

Saf Aflatoksin Elde Edilmesi Üzerinde Bir Araştırma

Dr. F. Nafi ÇOKSÖYLER

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı II Kontrol Laboratuvar Md. — ANKARA

ÖZET

Bu çalışma araştırma ve kontrol çalışmalarında kullanılabilecek saflikta aflatoksinlerin genel laboratuvar imkanları ile elde edilme olanagını incelemek üzere yapılmıştır.

Bu amaçla nemlendirilerek sterilize edilen pirinç üzerinde *Aspergillus flavus* izolati 28°C'de 10 gün geliştirildikten sonra vasat kloroformla ekstrakte edilmiştir. Yoğunlaştırılan ekstraktan aflatoksinler hegzanla kristalize edilerek ayrıldıktan sonra silikajel HR ile doldurulmuş kolonda ayırma tabi tutulmuş ve kolon kromatografisinin gidişi ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. Saf halde aflatoksin B1 ihtiva eden fraksiyonlar birleştirilip yoğunlaştırılmıştır.

Bu çalışmada 250 g pirinçten 3,9 kromatografik saflikta aflatoksin B1 elde edilmiştir. Yöntem metot bölümünde izah edilmiştir.

SUMMARY

A Study to Obtain Pure Aflatoxins

This study has been done for producing pure aflatoxins in the Laboratory with common equipments, which shall be used in research and control.

For this purpose, *Aspergillus flavus* isolate is developed on moisturized and sterilized rice, at 28°C for 10 days. Substrate is extracted with chloroform and aflatoxins are removed by hexane cristalisation. Aflatoxins are seperated in a column which contain silicagel HR. Seperation process is monitored by TLC. Factions which contain pure aflatoxin B1 are pooled and concentrated.

In this study 3,9 mg chromatographycelly pure aflatoxin B1 is obtained from 250 g rice. Production procedure is explained in «Method» section.

GİRİŞ

Aflatoksinler bifurano kumarin yapısında bir grup mikotoksin olup, 1960 yılında İngilte-

rede «Hindi x hastalığı»nın etmeni olarak keşfedilmiştir. Yürütülen yoğun çalışmaların neticesinde birkaç yıl içinde toksin izole edilmiş, kimyasal yapısı belirlenmiş ve bu toksini oluşturan funguslar bulunmuştur. Yapılan çalışmalar aflatoksinlerin karsinojenik potansiyelle sahip maddeler olduğunu göstermiştir. Halen aflatoksinlerin toksik etkisi, kontrolü ve detoksifikasyonu gibi çeşitli yönleri üzerine yoğun çalışmalar devam etmektedir.

Yurdumuzda ise daha çok kontrolüne yönelik olmakla birlikte eğitim, analiz yöntemi adaptasyonu, biyolojik denemeler ve detoksifikasyon konularında çalışmalar yürütülmektedir. Yapılan çalışmalarda ya materyal ya da standart (referans madde) olarak, amacın gerektirdiği saflikta aflatoksin ihtiyacı duyulmaktadır. Ancak çalışmalar için gerek duyulan aflatoksinin araştırmacı tarafından temini zaman zaman çok zor olmakta ve hatta bu durum aflatoksinle ilgili çalışmaların sayısı ve kapsamını sınırlamaktadır. Dolayısıyla çalışmanın amacına göre yeterli saflikta aflatoksinin araştırma laboratuvarında elde edilmesi, çalışmalara büyük katkıda bulunacaktır.

Yapılan bu çalışma ile aflatoksinlerin genel laboratuvar imkanları ile elde edilirliliğinin bir örneği gösterilmeye çalışılmıştır.

KAYNAK TARAMASI

Robertson ve Ark. (1967) yaptıkları çalışmada *A. flavus* kültürünün sterilize edilmiş mısır üzerinde geliştirilmesi ile üretildiğini ve vasattan kloroform ekstraksiyonu ile ayrıldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu karışık aflatoksinlerin petrol eteri ile çöktürülmesi ve kolon kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırıldığın ve uygun fraksiyonların sıvı dağılımı kolon kromatografisi ve tekrar kristalizasyonu ile çok saf aflatoksin B1 ve G1 elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Stubblefield ve Ark. (1968) *A. flavus* kültürü ile küflendirilmiş buğday ve pirinç vasa-

tından ekstrakte edilen aflatoksinleri bir seri kromatografik kolon ile ayırmıştır, kolon kromatografisinin gidişini ince tabaka kromatografisi ile takip etmişler ve her aflatoksin için bakır karbonat ve ektf kömür ile renk alma işlemi uygulamışlardır.

Rodricks (1969) çok saf aflatoksin B1, B2, G1 ve G2'nin *A. flavus* kültüründen elde edilmesi için bir metot tarif etmiştir. Buna göre dört aflatoksin diğer yabancı maddelerden, ekstraktın asidik alümina kolondan geçirilmesi ile ve birbirlerinden silikajel kolon vasıtası ile ayrılmaktadırlar. Araştırmacı aflatoksin B2 ve G2'yi aflatoksin B1, B2, G1, G2 karışımının hidrojenasyonu takiben silikajel kolondan geçirilerek ayırmaları ile elde edildiğini ve sentetik B2 ve G2'nin tabii oluşmuş aflatoksin B2 ve G2'den önemli aflatoksin farklılıkları olmadığını belirtmiştir.

Wiley ve Weiss (1968) piriç üzerindeki *A. flavus* kültürünün kloroform ile elde edilen ekstraktını «Skelly Solve B» ile çöktürmüş ve 100-200 meshlik kolondan etil-asetat kullanarak elue etmişler ve renkli diğer maddelerden ayırmışlardır. Araştırmacılar karışımdaki farklı aflatoksinleri ayırmada ince tabaka kromatografisi için silikajel H, sephadex LH-20 kullanmışlardır.

Chu (1971) tarafından tarif edilen metoda göre kolon kromatografisinde sabit faz olarak adsorbansil-5'in kullanılması ile tek bir kromatografik aşamada önemli miktarda saf aflatoksin B1, G1 elde edilebilmektedir. Araştırmacı methionin ile zenginleştirilmiş piriç üzerine *A. flavus* kültürünün gelişiminin takiben vasatın aseton ve kloroformla ekstrakte edildiğini, yoğunlaştırılan ekstraktta ham toksin kısmının hezganla çöktürüldüğünü, bunu takiben kolon kromatografisi ile ayrıldığını ve bu ayrımın spektrofotometre ve ince tabaka kromatografisi ile takip edildiğini belirtmiştir.

Anonymoos (1984) aflatoksinlerin saflık kriterleri olarak biri kromatografik ve diğeri spektrofotometrik üç kriter belirlenmiştir. Buna göre saflığı kontrol edilecek aflatoksinden 50 ng'lık bir miktar belirtilen ince tabaka kromatografisi ile incelendiğinde içinde diğer aflatok-

sinlere ait herhangi bir benek bulunmamalıdır. Ayrıca belirtilen yöntemle incelendiğinde molar absorpsansları ve absorpsiyon pik oranları verilen güven sınırları arasında olmalıdır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bu çalışmada, aflatoksinlerin üretiminde, vasat olarak piriç ve kültür olarak toksijenik *Aspergillus flavus* izolatlarından yararlanılmıştır. Toksinlerin ayırımında ve saflaştırılmasında çeşitli organik solventler, silikajel ve hazır dolgu kolonlar kullanılmıştır.

Yöntem

1. Toksin üretiminde kullanılan *A. flavus* Kültürünün Spor Suspansiyonunun Hazırlanması.

Bu amaçla diğer bir çalışmada (Çoksöyler ve Özkaya,—) izole edilen ve aflatoksin B1 ve aflatoksin B2 oluşturduğu belirlenmiş olan bir izolattan yararlanılmıştır.

A. flavus şuşu petri kutusunda PDA üzerine sürme yöntemi ile ekilip, 25°C'de 7 gün inkübe edilerek sporların gelişimi sağlanmıştır. Daha sonra 5 ml damıtık su ile bu sporlar aseptik şartlar altında suspansiyon haline getirilmiş ve toksin üretiminde kullanılacak olan vasatın aşılmasında bu spor suspansiyonu kullanılmıştır.

2. Aflatoksinlerin Üretilmesi ve Ekstraksiyonu.

Vasat olarak kullanılacak 220 g piriç 1 lt'lik erlenmayere konulduktan sonra üzerine (miktarı ön denemelerle belirlenen) yaklaşık 50 ml damıtık su ilave edilmiştir. Erlenmayer içine 40 cm. boyunda bir cam baget yerleştirildikten sonra ağız pamukla kapatılarak 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Daha sonra vasat aseptik şartlar altında 5 ml spor suspansiyonu ile aşılmalı ve 25°C'de 10 gün inkübe edilmiştir. Vasat gerek inokülasyon anında ve gerekse inkübasyon periyodunda günde iki defa olmak üzere içindeki baget ile karıştırılarak fungusun üniform olarak gelişmesi ve vasatın bloklanmaması sağlanmıştır.

İnkübasyonun bitimini takiben vasat üzerine 1 lt kloroform ilave edilip bagetle 3 saat süre ile karıştırılarak ekstrakte edilmiş ve kloroform ekstraktı içinde 50 g anhidrit sodyum sülfat bulunan katlanmış filtre kağıdından (Whatmann No. 4) süzülerek ayrılmıştır.

Döner vakümlü evaporatörde 5-6 ml'ye konsantre edilen ekstrakt vial alınmıştır. Vialdeki ekstrakt üzerine damla damla hegzan ilave ederek kristalleşip çökmesi sağlanmış ve çökelti birkaç kez hegzan ile yıkandıktan sonra kolon kromatografisi için sekianmıştır.

3. Aflatoksinlerin Saflaştırılması.

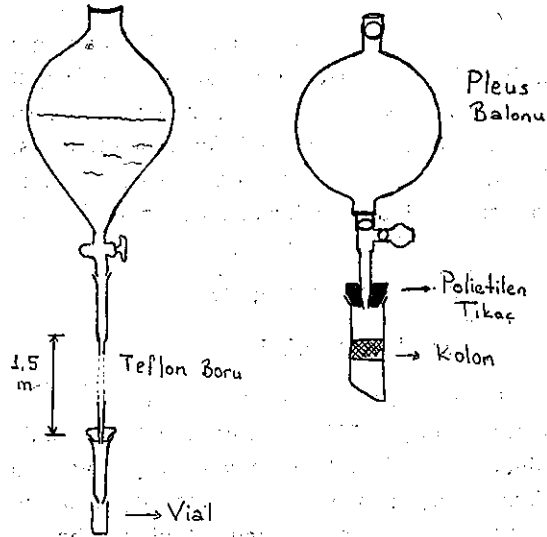
Aflatoksinlerin saflaştırılmasında esas olarak CHU (1971)'den yararlanılmıştır. Ancak araştırmacı tarafından kullanılan 2,5 x 50 cm'lik kolon yerine 2 cm çaplı bir kolon ve adsorbansil —5 yerine silikajel HR kullanılmıştır. Aynı kromatografik şartların sağlanabilmesi için tüm adsorbent ve solventler kolon kesit alanı oranında (1/1,5) azaltılmıştır.

Buna göre 40 g silikajel HR 250 ml benzen içinde süspansiyon haline getirildikten ve içinde hiç hava kabarcığı kalmayınca kadar (yaklaşık 1 saat) ultrasonik banyoda tutulduktan sonra bir kısmı kolona boşaltılmıştır. Silikajel'in çökmesiyle üstte oluşan benzen tabakası kolonun musluğunu açarak alınmış ve üstte oluşan boşluğa erlende kalan süspansiyonun bir daha kısmı eklenmiştir. Bu işlem tekrarlanarak erlendeki silikajel'in tamamı kolona doldurulmuştur. Bu işlem yaklaşık 5 saat sürmüş, kolonda silikajel yüksekliği 33 cm olmuştur. Silikajel'in üst yüzeyinin tam yatay ve düz bir yüzey olduğu gözlemlendikten sonra anhidrit sodyum sülfat 1 cm yüksekliğinde bir tabaka oluşturacak şekilde silikajel üst yüzeyini bozmaksızın kolona doldurulmuştur. Bu durumda kolonun üstünde 5 cm'lik bir solvent boşluğu kalmıştır.

Ekstraktın 0,36 g'lık bir kısmı 5 ml benzenle çözülüp bir pipetle damla damla sodyum sülfat tabakasının yüzeyine ilave edilmiştir. Numune seviyesi sodyum sülfat seviyesine inince vial 5 ml benzen ile çalkalanıp aynı şekilde kolona uygulanmıştır. Bu işleme ekstrakt tamamen silikajel'in yüzeyine inene kadar (2-3 defa) devam edilmiştir.

Kolondan önce 350 ml benzen geçirilmiştir. Ancak akışın CHU (1971) tarafından belirtildiği gibi 60-120 ml/saat'e (bu çalışmada 40-80 ml/saat) ayarlayabilmek için Şekil 1'de görülen düzenek oluşturulmuştur.

Kolonun üstündeki solvent boşluğu (5 cm) tamamen benzenle doldurulduktan sonra, şekilde görülen polietilen tıkaç ile sıkı bir şekilde kapanmıştır. Kolondan 1,5 m kadar yükseklikte duran rezervuar ince bir boru ile polietilen tıkaçın ortasındaki cam boruya bağlanmıştır. Ortamda hava kabarcığı kalmaması için bu bağlanma rezervuar, ve teflon boru benzen ile dolu durumda iken yapılmıştır. Bu durumda rezervuar bulunduğu statif üzerinde aşağı yukarı hareket ettirilerek kolon çıkış hızı 40 ml/saat'e ayarlanmıştır.



Şekil 1 : Kolonda numune tatbiki için (b) ve Solventin geçirilmesi için (a) devamlı ve kontrol edilebilir bir basınç elde edilebilmesi için geliştirilen düzenek.

Rezervuardaki benzen seviyesinin yaklaşık 1 cm'ye inmesini takiben rezervuara aflatoksinleri elue edecek olan benzen-kloroform (1:1) karışımı konmuş ve bu andan itibaren eluat 10 ar ml'lik fazlar halinde viallere alınmıştır. Vialler sıra ile numaralandırılmış ve herbiri ince tabaka kromatografisi ile incelenmiştir. Aflatoksinlerin bitimini takiben kromatografiye son verilmiştir.

4. Aflatoksin Miktarı Tayini

Kloroform ekstraktında ve kolondan alınan fraksiyonlarda ince tabaka kromatografisi yöntemi ve densitometrik tayin ile aflatoksin miktarı tayini yapılmıştır. (Anonymous 1984).

Ayrıca eluatların 350 nm civarında Benzen: Metanol (1:1)'e karşı maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyu tesbit edilmiş ve bu dalga boyunda absorbanları ölçülerek bu fraksiyonlarda aflatoksin miktarındaki değişim takip edilmiştir (Chu 1971).

5. Aflatoksinlerin Doğrulanması

Çeşitli aşamalarda görülen aflatoksinler Anonymous (1984)'de belirtilen yöntemlerle doğrulanmıştır.

6. Aflatoksinlerin Kromatografik Safılıklarının Tayini

Viallerde bulunan eluat fraksiyonlarının herbirinden yaklaşık 50 ng kadar aflatoksin ihtiva eden bir miktarı Anonymous (1984)'de belirtildiği şekilde ince tabaka kromatografisi ile ayırma tabi tutularak kromatogramında başka her hangi bir aflatoksine eşdeğer olan bir benek olup olmadığı incelenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

1. Aflatoksin Üretimi

Çeşitli defalar yapılan fermentasyon işleminde yaklaşık 250 g pirinç vasatından elde edilen kuru ekstraktın miktarı 1 g civarında oluşmuştur. En son yapılan üretimde ekstraktta 11,4 mg B1 ve 0,24 mg B2 olduğu hesaplanmıştır. Wiley ve Weiss (1968) *A. flavus* No: 2999 ile fermente edilmiş 4,5 kg pirinçten 3 defa kloroformla ekstrakte ederek 7,55 g ham ekstrakt elde edildiğini ve bunun 5,2 g aflatoksin içerdiğini belirtmişlerdir.

Stablefield ve Ark. (1968) ise 2 kg buğdaydan 1,5 g B1; 0,15 g B2; 1,9 g G1 ve 0,25 g G2; 2 kg pirinçten 2 g B1, 0,15 g B2, 0,3 g G1 ve 0,044 g G2 elde edildiğini ve ekstraktın % 70-80 oranında aflatoksinde oluştuğunu belirtmişlerdir.

Robertson ve Ark. (1967) ise 150 g buğdaydan fermentasyon sonunda % 60 safılıkta 500 mg ekstrakt elde etmişlerdir.

Bu kaynaklarla karşılaştırıldığında yapılan bu çalışmada elde edilen kuru ekstraktın miktarının fazla ama elde edilen aflatoksinin oranında oldukça az olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni fermentasyon şartları ve seçilen suşun aflatoksin oluşturma gücünün düşüklüğü olabileceği gibi vasattan tüm aflatoksinin ekstrakte edilememiş olması da düşünülebilir.

2. Aflatoksinin Saflaştırılması

Aflatoksinin kloroformda çözülerek hegzan ilavesi ile kristalleştirilmesi, kristallerin yıkılması ve bu işlemin tekrarlanmasıyla saflaştırmaya sınırlı da olsa katkıda bulunduğu görülmüştür. Ancak elde edilen toksinin azlığı ve gerekli olan «grove box» gibi ekipmanların olmaması nedeniyle bu işlemde saflaştırmada daha fazla yararlanılamamıştır.

Metot bölümünde belirtilmemiş olmakla birlikte aflatoksinlerin, sıvı kromatografisi hazır kolonu (u porasil). CB yöntemi ekstrakt temizleme kolonu, hazır silika kartuş temizleme kolonu, preparatif ince tabaka kromatografisi gibi çeşitli kromatografik yöntemlerle ayırımı için çalışılmış ama yeterli bir başarı elde edilememiştir. Ayrıca metotta belirtilen preparatif kolonda farklı solvent sistemleri denenmişse de iyi bir ayırım elde edilememiştir. Bu nedenle çalışma ön denemelerde başarılı olduğu görülen Chu (1971) tarafından kullanılan yöntemle yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan yöntemde numunenin kolona tatbikinde çok büyük olan kolon basıncını yenebilmek için Şekil 1'de görüldüğü gibi pleus balonu ile oluşturulan bir düzenek kullanılmıştır. Düzenek çok basit olmakla birlikte numunenin kolona tatbikinde çok kolay kontrol edilebilir bir basınç sağlanmıştır.

Benzer şekilde kolondan solvent geçişini kontrol edebilmek için rezervuarın yüksekliğinin ayarlanması oldukça kullanışlı olmuş, ayarlanabilir ve düzenli bir akış hızı sağlanmıştır.

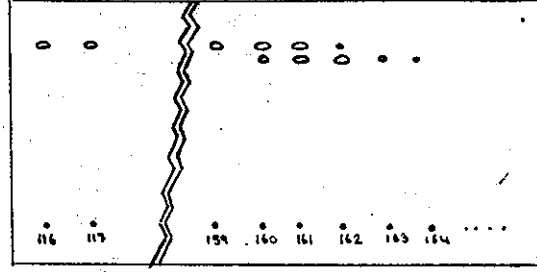
Yine bu çalışmalarda aflatoksinlerin kolonda hareketinin takibinde karanlık odada düşük güçte uzun dalga boyunda bir UV lambasının çok yararı olmuştur. Böylece yalnız aflatoksin bantlarının kolondan çıkışı sırasındaki eluatın toplanması ile işlemde tasarruf edile-

bilmektedir. Ancak aflatoksinlerin parçalanmasına neden olmamak için asil prepatif ayırmada UV lambası kullanılmamış hatta kolon alüminyum kağıt ile sarılmıştır.

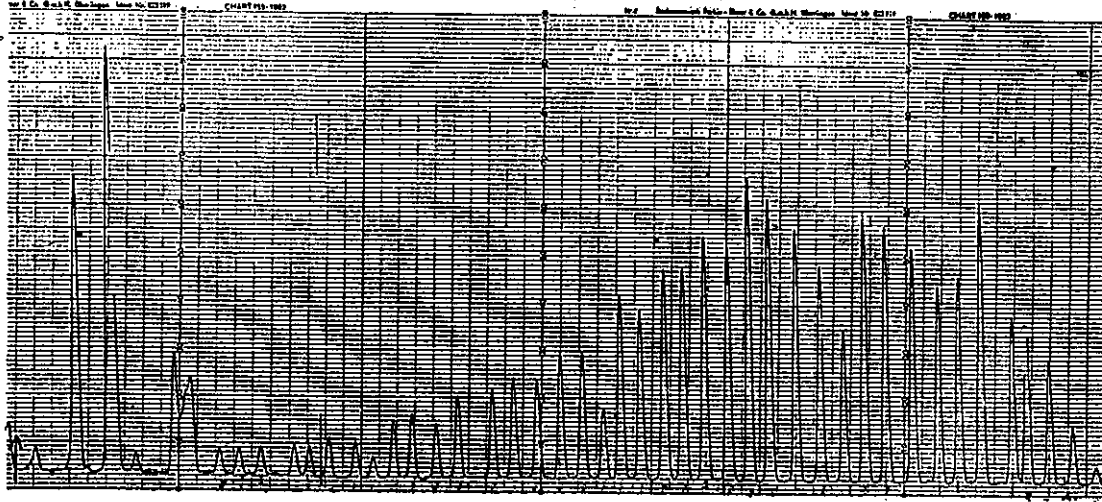
Ön deneylerle ayırmanın şartları belirlendikten sonra asil çalışmada 0,36 g'lık kuru ekstrakt kolona uygulanmış ve eluat benzen:kloroform (1:1) solventinin uygulandığı andan itibaren viallere alınmaya başlanmıştır. Aflatoksinlerin kolondan çıkışı ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir.

Aflatoksinler kromatografinin 39. uncu saatinde 116. vialde aflatoksin B1 ile çıkmaya başlamış ve kromatografik ayırma 172. fraksiyonda son verilmiştir. Şekil 2'de bu fraksiyon-

lara ait ince tabaka kromatogramları ve Şekil 3'de buradaki beneklerin floresans yoğunluklarına ait pikler görülmektedir.



Şekil 2. Kolondan alınan aflatoksin fraksiyonlarına ait şematik ince tabaka kromatogramları



Şekil 3. Kolondan alınan aflatoksin fraksiyonlarının floresans yoğunluklarına ait pikler

Şekillerde görüldüğü gibi 116 nolu viallerden 159'a kadar olan viallerde yalnız aflatoksin B1 bulunmaktadır. Aflatoksin B1 140 nci vialden itibaren giderek azalmaktadır. Aflatoksin B2 ise sarı bir pigmente birlikte 160 nolu vialde başlamış ve 161'de çok yoğun olarak çıkmıştır. Ancak bu fraksiyon yine iz miktarda B1 ihtiva etmektedir. Daha sonraki tüplerde B2 tek başına bulunmakta olup 161'den itibaren çok düşük seviyeye inmiştir.

Aynı durum Şekil 3'de bu beneklerin floresans yoğunlukları ile alınan kroma-

togramlarında görülmektedir. Bu kromatogramlarda pik boyları viallerdeki aflatoksin konsantrasyonuna göre biraz kıvrık yapmış bir çan eğrisi oluşturmaktadır. Bu durum preparatif kolon kromatografisi için karakteristik sayılabilir.

Bu piklerin standart pikleri ile mukayesesi yapılarak her vialdeki aflatoksin konsantrasyonunu Çizelge 1'de verilmiştir. Yine Çizelge 1'de aflatoksin konsantrasyonu değişiminin bir ölçüsü olmak üzere bunların 360 nm'deki absorbansları, vialdeki fraksiyonun hacmi ve ihtiva ettiği aflatoksin miktarı verilmiştir.

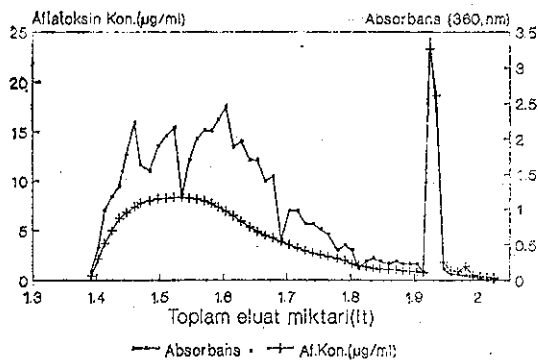
Çizelge 1, 116-171 No.lu fraksiyonların hacim, aflatoksin miktarı ve 360 nm deki absorbanları

Fr. No.	Pik boyu (mm)	Aft. kons. (ug/ml)	Aflatoksin miktarı (ug)		Solvent miktarı (ml)		Absorbans
			Fr.	Top.	Fr.	Top.	
116	3	0,81	8,91	8,91	11,0	1391	0,054
117	12	3,24	37,26	46,17	11,5	1402,5	0,293
118	26	7,02	70,2	116,37	10,0	1412,5	0,513
119	31	8,37	100,44	216,81	12,0	1424,5	0,695
120	35	9,45	108,68	325,49	11,5	1436	0,868
121	47	12,69	139,59	465,08	11,0	1447	0,956
122	59	15,93	215,06	680,13	13,5	1460,5	1,030
123	43	11,61	104,49	784,62	9,0	1469,5	1,093
124	41	11,07	160,52	945,14	14,5	1484	1,120
125	50	13,5	175,5	1120,64	13,0	1497	1,148
126	54	14,58	189,54	1310,18	13,0	1510	1,155
127	57	15,39	184,68	1494,86	12,0	1522	1,168
128	32	8,64	103,68	1598,53	12,0	1534	1,166
129	45	12,15	139,72	1738,26	11,5	1545,5	1,165
130	53	14,31	171,72	1909,98	12,0	1557,5	1,149
131	56	15,12	173,88	2083,86	11,5	1569,5	1,123
132	56	15,12	181,44	2265,3	12,0	1581	1,084
133	60	16,2	178,2	2443,5	11,0	1592	1,032
134	65	17,55	210,6	2654,1	12,0	1604	0,972
135	50	13,5	155,25	2809,35	11,5	1615,5	0,910
136	52	14,04	178,31	2987,66	12,7	1628,2	0,831
137	45	12,15	157,95	3145,61	13,0	1641,2	0,749
138	45	12,15	154,30	3299,9	12,7	1653,9	0,686
139	37	9,99	121,88	3421,79	12,2	1666,1	0,622
140	39	10,53	131,62	3553,41	12,5	1678,1	0,593
141	15	4,05	50,62	3604,04	12,5	1691,1	0,537
142	26	7,02	85,64	3689,68	12,2	1703,1	0,495
143	26	7,02	89,15	3778,84	12,7	1716	0,448
144	21	5,67	69,17	3848,01	12,2	1728,2	0,41,0
145	21	5,67	69,17	3917,19	12,2	1740,4	0,379
146	19	5,13	61,56	3978,75	12,0	1752,4	0,353
147	17	4,59	52,78	4031,53	11,5	1763,9	0,326
148	11	2,97	41,58	4073,11	14,0	1777,9	0,302
149	13	3,51	44,577	4117,69	12,7	1790,6	0,276
150	11	2,97	32,67	4150,36	11,0	1801,6	0,225
151	4	1,08	11,556	4161,92	10,7	1812,3	0,203
152	7	1,89	22,113	4184,03	11,7	1820	0,185
153	8	2,16	23,76	4207,79	11,0	1835	0,169
154	7	1,89	19,845	4227,63	10,5	1845,5	0,155
155	6	1,62	22,194	4249,8	13,7	1859,2	0,148
156	7	1,89	23,058	4272,89	12,2	1871,4	0,138

Çizelge 1. 116-171 No.lu fraksiyonların hacim, aflatoksin miktarı ve 360 nm'deki absorpsanları (Devamı)

Fr. No.	Pik boyu (mm)	Aft. kons. (ug/ml)	Aflatoksin miktarı (ug)		Solvent miktarı (ml)		Absorbans
			Fr.	Top.	Fr.	Top.	
157	6	1,62	17,01	4289,89	10,5	1881,9	0,127
158	6	1,62	17,82	4307,71	11,0	1892,9	0,118
159	6	1,62	18,63	4326,34	11,5	1904,4	0,113
160	3	0,810	8,100	4334,44	10,0	1914,4	0,099
161	90	24,3	243	4577,44	10,0	1924,4	3,263
162	63	17,01	170,1	4747,54	10,0	1934,4	2,611
163	4	1,08	12,636	4760,18	11,7	1946,1	0,250
164	2	0,54	5,94	4766,12	11,0	1957,1	0,130
165	2	0,54	6,05	4772,16	11,2	1968,3	0,112
166	1,5	0,405	4,7385	4776,90	11,7	1980	0,193
167	1	0,27	3,294	4780,2	12,2	1992,2	0,062
168	0,5	0,135	1,485	4781,68	11,0	2003,2	0,040
170	0	0	0	4781,68	10,5	2024,7	0,027
169	0	0	0	4781,68	11,0	2014,2	0,042
171	0	0	0	4781,68	10,5	2035,2	0,018

Çizelgedeki floresansa dayanan konsantrasyon değerleri ile absorpsan değerleri vialdeki eluat hacimleri dikkate alınarak bir grafik haline getirildiğinde Şekil 4'de olduğu gibi yapılan bu preparatif kolon kromatografisinin absorpsan ve floresans kromatogramları elde edilmiştir.



Şekil 4. Kolondan alınan aflatoksinin solvent fraksiyon numarasına bağlı olarak değişimi.

Her üç şekilde (Şekil 2, 3, 4) görüldüğü gibi 116-159 nolu fraksiyonlar arasında aflatoksin B1 oldukça temiz bir şekilde ayrılmıştır.

Aflatoksin B2 ve 161 nolu fraksiyon ile çıkmaya başlamış ve 162 nolu fraksiyonda maksimuma ulaştıktan 2-3 fraksiyon sonra görülmez miktara inmiştir. Aflatoksin B2 miktarının hızla azaldığı bu 2-3 fraksiyonda aflatoksin B1'den ayrı olarak görülebilmektedir. Diğer araştırmalarda ilk kromatografide aflatoksin B2'nin az çok diğer aflatoksinlerle bulaşık olduğunu ve tam olarak ayrılabilmesi için yeniden kolon kromatografisine gereklilik duyulduğunu belirtmişlerdir (Stubble field ve Ark. 1968). Yine bir kısım araştırmacı aflatoksin B2'yi B1'in hidrojensasyonu ile yarı sentetik olarak elde etmişlerdir (Rodricks 1969).

Çizelge 1'de her vialdeki aflatoksin miktarı görülmektedir. Bunlardan aflatoksin B1'in oldukça saf gözüktüğü fraksiyonlar birleştirilerek toplam 3,9 mg saf aflatoksin B1 elde edilmiştir. Kolona tatbik edilen 0,36 g ekstraktta ise 11,4 mg aflatoksin B1 bulunduğu hesaplanmıştır. Bu durumra kolona tatbik edilen aflatoksinin önemli bir bölümü saf olarak elde edilmiştir.

Ancak elde edilen aflatoksin miktarı araştırmalarla karşılaştırıldığında oldukça düşüktür.

Her fraksiyonda alınan 40-60 ng'lık bir kısım, hazır TLC plakasına tatbik edilerek ANONYMOUS (1984)'de belirtildiği gibi kromatografik saflıkları incelenmiştir. 116'dan 159'a kadar numaralı olan fraksiyonların hiçbiri aflatoksin B1 dışında tesbit edilebilir miktarda B2 veya başka bir aflatoksin ihtiva etmediği gözlenmiştir. Ancak, bu fraksiyonlarda orjin civarında diğer araştırmacılarında belirttiği çok soluk bazı benekler görülmüştür. Bu durumda tüm bu fraksiyonların kromatografik saflıkları ANONYMOUS (1984)'e göre yeterli sayılabilir. Kalitatif veya yarı kantitatif standart olarak kullanılabilir durumdadır. Elde edilen aflatoksin B1'in çok az olması nedeniyle ANONYMOUS (1984)'de belirtilen spektrofotometrik saflık kontrolü uygulanamamıştır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada ANONYMOUS (1984)'de belirtilen kriterlere dayanarak kromatografik olarak yeterli saflıkta, fakat spektrofotometrik saflığı belirlenmemiş yaklaşık 4 mg civarında aflatoksin B1 elde edilmiştir.

Elde edilen aflatoksin, bir kontrol laboratuvarı imkanları ile yapılan deneysel çalışmalarda materyal olarak ve kalitatif veya yarı kantitatif aflatoksin tayininde standart olarak kullanılabilir saflıktadır.

Elde edilen aflatoksin miktarı oldukça az olmakla birlikte demonstratif olarak bu işlemin yapılabilirliğinin göstermesi yönünden yeterli görülebilir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- ANONYMOUS 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Sa. 14 th Ed. Washigton, DC 20044.
- CHU, F.S. 1971. Chromatography of Crude Aflatoxins on Adsorbosil - 5. J. AOAC Vol: 54 (6) 1304 - 1306.
- ÇOKSÖYLER, F.N. ve Ş. ÖZKAYA. — Türkiye'de Gıdalarda Yaygın Olarak Görtülen Funguslar ve Bunların Mikotoksin Oluşturma Durumları Üzerinde Araştırmalar. Yayınlanmamış Araştırma Projesi.
- ROBERTSON, J.A., W.A. PONS, and L.A. GOLDBLATT, 1967. Preparation of Aflatoxins and Determination of Their Ultraviolet and Fluorescent Characteristic. J. Agr. Food Chem. Vol: 51, (5), 798 - 801.
- STUBBLEFIELD, R.D., O.L. SHOTWELL and G.M. SHANNON, 1968. Aflatoxins B1, B2, G1 and G2: Separation and Purification. J. AOCS Vol: 45 686 - 687.
- WILEY M. and A.C. WAISS Jr. 1968. An Improved Separation of Aflatoxins. J. AOCS Vol: 45 870 - 871.