

# Unlarda Aflatoksin B<sub>1</sub> Sorunu

**Dr. Gönül ŞAHİN**

**Prof. Dr. Sema DURU**

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi  
Analitik Toksikoloji ve Bromatoloji Bilim Dalı  
ANKARA

## ÖZET

Sağlıksız depolama koşullarında, insan ve hayvan besinlerinde küf fungusları kolaylıkla üremektedir. Bunların oluşturduğu metabolitlerin insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerini ortaya koymak için yapılan 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 saptanması, aflatoksinlere güncellik kazandırmıştır. Bu araştırmada, günlük diyetimize en çok giren gıda maddesi olan un, örnek olarak seçilmiştir. Un örneklerinin çok toksik ve kanserojenik etkideki aflatoksin B<sub>1</sub> içerip içermediği saptanmaya çalışılmıştır. İncelenen un örneklerinin 5'inde söz konusu fungal metabolit, F. A. O, OMS ve W. H. O.'nin tanıdığı limitlere yakın ve onun üzerindedir.

## GİRİŞ

Mikotoksinlerden olan aflatoksinler, *Aspergillus flavus*'un oluşturduğu çok toksin ve kanserojenik etkide metabolitlerdir. Bunun yanısıra birçok *Aspergillus* ve bazı *Penicillium* genuslarında aflatoksin oluşturabilmektedir. (1-9)

Aflatoksin B<sub>1</sub>, üzerinde en çok duru'an en kuvvetli hücre zehiridir. Akut ve yüksek dozlarda, letal, daha küçük dozlarda, önemli histolojik değişimlere, kronik alınmasında ise tümör indüksiyonuna neden olduğu kesinlik kazanmıştır.

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, 10).

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 sorun 1967 yılında Kanada'ya satılan 10 ton fındığın aflatoksinle bulaşık olması neden gösterilerek geri çevrilmesi ile ortaya çıkmıştır. 1971'de Amerika Birleşik Devletleri'ne sattığımız 45 parti Antep fıstığının 36 partisi aynı nedenlerle geri çevrilmiştir. Daha sonra 1972 yılında Danimarka'ya satılan kuru incirlerde de 938 µg/kg gibi yüksek düzeyde aflatoksin bulunduğu saptanmıştır.

Yapılan bu araştırmadaki, un örnekleri, kanser vakalarına sıklıkla rastlanması nedeniyle ÇORUM iline bağlı Sungurlu İlçesinin Gökçam köyünden toplanmıştır. Örneklerin hepsi evlerde toprak kap veya çuvallarda saklanmakta idi. Bu örneklerde, insan sağlığına en zararlı mikotoksin olan aflatoksin B<sub>1</sub>, nitel ve yarı nicel yöntemlerle araştırıldı. Bir aylık aralarla yinelenen tayinlerde, aflatoksin B<sub>1</sub> miktarının depolama süresine bağlı değişimi, bunun yanısıra nem tayinleri ile, aflatoksin B<sub>1</sub> üzerinde nemin önemi, laboratuvar koşullarımıza ve standart madde miktarımıza en uygun yöntemlerle araştırılmaya çalışılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Un örnekleri, Çorum İline bağlı Sungurlu ilçesinden toplanmıştır. Kullanılan kimyasal maddeler, analitik safliktadır. Standart aflatoksin B<sub>1</sub>, Almanya'dan Dr. Frank, H. K'dan sağlanmıştır.

Uyguladığımız nitel yöntem, ana olarak a) Ekstraksiyon b) Temizleme c) İnce Tabaka Kromatografisine uygulanış ve tanı basamaklarını içermektedir.

Ekstrakt, kolondan geçirilerek temizlendi. 0.3 m kalınlığında, silikajel G adsorbantıyla hazırlanan 20x20 cm'lik ince tabaka plaklarına uygulandı. 366 nm de U. V. ışığında mavi floresans verip vermediği takdirde standart aflatoksin B<sub>1</sub>'in Rf değeri ile Rf karşılaştırılması yapıldı. Aflatoksin B<sub>1</sub> 366 nm de U. V. ışığında belirgin mavi floresans vermesiyle saptanabilir. Araştırmada iki ayrı çözücü sistemde lekeler, floresans, Rf değerleri incelendi. Saptanan Rf değerleri tablo 1'de verilmiştir. Çözücü sistemlerimizin birincisi Benzen-Asetonitrit (80:20) ikincisi Etilasetat-su (50:50) dir. Ayrıca lekeleri aflatoksin B<sub>1</sub>'e ait olup olmadığının, floresans vermesine ilaveten belirteçlerle de kanıtlandı. 2,4-dinitro fenil hidrazin ile mavi % 25'lik sülfürik asit ile sarı, potasyum-demir-3-siyanür-demir-3-klorür ile mavi renk oluşmuştur.

**Tablo 1 : Aflatoksin B<sub>1</sub> Saptanan 5 Un Örneğinin İki Ayrı Çözücü Sistemdeki Rf Değerleri.**

Örnek	I. Sistemde	II. Sistemde
A	0.28 — 0.30	0.47 — 0.49
B	0.29 — 0.30	0.45 — 0.46
C	0.30 — 0.32	0.49 — 0.51
D	0.29 — 0.31	0.47 — 0.48
E	0.28 — 0.29	0.46 — 0.49

Kullandığımız yöntem olanaklarımıza uygun olarak geliştirilmeye çalışılmış olup birkaç yöntemin modifikasyonudur. (12, 13, 14, 15)

Yarı nicel tayin yöntemimizde ana olarak üç basamak içermektedir. a) Ekstraksiyon b) Temizleme c) Minikolon hazırlığı ve kolondan geçirme.

Hazırlanıp, temizlenen ekstrakt, minikolonlardan geçirildi. Mini cam kolonlar, 3 mm iç çapı 10 cm uzunluğundadır. Geçirme işlemi takiben 366 nm de U. V. lâmbası altında floresans bandı olup olmadığına, floresans varsa kolonun hangi tabakalarında olduğu araştırıldı. Floresans bandının yerine göre yarı nicel olarak aflatoksin B<sub>1</sub> miktarı hakkında sonuca gidildi. Çünkü, aflatoksin B<sub>1</sub>'in verdiği mavi flore-

sans bandı, (366 nm de U. V. ışığında) florisil katında ise, toksin miktarı 5 µg/kg dan fazla, florisil-silikajel arasında ise 20 µg/kg dan fazla, florisilden silikajele iyice yayılmış ise 30 µg/kg dan fazladır (14). Aflatoksin B<sub>1</sub> saptanan 5 un örneğinin, 3'ünde mini kolon kromatografisi ile yapılan yarı nicel tayin yöntemiyle 30 µg/kg dan fazla, 2'sinde 20 µg/kg dan fazla olarak saptandı. Çünkü, 3 örnekte floresans bandı silikajel katına yaygındı. 2 örnekte ise, florisil-silikajel arasında idi.

Aflatoksin B<sub>1</sub> saptanan örnekler, nem ve sıcaklığı oldukça değişmeyen, ışıktan uzak olarak, isole odada saklandı. Uygulanan nitel ve yarı nicel yöntem, her ay olmak üzere 3 ay süre ile yinelenildi. Aflatoksin B<sub>1</sub> miktarında değişiklik gözlenemedi. Bu gözlem aflatoksin B<sub>1</sub>'in dayanıklılığı hakkında bilgi vermektedir. Yöntem tekrarlanabilir, olup Rf değerlerinde sapma yoktu.

**Tablo 2 : Aflatoksin B<sub>1</sub> saptanan 5 örneğinin % nem miktarı**

Örnek	% nem miktarı
A	13.98
B	13.12
C	13.21
D	12.23
E	12.56

Gereç ve yöntem bölümünde nitel ve yarı nicel yöntem, 15 un örneğine ayrı ayrı uygulanmıştır.

Tayini yapılan 15 un örneğinin 5'inde aflatoksin B<sub>1</sub> saptanmıştır. 3'ünde 30 µg/kg dan fazla, 2'sinde 20 µg/kg dan fazla saptanmıştır. Bir aylık aralarla yinelenen tayinlerdeki sâbitlik, aflatoksinin dayanıklılığını belirtmektedir. Rf lerdeki değişmezlik, yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Aflatoksin içeren 5 örneğinin, % nem miktarları tablo 2 de görülmektedir. Aflatoksin B<sub>1</sub> saptanan örneklerde nem yüzdesi yüksek düzeydedir.

#### TARTIŞMA

Besinlerde, 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 yapmaya olanak sağlamada

gerekli deney ortamının bulunmasındaki güçlük kullanımı kısıtlar. Ayrıca çok spesifik ve pratik değildir.

Birçok araştırmacı, 4 ana aflatoksini ayırma ve belirleme yöntemi geliştirmeye yönelik çalışmalar yapmıştır. Hemen hemen tüm çalışmalarda ince tabaka kromatografisi esas alınmıştır. Kromatografik yöntemlerde adsorbant olarak, poliamid, silikajel-G-HR, Silikajel H, silikajel G kullanılmışsa da, en kararlı ve iyi sonuçlar bizim de araştırmamızda kullandığımız gibi silikajel G ile alınmıştır. Çalışmanın her basamağında araç, gereç ve eller sodyum hipoklorit çözeltisi ile iyice ve uzun süre yıkanması gerekmektedir.

Literatürde geliştirilmiş çeşitli çözücü sistemler kayıtlıdır. Ancak bu çözücü sistemlerde sürükleme zamanı 40-75 dakika olarak saptanmıştır (16, 17, 18). Bizim araştırmamızda kul-

landığımız ve geliştirdiğimiz iki çözücü sistemde sürükleme zamanı 17-22 dakika gibi daha kısa bir süredir. Rf'lerde sapma çok az, lekelerin sınırı belirgindir.

Üzerinde çalışılan un örneklerinde uyguladığımız yöntemle 15 örnekten 5'inde aflatoksin B<sub>1</sub> saptadık. Nem yüzdesi ile aflatoksin B<sub>1</sub> arasında olumlu bir ilişki vardır.

Örneklerimizdeki 20-30 µg/kg aflatoksin B<sub>1</sub>, FAO, OMS, WHO'nin dünya gıda açığını gözönünde bulundurarak hoş görü içerisinde tanıdığı emniyet limiti olan 30 µg/kg'ı aşmaktadır veya limite çok yakın değerlerdedir (19).

Araştırma sonucu, kötü depolama koşullarında, çok toksik, kanserojenik aflatoksin B<sub>1</sub>'in unlarda oluşabileceğini kanıtladık. Aflatoksinli unların ne şekilde olursa olsun tüketilmesi insan ve hayvan sağlığı için çok tehlikelidir.

#### KAYNAKLAR

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 associates with certain samples of groundnuts». «Nature, 192: 1095.
3. Diener, U.L., and Davis, N.D (1966). «Aflatoxin production by isolated of *Aspergillus flavus*». phytpathol., 56: 1930.
4. Taber, R.A., and Schroeder, N.W. (1967). «Aflatoxin producing of isolates of the *Aspergillus flavus oryzae* group from peanuts». App. Microbiol., 15: 140.
5. Scott, P.M., Wallbeek, W., and Forgaçs, J. (1967). «Formation aflatoxin by *Aspergillus ostianus*». App. 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 Thacher, F.S. (1968). «Mycotoxins from food-borne». Can. J. Microbiolb, 14: 131-137.
9. Hodges, F.A., Züst, J.R., Smith. H.R., Nelson, A.A., Armbrrecht, B.H., and Campbell, A.D. (1964). «Mycotoxins: Aflatoxin isolated from *penicillium puperulum*». Science, 145: 1439.
10. Campbell, Colin T., and Leonard Stoloff (1947). «Implication of mycotoxins for Human Health». J. Agr. Food. Chem., 22: 1006-1013.
11. Köşker, Ö. (1974). Gıda maddelerinde Aflatoksin». Köy İşleri Kooperatifler Bakanlığına verilen rapor.
12. Pons, W.A., Cucullu, A.F., Lee, L.S., Robertson, I.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.
13. Robertson, J.A., Lee, L.S., Cucullu, A.F., and Goldlatt, L.A. (1965). «Assay of aflatoxin in peanuts and peanut products using acetonehexane - water for extraction». J. Am. Oil Chem. Soc., 42: 467-471.
14. Hortwitz, W. (1975). «Naturel Poisons». Assoc. Off. Anal. Chem., 26-462-479.
15. Masri, M.S. (1970). «Extraction partition and column chromatographie separation of aflatoxin B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub>». J. Am. Oil. Chem Soc., 47., 61-64.
16. Enstrom, G.W. (1969). «New solvent systems for thin-Layer chromatography of aflatoxins». J. Chromatog., 44: 128-132.
17. Reddy, T.V., Viswanathan, V.L., Venkittasb ramanian, T.A. (1979). «Thin-Layer chromatography of aflatoxin». Anal. Biochem., 38: 568-570.
18. Steyn. P.S. (1969). «The separation and detection of several mycotoxin by thinlayer chromatography». J. Chromatog., 45. 473-475.
19. Org. Mond. Sante (OMS). (1968). «Les aspects microbiologiques de L'hygiene des denrees alimentaires». Ser, Rapp-tech. Geneve. No: 399, Sayfa 68.