan bu yöntemler, bu alanda da yakın geleceğin en güvenilir analiz seçeneklerinden biri gözüyle bakılmaktadır. Fakat bugün için çok pahalı cihazları ve yetişmiş personeli gerektirdiğinden, rutin çalışmalarda kullanılacak derecede yaygınlaşmamıştır (26,27,52).

Bu çalışmamızda, hayvan yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara yol açan ve havansal besinler aracılığıyla insanlara yansarak ciddi sağlık sorunları yaratan küflenmiş karma yemlerde ve yem ilkel maddelerinde aflatoksin kirliliklerinin analiz edilebilmesi için, laboratuvar koşullarımıza uygun, rutin çalışmalarda kullanılacak, basit, güvenilir ve ekonomik bir ekstraksiyon ve temizleme tekniğinin uyarlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Analiz Nümuneleri:

Çalışmamızda, analiz gereci olarak % 65 tahıl, % 8-10 havansal protein, % 20 yağ endüstrisi artıkları % 4-6 kepek, yon-

ca veya mısır gluteni ile % 1 oranında yem katkı maddeleri esasına göre hazırlanmış tavuk yumurta yemi nümuneleri kullanıldı. Önce *Robert. B.A. ve Patterson. D.S.P.* (32,33) ile *Horwitz ve Arkadaşları'* nun (14) yöntemleri kullanılarak yapılan analizler sonucunda, aflatoksinlerle kirlenmemiş olduğu anlaşılan bu karışım, denemeler süresince mantar invazyonunu ve üremesini önleyici koşullarda saklandı.

Adsorbanları :

1. *Silikajel G* (ince-tabaka kromatografisi için, Type 60, Merck, Art. 7731): Bağlayıcı madde olarak % 13 oranında alçı içerir ve % 10'luk sulu süspansiyonun Ph'sı 7'dir.

2. *Silikajel* (kolon kromatografisi için, 70-230 mesh ASTM, Merck, Art. 7734): 80 °C'da etüvde iki saat süreyle aktive edilip, desikatörde soğutulduktan sonra, ağırlık/ağırlık esasına göre % 1 oranında damıtık su katılarak iyice karıştırılmakla bölümsel olarak deaktive edildi; analiz süresince desikatörde saklandı.

Ayrıçlar :

1. *Sodyum sülfat*: (Anhidr, granüllü, Merck Art. 6649).

2. *Kurşun asetat çözeltisi*: 20 g. nötral kurşun asetat trihidrat balon jofede bir miktar damıtık suda çözdürüldükten sonra, 0.3 ml glasiyal asetik asit katıldı ve damıtık su ile hacmi 100 ml'ye ulaştırıldı.

3. *Doymuş sodyum klorür çözeltisi*.

4. *Aluminyum klorür çözeltisi*: % 95 etil alkolde % 24'lük.

5. *Trifluoroasetik asit*: (Merck, Art. 808206).

6. *Sülfürik asit* (% 25'lik)

7.0.1. *N hidroklorik asit çözeltisi*: 8.9 ml derişik HCl'e damıtık su katılarak hacmi litreye ulaştırıldı.

8. *Formik asit* (% 90, Merck, Art. 264).

9. *Potasyum klorür çözeltisi*: (% 4'lük sulu çözelti).

10. *Aflatoksin standardı*: Kuru, kristalize toz halindeki aflatoksin B₁ (Sigma Chemical Company, No: A-6636) standart etiketi üzerindeki ağırlığı dikkate alınarak 8-10 µg/ ml'lik yoğunluk sağlayacak şekilde benzol: asetonitril (98:2) karışımında çözdürüldü. Bu

standart depo çözeltinin ml'sinde bulunan aflatoksin B₁'in gerçek yoğunluğu spektrofotometrede ultraviyole (UV) absorbands ölçme yöntemiyle (14) belirlendi. Aynı çözeltinin uygun bir bölümü benzol: asetonitril karışımıyla 0.5 µg/ml yoğunluğuna kadar seyreltilmekle ince-tabaka kromatografisi uygulama çözeltisi hazırlandı. Denemelerde kullanılmak üzere, uygulama çözeltisinden belli bir miktar ayrıldıktan sonra geri kalanı standart depo çözelti ile birlikte ayrı ayrı mg düzeyine kadar tartılarak ağırlıkları referans amacıyla kaydedilip; şişeleri alüminyum plakalarla sarılmış halde soğutucuda saklandı. Çalışmalar sırasında soğutucudan çıkartılan standart ısısının oda ısısına çıkması için yeterli süre beklendi.

Çözücüler :

1. Asetonitril (Merck, Art. 800015)
2. Benzol (Merck, Art. 1781)
3. İzooktan (Merck, Art. 4727)
4. Kloroform (Merck, Art. 2431)
5. n-hekzan (Merck, Art. 4368)
6. Dietileter (Anhidr, Merck, Art. 921)
7. Metanol (Merck, Art. 6008)
8. Toluol (Riedel, 242-51)
9. Etil asetat (Merck, Art. 864)

Analizlerde kullanılan tüm çözücü ve ayıraçlar kromatografik analiz kalitesinde seçildi.

Aygıtlar :

1. İnce-tabaka kromatografisi aygıtı ve ekleri (Desaga)
2. Ultraviyole (UV) lambaları (Chromatolux 2L, Pleuger): 16 Watt, uzun ve kısa dalga bir arada.
3. Spektrofotometre (Beckman, Model-B)
4. Rotatif evaporatör (Buchi).
5. Homojenizatör (Virtis, Model-23)
6. Etüv, desikatör, saç kurutma aygıtı, kromatografi kolonları (20 mm iç çaplı ve 400 mm uzunluğunda), ayırma hunileri, santrifuj tüpleri (ml bölümlü).

Metot

Çalışmamızda amaçlanan uyarılmanın gerçekleştirilebilmesi için, karma yem nümunelerindeki aflatoksinlerin ekstraksiyonu, metalle çöktürme ve sıvı-sıvı dağılım kromatografisiyle yapılan ön temizleme işlemleri, *Robert ve Patterson* (32,33) ile *Romer* (36)'in önerdikleri tekniklere göre yapıldı. İleri temizleme aşamasında ise *Horwitz ve Arkadaşları* (14)'nin A.O.A.C. yöntemleri kapsamında tanımladıkları kolon kromatografisi tekniği kullanıldı.

Temizlenmiş ekstraktlardaki aflatoksin varlığının saptanması, doğrulanması, türevlerinin birbirinden ayırt edilmesi ve nicel olarak belirlenmesi ince-tabaka kromatografisinde UV ışığı, alüminyum klorür, sülfürik asit ve trifluoroasetik asit ayıraçlarına dayanan doğrulama testleriyle yapıldı (38).

İşlemler :

a) *Ekstraksiyon* : Mikserde iyice öğütülmüş 25 g karma yem örneği homojenizatör kavanozuna kondu; üzerine $\mu\text{g}/\text{kg}$ yoğunluk düzeyinde bilinen miktarlarda Aflatoksin B₁ standardı ve 100 ml asetonitril : potasyum klorür çözeltisi karışımı (90:10) katılarak 3 dakika orta hızla homojenize edildi. Daha sonra asetonitrilli ekstrakt Whattman No: 41 filtre kağıdından süzüldü.

b) Ön temizleme aşaması :

Metalle çöktürme : Elde edilen filtratın 50 ml'si bir erlenmeye aktararak üzerine 5 ml kurşun asetat çözeltisi katıldı ve 2 dakika ılımlı bir şekilde çalkalandıktan sonra 5 dakika dinlenmeğe bırakıldı. Böylece filtrata geçen pigmentler, proteinler ve diğer organik maddelerin çöktürülmesi sağlandı. Ortamda bulunan kurşun asetat fazlasını bertaraf edebilmek için filtrata 5 ml doymuş sodyum klorür çözeltisi katıldı ve 2 dakika ılımlı bir şekilde çalkalanıp 5 dakika dinlenmeğe bırakıldı. Bu işlemlerle şekillenen çökeltiler süzülerek atıldı.

Sıvı-sıvı dağılım kromatografisi : Yukarıdaki işlemlerden sonra elde edilen filtratı yağlı artıklarından da arıtılabilmek için, 250 ml'lik bir ayırma hunisine aktarıldı ve üzerine 50 ml izooktan katılarak 2 dakika çalkalandı. Bekletilerek birbirinden ayrılan sıvı katmanlardan üstte kalan ve yağlı artıkları içeren izooktan katmanı atıldı ve aynı işlem 50 ml izooktan kullanılarak yinelenildi.

Ayırma hunisinde kalan ekstrakta 12.5 ml su katılarak kloroformla ekstraksiyon işlemi uygulandı. Bunun için karışıma önce 25 ml kloroform katıldı ve 2 dakika çalkalandıktan sonra sıvı katmanları ayırılmaya bırakıldı. Altta kalan kloroform-asetonitril katmanı uygun bir huniye yerleştirilen 9 cm'lik Whattman No: 41 süzgeç kağıdına konulan susuz sodyum sülfat paketinden geçirildi. Her defasında 10 ml kullanılarak aynı ekstraksiyon işlemi 3 kez yinelenildi. Elde edilen ekstraktlar aynı erlenmayerde birleştirildi. Tüm ekstrakt evaporatif konsantratörde 4-5 ml'ye kadar yoğunlaştırılarak ileri temizleme aşamasında kullanıldı.

C) İleri temizleme aşaması :

Kolon kromatografisi :

Kromatografi kolonunun hazırlanması : Gereç bölümünde özellikleri belirtilen kromatografi kolonu taşıyıcıya yerleştirildi. Altta kalan musluklu ucuna uygun şekilde paketlenmiş cam pamuğu hafifçe yerleştirildi. Musluk kapalı iken üzerine 5 g. susuz sodyum sülfat kondu ve kolon yarısına kadar kloroformla dolduruldu; daha sonra, aktive edilmiş 10 g. silikajel yavaş yavaş kolona döküldü. Silikajel ile bulaşmış olan kolon duvarları 20 ml kloroform ile yıkandı. Silikajel katmanında oluşan tepaklanmaları gidermek ve iyi bir dağılım sağlamak için, kolon hafifçe kendi etrafında çevirilerek içeriğin karışması sağlandı. Silikajel katmanının iyice oturmasını sağlamak için musluktan biraz kloroform akıtıldı ve bunun da üzerine tekrar yavaş yavaş 15 g. susuz sodyum sülfat dolduruldu. Alttaki musluk açılarak kloroform içeriği sodyum sülfat katmanının üst düzeyine kadar akıtılarak kolon elüsyona hazırlandı.

Aflatoksinlerin elüsyonu : Yoğunlaştırılmış numüne ekstraktı dikkatlice kolona aktarıldıktan sonra musluk tam olarak açıldı. Var olan sıvı içeriği dolgu düzeyine kadar inince önce 100 ml n-hekzan dökülerek maksimum akış hızında kolondan geçmesi sağlandı; sonra da aynı işlem 100 ml susuz dietileter ile yinelenildi, Ekstrakttaki çeşitli kirlilikleri içeren n-hekzan ve dietileter birikintileri atıldı. En son aşamada kolona 150 ml kloroform: metanol karışımı (97:3) konularak aflatoksinlerin elüsyonu yapıldı. Elde edilen eluat, önce rotatif evaporatörde 4-5 ml'ye kadar yoğunlaştırıldı; sonra da ölçülü bir santrifüj tübüne aktarılarak düşük ısıda, ben-maride azot gazı akımıyla kuruyana kadar uçuruldu. Tüpteki aflatoksin kalıntıları 0.1

ml benzol: asetonitril (98:2) karışımında çözdürülerek ince-tabaka kromatografisinde kullanıldı.

d) İnce-tabaka kromatografisi (İTK):

Plakaların hazırlanması: Yayma tablası üzerine, temizlenip kurutulmuş, 20x20 cm boyutlarındaki 5 adet plaka yerleştirildi. Alkol ve n-hekzanla yüzeyleri silinerek, yağ ve diğer kirliliklerden arıtıldı. Ağzı cam kapaklı bir erlenmayere 30 g silikajel-G ve 60 ml damıtık su konularak hazırlanan adsorban karışımı önceden 0.250 mm'e ayarlanmış ve uygun şekilde plakaya yerleştirilmiş yayıcıya dökülerek yayıldı. Plakalar bir süre laboratuvar ısısında kurutuldu ve etüvde 105 °C ısıda bir saat tutularak aktive edildi; sıcakken desikatöre alınarak kullanılmaya kadar saklandı.

Aflatoksinlerin plakalara uygulanması ve developman işlemi: Plakalar-daki adsorban katmanı, developman yönüne paralel olarak 1 cm aralıklarla çizilerek kolonlara ayırıldı. Böylece plakaya uygulanan her lekenin bağımsız olarak developmanı sağlandı. Çözücü karışımının plakanın her yanına aynı hızla tırmanmasına yardımcı olmak ve tank kenarından yansıyan bulaşmaları önlemek için, plakanın iki yanındaki adsorban katmanı 0.5 cm kadar kazındı.

Plakanın çözücü sistemine daldırılacak alt ucunda 2 cm yükseklikte işaretlenmiş imgesel bir eksen boyunca 0.1 ml çözdürülmüş nümune ekstraktından mikrolitrelik pipetlerle alınan 5, 10 ve 15 µl hacmindeki örnekler, saç kurutma aygıtının sıcak hava akımı yardımıyla kurutularak olanak ölçüsünde eşit çaplarda kompakt lekeler halinde uygulandı. Ekstrakt lekelerindeki aflatoksin türevinin varlığını ve çeşidini saptamak ve yarı-nicel yoğunluğunu belirlemek amacıyla bir kontrol ve karşılaştırma ölçütü olarak değerlendirilmek üzere 0.5 µg/ml'lik standart aflatoksin B₁ çözeltisi kullanılarak aynı plakaya 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, ve 10.0 ng aflatoksin içeren lekeler yapıldı.

Hazırlanan plaka, en az bir saat önceden 100 ml toluol: etil asetat: % 90 formik asit (60: 30: 10) çözücü karışımı konulmuş tanka yerleştirildi; 10 cm yüksekliğe kadar developman yapıldı. Tanktan çıkarılan plaka laboratuvar ısısında çözücülerin uçması için bekletildi.

Aflatoksin varlığının saptanması ve yarı-nicel ölçümü: *Develop* edilmiş plaka, karanlık odada uzun dalga ultraviyole ışığı altında

incelendi. Standart aflatoksin B₁ lekesiyle aynı renkte florasan veren ve Rf değeri gösteren lekeler, yem nümunesine katılan aflatoksin B₁ olarak dikkate alındı. Florasan şiddeti ve leke alanları bakımından değişik yoğunluklarda aflatoksin B₁ içeren standart lekeleriyle yapılan karşılaştırmalarla nümune ekstraktına ait lekelerde bulunan aflatoksin yoğunluğu yarı-nicel olarak ölçüldü.

e) *Doğrulama testleri :*

Aflatoksin B₁ standardı ile aynı Rf değeri ve florasesans rengi veren ekstrakt lekесinin aflatoksin olup olmadığını doğrulamak için, plakaya önce alüminyum klorür çözeltisi püskürtülerek 105 °C'de etüvde 10 dakika tutuldu. Böylece, daha belirgin hale gelen lekeler, büyüklük ve renk şiddetleri bakımından ikinci kez karşılaştırıldı. En son olarak da aynı plakaya % 25'lik sülfürik asit çözeltisi püskürtülerek mavi florasan rengin parlak sarıya dönmesi kontrol edildi. Belirtilen yönde değişikliğe uğrayan lekeler aflatoksin olarak değerlendirildi.

Sonuç ve Tartışma

Çalışmada analiz geci olarak seçilen karma tavuk yemlerine 2-40 µg/kg kirlenme düzeylerine denk gelecek boyutlarda aflatoksin B₁ katılarak kalıntı analizleri yapıldı. Bu işlem her analiz başlangıcında önceden öğütülerek homojenize edilmiş 25 g yem örneğine 50, 100, 150, 200, 300 ve 500 ng aflatoksin B₁ içeren standart çözeltinin katılmasıyla gerçekleştirildi. Benzeri araştırmalarda (8, 9, 17, 18, 26, 29, 32, 36, 39, 43, 48) da başvuru söz konusu uygulamayla, büyük hacimlerdeki yem nümunelerine arı aflatoksin katılmasıyla ortaya çıkacak kayıplar önlenmekte ve yetersiz homojenizasyondan doğabilecek sakıncalar giderilmektedir. Belirtilen yoğunluk düzeylerinden her birinin en az 5 kez katılmasıyla 6 grup halinde yapılan toplam 35 analiz sonucuna ilişkin veriler Çizelge 1'de görülmektedir. Aynı yoğunlukta aflatoksin katılarak yapılan analiz sonuçlarına göre hesaplanan bireysel ve ortalama kazanç yüzdeleri ile standart ayrılıkları da aynı çizelgede verilmiştir.

Çizelge 1'deki veriler incelendiğinde, bireysel analiz sonuçlarına göre hesaplanan aflatoksin kazanç yüzdesinin 62.5-104 limitleri arasında değiştiği görülmektedir. Eşit yoğunluklarda aflatoksin

Çizelge 1. Karma tavuk yemi örneklerine aflatoksin B₁ katılmasıyla yapılan analiz sonuçları, analiz gruplarına göre hesaplanan ortalama kalıntı kazanç yüzdeleri ve standart ayrılışları.

Sıra No.	Katılan aflatoksin B ₁ (ng)	Kg. karma yeme düşen yoğunluk mikrogram/ kg.	Geri kazanılan aflatoksin mik. ng. olarak.	Kazanç yüzdesi
1	50	2	34	68
2	50	2	42.1	84.2
3	50	2	43.6	87.2
4	50	2	46	92
5	50	2	39.2	78.4
Ortalama Kazanç Yüzdesi:			40.98	81.98
Standart ayrılış			4.615	9.236
6	100	4	80	80
7	100	4	72	72
8	100	4	104	104
9	100	4	80	104
10	100	4	82	82
11	100	4	86	86
Ortalama kazanç yüzdesi			84	84
Standart ayrılış			10.807	10.807
12	150	6	130.05	86.7
13	150	6	120	80
14	150	6	139.95	93.3
15	150	6	139.95	93.3
16	150	6	127.5	85
Ortalama Kazanç Yüzdesi			131.49	87.66
Standart Ayrılış			8.563	5.706
17	200	8	165	82.5
18	200	8	180	90
19	200	8	188	94
20	200	8	125	62.5
21	200	8	182	64
22	200	8	190	95
23	200	8	152	76

Çizelge 1'in devamı.

Sıra No.	Katılan aflatoksin B, (ng)	Kg. karma yeme düşen yoğunluk mikrogram/ kg.	Geri kazanılan aflatoksin mik. ng. olarak	Kazanç yüzdesi
24	200	8	156	78
25	200	8	170	85
Ortalama Kazanç Yüzdesi			161.5	80.77
Standart ayrılış			23.745	7.914
26	300	12	300	100
27	300	12	260.1	86.7
28	300	12	252	84
29	300	12	279.9	93.3
30	300	12	240	80
Ortalama Kazanç Yüzdesi			266.4	88.8
Standart Ayrılış			23.745	7.914
31	500	20	450	90
32	500	20	480	96
33	500	20	450	90
34	500	20	380	76
35	500	20	472.5	94.5
Ortalama Kazanç Yüzdesi			446.5	89.3
Standart Ayrılış			39.512	7.902

katılarak yapılan analiz gruplarına göre hesaplanan ortalama kazanç yüzdelерinin de 80.77-89.3 oranları arasında kaldığı belirlenmiştir (Çizelge 1). Bireysel analiz sonuçlarına dayalı olarak yukarıda verilen kazanç yüzdelерini gösterir rakamsal değerler arasındaki ayrımanın (41.5) önemli sayılacak derecede olmasına karşın, her bir analiz grubu dikkate alınarak hesaplanan ortalama kazanç yüzdeleri arasındaki ayrımanın önemsiz sayılabilecek boyutlarda kaldığı dikkati çekmektedir. Belirtilen durumun analiz örneklerine katılan aflatoksin yoğunluğunun veya doğal kirlenme düzeyinin düşmesine koşut olarak, analiz kazanç yüzdesinin de azalmasından ileri geldiği sanılmaktadır. Gerçekten Çizelge 1'deki bireysel analizler ve gruplarla ilgili değerler göz önüne alındığında, azalan yoğunluklarda aflatoksin kullanılan analiz gruplarının ortalama kazanç yüzdelерinin de giderek azalması, bu görüşü kanıtlar niteliktedir.

Bireysel analiz sonuçlarının aflatoksin kazanç yüzdeleri dik-kate alınarak hesaplanan 35 adet aflatoksin analizinin ortalama kazanç yüzdesi 84.84 olarak bulunmuştur.

Aflatoksin sentezleyen *Aspergillus türleri* tarlada ve ambarlama koşullarında başta yer fıstığı, mısır, pamuk tohumu, soya fasülyesi olmak üzere, buğday ve arpa gibi tahullarda ve karma yem çeşitlerinde kolayca üreyebilirler. Bu yüzden de hayvan yemleri insan besinlerinden daha yüksek oranlarda kirlenme riskiyle yüzyüzedir (1,2,22). Nitekim, bugüne değin aflatoksinlerle kirlenmiş besinlerin yol açtığı sağlık sakıncaları daha çok hayvanlarda karşılaşılan bireysel veya toplu zehirlenme olayları şeklinde kendini göstermiştir (52).

Bugün için insan ve hayvanlarda karşılaşılan aflatoksikozisler rasyonel bir şekilde sağtılamaz. Bu nedenle de koruyucu sağıtım daha çok önem taşır (2,4,5,15,21,23,24,29,35). Belirtilen sağıtım seçeneği, besin küflenmelerinin önlenmesi, kirlenme olgularının ortaya çıkartılması, kirlenme düzeylerinin ölçülmesi, insan ve hayvan sağlığı yönünden sakıncalı bulunan kirlenme derecelerinin belirlenmesi, tolerans düzeyleri ile günlük alım limitlerinin saptanması, sakıncalı düzeylerde kirlenmiş besin tüketiminin önlenmesi şeklinde yapılan uygulamalarla gerçekleştirilebilir (7,10,12,13,15,24,29,35,39,40,52). Özet halinde verilen bu bilgilerden de anlaşılacağı gibi, aflatoksinlerle kirlenmiş besinlerden ileri gelen sağlık sakıncalarının önlenmesinde, çeşitli bilimsel ve yasal önlemlerin alınmasında ve zehirlenme olaylarının güvenli bir şekilde ortaya çıkartılmasında aflatoksin analizleri kilit uygulama niteliğini taşır. Bu yüzden de son yıllarda aflatoksinlerin akut ve kronik toksik etkilerinin açıklanmasında olduğu kadar; besinlerde ve biyolojik ortamda aflatoksin varlığının oraya çıkartılmasına yönelik yöntem çalışmaları da önem kazanmıştır (8,9,12,17,18,25,27,29,45).

Aflatoksin analizlerinde en önemli bölümünü ekstraksiyon ve temizleme işlemleri oluşturur. Birbirini tamamlayıcı nitelikte bir kaç aşamada gerçekleştirilen uygulamalarla aflatoksinler besinlerden ve biyolojik ortamdan ayırılarak tanı ve yoğunluk ölçümünde kullanılacak derecede temizlenir (14,16,18). Ancak, bugüne değin uygulamaya konmuş yöntemlerin hemen hepsinde nümunelerden elde edilen aflatoksinli ekstraktların kromatografik ve floresans özellikleri yönünden aflatoksinlere benzeyen klorofil ve diğer kirliliklerden gerçek anlamıyla arıtılması tam olarak başarılamamıştır. Bu yüzden

ince-tabaka kromatografisi aşamasında, her zaman için hatalı sonuçlara ve değerlendirmelere yol açabilecek yabancı lekelerle karşılaşılma olasılığı vardır (38,44,45,46).

Fabrikasyon ve karma hayvan yemleri, oldukça farklı yapıya sahip bitkisel, hayvansal, sentetik ve mineral maddelerin karışımından oluşmaları; hazırlanmaları sırasında şekillenen protein ve diğer organik maddelerin dekompozisyon ürünlerini içermeleri nedeniyle daha da ileri temizleme tekniklerini ve titiz değerlendirmeleri gerektirir (16,18,26,32,38). Bu tür maddelerde aflatoksin analizi için geliştirilmiş yöntemlerde ya tek başına sıvı-sıvı dağılım kromatografisi (43,45; 46,48) veya kolon kromatografisi (14,53), sıvı-sıvı dağılım kromatografisi ile kolon kromatografisi ve geriye dializ işlemi (8,9,32,33), ya da metalle çöktürme işlemi ile temizlemede kullanılan kromatografilerden biri birleştirilerek temizleme koşulları olarak ölçüsünde iyileştirilmeğe çalışılmıştır (26,27,32,37,49).

Belirtilen yöndeki iyileştirme çabalarına katkıda bulunabilmek için, uyarılma niteliğinde yapılan bu çalışmamızda asetonitril: potasyum klorür çözeltisi karışımıyla yapılan ekstraksiyon işleminden sonra, metalle çöktürme, sıvı-sıvı dağılım ve kolon kromatografisi aşamalarından oluşan üçlü bir temizleme sistemi denenmiştir.

Bugüne değin yapılan literatür taramalarında, aynısına rastlayamadığımız söz konusu uyarılmayla yem nünunelerinden elde edilen aflatoksin ekstraktındaki klorofil, klorofilli maddeler ve proteinler ile diğer organik maddelerin kurşun asetat ile çöktürülerek bertaraf edilmesi; süzme işlemi ile presipitatlardan ayrılan filtratı bir ayırma hunisinde izooktanla çalkalayarak, sıvı-sıvı dağılım kromatografisi kuralları uyarınca, yağlı artıkların bu çözücüye geçirilerek atılması, böylece kolon kromatografisine yüklenecek çeşitli kirliliklerin önemli ölçüde azaltılması; son olarak yapılan kolon kromatografisiyle de etkili bir arıtma işleminin sağlanmıştıdır.

Yukarıda kısaca özetlenen değişikliklerden oluşan uyarılmaların aflatoksin analizlerinde kullanılan belli başlı seçkin yöntemlerden (14,25,26,29,32,33,36,37,43,44) daha farklı iyileştirmeler getirip getirmediğini belirleyebilmek için, genellikle bu tür çalışmalarda sık sık kullanılan (27,38) "ortamdaki aflatoksin miktarının geri alınması" veya "kazanç oranlarının ölçülmesi" (recovery) denemelerine başvuruldu. Analiz sonuçlarının istatistik yönden de-

ğerlendirilmesiyle elde edilen bulgular duyarlık düzeyi yüzde kazanç oranı, tekrarlanabilirlik niteliği, analiz süresi ve ekonomik katkı yönlerinde benzeri araştırma sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

Karma yem örneklerine (25 g) toplam 50 ng veya 2 µg yoğunluğunda aflatoksin B₁ standardı katılarak yapılan deneme ekstraktlarıyla hazırlanan ince-tabaka kromatogramları UV ışığı altında oldukça temiz bir görünüm vermeye beraber, 5 mikrolitreye kadar ekstrakt kullanılarak yapılan lekelerde aflatoksinlere bağlı floresans rengi tam olarak seçilememiştir. Halbuki toplam 100 ng veya 4 µg/kg yoğunluk hesabıyla aflatoksin kullanılarak yapılan ekstraktlarla hazırlanmış aynı kromatogramlarda 5 mikrolitrelik ekstrakt lekelerinde bile afltoksin varlığı kolayca seçilebildiğinden, tanısı ve yarı-nicel yoğunluk ölçümü yapılabilmektedir (Çizelge 1). Bu açıklamalar dikkte alındığında, denenen ekstraksiyon ve temizleme sistemiyle karma yemlerde bulunan 2 µg/kg'lık aflatoksin varlığının kolayca ortaya çıkartılabildiği anlaşılır. Diğer bir anlatımla, kullanılan analiz yönteminin duyarlık düzeyi 2 µg/kg yoğunluk derecesine kadar inebilmektedir.

Robert ve Patterson (32,33) tarafından önerilen mültimikotoksin yönteminde aflatoksinler için duyarlık düzeyi 3 µg/kg olarak saptanmıştır. *Romer* (36,37)'in uyarladığı yöntemde aynı değer 2-4 µg/kg arasında bulunmuştur. *Pons ve Arkadaşları* (27)'nin kullandıkları yöntemde de 4-5 µg/kg arasında saptanmıştır. *Stolof ve Arkadaşları* (45)'nin tahıl çeşitlerinde mikotoksin analizi için geliştirdikleri yöntemde aflatoksin B₁ ve G₁ için en düşük duyarlık düzeyi 20 µg/kg, *Eppley* (8,9)'in denediği yöntemde 32 µg/kg olarak ölçülmesine karşın, *Prior* (29), *Thomas ve Arkadaşları* (48) ile *Wilson ve Arkadaşları* (53)'nin çalışmalarında bu değer 3 µg/kg düzeyinde bulunmuştur. Bugün için en fazla kullanılan belli başlı analiz yöntemlerine ilişkin olarak verilen yukarıdaki bilgilerin ışığında denenen değişikliklerle sağlanan duyarlık düzeyinin yeterli ölçülerde olduğu gerçeği ortaya çıkar.

• Çizelge 1'deki aflatoksin kazanç yüzdeleriyle ilgili veriler incelendiğinde, bunlardan sadece 3 tanesinin % 60-70 oranları arasında kaldığı ve 2'sinin de % 100 veya daha yüksek oranların üstüne çıktığı, geri kalanların (% 85.57) ise % 70-100 oranları arasında kaldığı görülür. *Waltking* (51) tarafından BE (50), CB (8) ve celite yöntemleri kullanılarak farklı aflatoksin çeşitleriyle yapılan karşı-

laştırmalı kazanç denemelerinde aflatoksin B₁ için bulunan kazanç oranları, verilen yöntem sırasına göre % 0-172, % 25-125 ve % 54.5-118 limitleri arasında değiştiği kaydedilmektedir. *Thomas ve Arkadaşları* (48)'nin iyileştirdikleri A.O.A.C. yöntemlerinde sözkonusu oranlar % 29-100, *Pons ve Arkadaşları* (26)'nin denedikleri yöntemde % 92-120 ve *Robert ve Patterson* (32)'un uyarladıkları yöntemde de % 20-95 arasında bulunmuştur. Sıralanan bu rakamsal verilerden de anlaşılacağı gibi ileri derecede tekrarlanabilir niteliğe sahip ve güvenilir olarak kabul edilen çok sayıdaki analiz yönteminin aflatoksin kazanç değerleri önemli varyasyonlar gösterebilmektedir. Çalışmamızdan elde edilen aynı nitelikli sonuçların çok daha dar bir yüzde oranları arasında varyasyon gösterdiği dikkate alınır, değişikliklerle denediğimiz yöntemin de oldukça iyi sayılabilen derecelerde tekrarlanabilen ve güvenilir sonuçlar verdiği anlaşılır.

Çalışmamızda bireysel analiz sonuçlarının dikkate alınmasıyla hesaplanan ortalama aflatoksin kazanç yüzdesi (% 84.84), diğer araştırmaların aynı tür değerleriyle karşılaştırıldığında bir kısım analiz yöntemlerinde (37,49,53) verilen yüzde oranlarına (% 90-94) çok yakın olduğu ve bazı yöntemlere (8,32,50,51) ait bulgulardan (% 20-80) belirgin derecede yüksek olduğu kolayca farkedilir. Basitçe yapılan bu karşılaştırmaya dayanılarak, denenen ekstraksiyon ve temizleme sisteminin de etkin bir aflatoksin geri alım yüzdesi sağladığı söylenebilir.

Nümune ekstraktlarının temizlenmesi aşamasında metalle çöktürme ve sıvı-sıvı dağılım kromatografisiyle yapılan ön temizleme işlemleriyle kolon kromatografisine yansıyan kirliliklerin önemli ölçüde azaltıldığı saptanınca, aflatoksinlerin elüsyonunda kullanılan çözücülerin hacmi (n-hekzan, dietileter, kloroform) 1/3 oranında azaltıldı. Çözücü hacmini azaltmadan yapılan elüsyonlar kadar etkili olduğu anlaşılan bu uygulamayla belirtilen çözücülerin tüketiminde 1/3 oranında ekonomi sağlanabildiği gibi, elüsyon için gereken zaman süresinin de aynı oranda (ortalama yarım saat) kısaltıldığı saptandı.

Sonuç olarak, uygulanan değişikliklerle oluşturulan ekstraksiyon ve temizleme tekniğinin duyarlık düzeyi, tekrarlanabilir nitelikte sonuçlar sağlaması, rezidü kazanç oranı, analiz süresi ve ekonomik oluşuyla, özellikle karma yemlerdeki aflatoksin analizlerinde başarıyla kullanılabileceği kanısına varıldı.

Literatür

- 1- **Allcroft, R., Carnaghan, R.B.A., Sargeant, K. and O'Kelly, J.** (1961): *A toxic factor brasilian groudnut meal.* Vet. Rec. 73, 428-429.
- 2- **Allcroft, R. and Carnaghan, R.B.A.** (1962): *Groudnut toxicity aspergillus flavus toxin in animal products.* Vet. Rec., 74 863-864.
- 3- **Andrellos, P.J. and Reid, G.R.** (1964): *Confirmatory tests for aflatoxin B₁.* Journal of A.O.A.C., 47, 801-803.
- 4- **Arda, M.** (1975): *Mikotoksinler ve mikotoksikozisler.* Vet. Hek. Der. Derg 45., (3), 5-18.
- 5- **Butler, W.H.** (1974): *Aflatoxin.* In *Purchase*, I.F.H. ed. Mycotoxins. Amsterdam, Elsevier, pp. 1-28.
- 6- **Clegg, F. G. and Bryson, H.** (1962): *An outbreak of poisoning in store cattle attributed to brasilian groudnut.* Vet. Rec., 74, 992-994.
- 7- **Demirer, M.A. ve Arkadaşları** (1979): *Piyasada satılmakta olan bazı karma yemlerde ve yem hammaddelerinde aflatoksin B₁ araştırılması.* A. Ü. Vet. Fak. Derg., 26 (1-2), 169-184.
- 8- **Eppley, R.M.** (1966): *A versatile procedure for assay and preparatory separation of-aflatoxins from peanut products.* Journal of A.O.A.C., 49, 1218-1223.
- 9- **Eppley, R.M.** (1968): *Screening methode for zearelenone, aflatoxin and ochratoxine.* Journal of A.O.A.C., 51, 74-78.
- 10- **F.D.A.** (1978): *Assesment of estimated risk resulting from aflatoxins in consomer peanut products and other food commodities.* Washinton, DC, Bureau of Food, U.S. Food and Drug Administration.
- 11- **Fritz, W., Donalht, R. and Engst, R.** (1977): *Determination and occurence of aflatoxin M₁ and B₁ in milk and dairy products.* Nahrung 21,79-84.
- 12- **Goldblatt, L.A.** (1969): *Aflatoxins.* Academic press, N. Y. et Londres, pp. 492.
- 13- **Goldblatt, L.A.** (1972): *Aflatoxin. Scientific background, control and implication.* 2. Ed. Academic Press, N. Y. and London, pp. 472.
- 14- **Horwitz, W., Senzel, A., Reynolds, H. and Park, D.L. Ed.** (1975): *Natural poisoning.* In: Chapter 26. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. Washington, D. C. A. O. A. C., pp. 24-31.
- 15- **I.A.R.C.** (1976): *Aflatoxin.* In: *IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man: Some naturally occurring substances.* Lyons, International Agency For Research On cancer, Vol., 10, pp. 51-72.
- 16- **Jacquet, J., Boutibonnes, P. et Tciermani, A.** (1971): *Recherche des flavocumarines par chromatographie en couche mince. Importance de la discrimination des autres taches fluorescentes.* Bull. Acad. Vet. Fr., 44, 263-275.
- 17- **Jemmali, M. and Murthy, T.R.K.** (1976): *A Chemical assay method for the Determination of aflatoxin residues in animal tissues.* Z. Lebensn. Untersforsch. 161, 13-17.
- 18- **Jones, B.D.** (1972): *Methods of aflatoxin analysis.* Tropical Products Institute, London, pp. 58.
- 19- **Jung, M. and Hansen, E.** (1974): *The occurence of aflatoxin M₁ in dried milk products.* Food Cosmet. Toxicol., 12, 131-138.

- 20- **Keen, P. and Martin, P.** (1971): *Is aflatoxin conceraogenic in man ? The evidence in Swaziland. Tropical and Geographical Medecine*, 23, 44-53.
- 21- **Kiermeiner, R.** (1977): *The significance of aflatoxins in the dairy industry. Annu. Bull. Int. Dairy Fed.* 98, 1-23, 25-43.
- 22- **Labarthe, B.** (1975): *Etude d'une mycotoxine, polluant de denrées alimentaires: l' aflatoxine de l'arachide. L'alim. et la Vie*, 67 (1), 12-25.
- 23- **Loosmore, R.M. and Harding, J.D.S.** (1961): *A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage. Vet. Rec.*, 73 1362-1364.
- 24- **Newberne, P.M. and Butler, W.H.** 1969): *Acute and chronic effects of aflatoxins on the liver of domestics and laboratory animals: A review. Cancer Res.*, 29, 236-250.
- 25- **Pohland, A.E., Yin, L. and Dantzman, J.G.** (1970): *Rapid chemical confirmatory method for aflatoxin B₁: Development of the method. J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53, 101-102.
- 26- **Pons, W.A., Cucullu, A.F. and Lee, S.** (1970): *Determination of aflatoxins in mixed feeds. Proceedings of The third internation. Congress of food Science and technology (SOS/70)*, Washington, DC, 9-14, 705-711,
- 27- **Pons, W.A.** (1976): *Mycotoxins: Resolution of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ by high-pressure liquid chromatography. J. of the A.O.A.C.*, 59 (1), 101-105.
- 28- **Prevot, A., Bloch, C. et Fatoux, P.** (1974): *Problèmes posés par la présenced' aflatoxine échantillonage des graines et tourtaaux d'arachide. Revue Française des Corps Gras.* 21 (10), 567-572.
- 29- **Prior, M.G.** (1976): *Mycotoxin determination on animal feedstufs and tissues in Western Canada. Canadian Journal of Comparative Medecine*, 40 (1), 75-79.
- 30- **Purchase, I.F.H. and Steyn, M.** (1967): *Estimation of aflatoxin M in milk. A.O.A.C.*, 50, 363-366.
- 31- **Purchase, I.F.H.** (1967): *Acute toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one-day old duckling. Fd. Cosmet. Toxicol.*, 5, 339-342.
- 32- **Roberts, B.A. and Patterson, D.S.P.** (1976): *Mycotoxins: Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstufs. Using a novel membrane cleanup procedure. J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58 (6), 1178-1181.
- 33- **Roberts, B.A. and Patterson, D.S.P.** (1976): *Second meeting on mycotoxins in animal disease. Aberdeen-1976, Central Veterinary laboratory, Newhaw, Weybridge, Surrey KT 15 3 NB, p. 40-45.*
- 34- **Roberts, J.C.** (1974): *Aflatoxins and sterigmatocistins. Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 31, 119-151.
- 35- **Rodricks, J.V. and Stoloff, L.** (1977): *Food producing animals. In: Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. and Mehlman, M.A., Ed. Mycotoxins in human and animal health, Park Forest South, IL, U.S.A., Pathotoox Publishers, Inc., pp. 67-79.*
- 36- **Romer, T.R.** (1973): *Determination of aflatoxins in mixed feeds. Journal of the A. O. A. C.*, 56(5), 1111-1115.
- 37- **Romer, T.R.** (1975): *Screening method for the determination of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. Journal of the A.O.A.C.*, 58, 500-506.

- 38- **Romer, T.R.** (1976): *Methods of detecting mycotoxins in mixed feeds and feed ingredient* Feedstuffs, April 19, 18-22.
- 39- **Sargeant, K., Allcroft, R. and Carnaghan, R.B.A.** (1961): *Groundnut toxicity-* Vet. Rec., 73, 865-868.
- 40- **Schoental, R.** (1967): *Aflatoxins* A review. Pharmao., 7, 343-356.
- 41- **Schuller, P.L., Ockhuizen, T.H., Werringloer, J. and Marquardt, P.** (1967): *Aflatoxin B₁ and histamine in wine.* Arzneimittelforschung, 17, 888-890.
- 42- **Schuller, P.L., Vershülsdonk, C.A.H. and Paulsch, W.E.** (1973): *Analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milk.* Pure Appl. Chem., 35, 291-296.
- 43- **Seitz, L.M. and Mohr, H.E.** (1977): *A new method for quantitation of aflatoxin in corn.* Cereal Chem. 54 (1), 179-183.
- 44- **Stack, M.E. and Pohland, A.E.** (1975): *Collaborative study of a method for chemical confirmation of the identity of aflatoxin.* Journal of the A.O.A.C., 58 (1), 110-113.
- 45- **Stoloff, L., Nesheim, S., Yin, L., Rodricks, J.V., Stack, M. and Campbell, A.D.** (1971): *A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin.* Journal of the A.O.A.C., 54 (1), 91-97.
- 46- **Stoloff, L.** (1972): *Analytical methods for mycotoxins.* Clin. Toxicol., 5, 465-494.
- 47- **Şanlı, Y.** (1980): *Besinlerde küflenme olgusu, mikotoksinler ve mikotoksikozisler.* Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi, 3 (3-4), 127-147.
- 48- **Thomas, F., Eppley, R.M. and Truckses, M.W.** (1975): *Rapid screening method for aflatoxins and zearalenone in corn.* Journale of the A.O.A.C., 58 (1), 114-116,
- 49- **Velasco, J.** (1975): *Fluorometric measurement of aflatoxin adsorbed on florasil in minicolumns.* Journal of the A.O.A.C., 58 (4), 757-763.
- 50- **Waltking, A.E., Bleffert, G. and Kiernan, M.** (1968): *An improved rapid physio-chemical assay method for aflatoxin in peanuts and peanut products.* J. Am. Oil Chem. Soc., 45, 880-884.
- 51- **Waltking, A.E.** (1970): *Collaborative study of three methods for determination of aflatoxin in peanuts and peanuts products.* Journal of the A.O.A.C., 53, 104-113.
- 52- **W.H.O.** (1979): *Environmental health Critearia 11, Mycotoxins.* Geneva, World Health Organization, pp. 1-127.
- 53- **Wilson, D.M., Tabor, W.H. and Trucksess, M.W.** (1976): *Screening method for the detection of aflatoxin, ochratoxin, zearalenon, penicillic acide and citrinine.* Journal of the A.O.A.C., 59 (1), 125-127.
- 54- **Zintzen, H.** (1976): *Aflatoksin sorunu.* Vitamin (Roche yayınları), 9, 1-9.