

**T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA ÜRÜNLERİNDE İMMÜNO AFİNİTE  
KOLONUNDA TEMİZLEME (CLEAN UP)  
İŞLEMİNDEN SONRA İYOT  
TÜREVLENDİRMESİ YAPILARAK HPLC İLE  
AFLATOKSİN B1, B2, G1, G2 TÜREVLERİNİN  
TAYİNİ**

**Kadir Serdar ÇELİK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR  
TEMMUZ 2010**

**T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA ÜRÜNLERİNDE İMMÜNO AFİNİTE  
KOLONUNDA TEMİZLEME (CLEAN UP)  
İŞLEMİNDEN SONRA İYOT  
TÜREVLENDİRMESİ YAPILARAK HPLC İLE  
AFLATOKSİN B1, B2, G1, G2 TÜREVLERİNİN  
TAYİNİ**

**Kadir Serdar ÇELİK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN : Yrd. Doç. Dr. M. Zahir DÜZ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR  
TEMMUZ 2010**

## ÖZ

Bu araştırmada Diyarbakır ilinde satışa sunulan 15 tür gıda örneklerinden (kişniş, karabiber, siyah pul biber, kırmızı pul biber, Antep fıstığı, toz biber, kekik, nohut, pirinç, fındık, mercimek, buğday, tarçın, nane, mısır) toplamda 45 gıda örneğindeki Aflatoksin G2, G1, B2, B1 miktarları HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. Alınan 15 tür örneğin sadece 5 türünde tespit edilebilir düzeyde aflatoksin belirlenmiş olup, diğer örneklerdeki aflatoksin derişimlerinin tayin sınırının altında olduğu belirlenmiştir. Analiz edilen örneklerden kırmızı pul biber türünde,

Deneylerden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kırmızı pul örneklerinden birindeki Aflatoksin türlerinin derişimlerinin Türk Gıda Kodeksinde bulunmasına müsaade edilen maksimum değerleri aştığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Aflatoksin, Baharat Ürünleri, Tahıl Ürünleri, HPLC, Kolon Sonrası Türevlendirme

## **ABSTRACT**

In the present investigation, amounts of aflatoxin G2, G1 B2 and B1 in 15 type food samples (coriander, black pepper, black chili pepper, red chili pepper, pistachio, powdered pepper, thyme, pea, rice, hazelnut, lentil, wheat, cinnamon, mint and corn) out of totally 45, which are commercially available in Diyarbakır were studied by HPLC method. Among the 15 type samples, aflatoxin was determined in detectable level in only 5 types and it was not found at a detectable level in the other samples.

When the results obtained from experiments were evaluated it was observed that one of the red chili pepper sample exceeds the maximum aflatoxin level determined by Turkish Food Codex Regulation.

**Keywords:** Aflatoxin, Spice Products, Grain Products, HPLC, Post Column Derivatization

## TEŞEKKÜR

Çalışma konumun seçilmesinden sonuçlanma aşamasına gelinceye kadar ki süreçte değerli katkılarından dolayı danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Mehmet Zahir DÜZ'e, konuya ilişkin engin tecrübelerinden yararlanma fırsatı verdiği için Arş. Gör Ersin KILINÇ' a, tez çalışmalarıma süresince bana yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Erdener KİŐİN ve Kimyasal Analiz Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma, yüksek lisans öğrenimim süresince desteğini esirgemeyen bölüm ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Berrin ZİYADANOĞULLARI'na, katkılarından dolayı Dicle Üniversitesi Kimya Bölümü Akademisyenlerine ve beni sürekli teşvik ederek destekleyen aileme teşekkürü borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
1.1 ÇİZELGE VE ŞEKİLLER.....	4
1.2 KAYNAKLAR.....	4
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. MİKOTOKSİNLER.....	5
2.2. MİKOTOKSİNLERİN ÖNEMİ, OLUŞMA ŞARTLARI VE SINIFLANDIRILMASI.....	6
2.3. MİKOTOKSİN OLUSUMUNUN ÖNLENMESİ VE BERTARAF EDİLMESİ.....	8
2.4. AFLATOKSİNLER.....	9
2.4.1. Aflatoksinlerin Yapısı.....	10
2.4.2. Aflatoksinlerin Olusumunu Etkileyen Faktörler.....	13
2.4.3. Aflatoksinlerin Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	15
2.4.3.1. İnsanlarda Aflatoksinin Etkileri.....	16
2.4.4. Gıdalarda Aflatoksin.....	18
2.4.4.1. Bitkisel Gıdalarda Aflatoksin.....	19
2.4.4.2. Hayvansal Gıdalarda Aflatoksin.....	20
2.4.5. Aflatoksinleri Belirleme Metotları.....	22
2.4.5.1. Immunoafinite Kolon Kromatografisi Yöntemi.....	22
2.4.5.2. Minikolon Görüntüleme Yöntemi.....	23
2.4.5.3. İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi.....	24
2.4.5.4. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Yöntemi.....	24
2.4.5.5. HPLC (High Performance Liquid Cromatography) Yöntemi.....	26
2.5 KAYNAKLAR.....	29

<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>36</b>
3.1. MATERYAL.....	36
3.1.1. Tahıl ve Baharat Ürünleri.....	36
3.1.2. Aflatoksin Standartı.....	36
3.1.3. Kimyasal Maddeler.....	36
3.1.4. Makine ve Teçhizat.....	37
3.2. METOT.....	37
3.2.1. Metot.....	37
3.2.2. Ekstraksiyon.....	38
3.2.3. HPLC'de Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 Düzeylerinin Saptanması.....	39
3.3 ÇİZELGE VE ŞEKİLLER.....	40
3.4 KAYNAKLAR.....	40
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>40</b>
4.1. EKSTRAKSİYON İŞLEMİ VE GERİ KAZANIM ORANLARI.....	40
4.2. BAHARAT ÜRÜNLERİ ANALİZLERİ.....	46
4.3. TAHIL ÜRÜNLERİNDE AFLATOKSİN ANALİZLERİ.....	47
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>48</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>50</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>50</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

TABLO 2. 1 GIDALARDA BULUNAN ÖNEMLİ MİKOTOKSİNLER VE BUNLARI ÜRETEN KÜFLER.....	7
TABLO 2. 2 MİKOTOKSİN OLUŞUMUNU ETKİLEYEN BAŞLICA FAKTÖRLER .....	8
TABLO 2. 3 BAZI ÖNEMLİ AFLATOKSİNLERİN MOLEKÜLER FORMÜLÜ, AĞIRLIĞI VE ERİME NOKTASI.....	12
TABLO 2. 4 TÜRKİYE VE AB ÜLKELERİNDE AFLATOKSİNLERE DAİR YÜRÜRLÜKTEKİ LİMİTLER.....	17
TABLO 3. 1 HPLC PARAMETRELERİ .....	39
TABLO 4. 1 KALİBRASYON STANDARTLARI İÇİN KONSANTRASYON VE ALAN DEĞERLERİ.....	40
TABLO 4. 2 ANALİZ EDİLEN BAHARAT ÜRÜNLERİNDE BELİRLENEN AFLATOKSİN MİKTARI (N=3).....	45
TABLO 4. 3 GERİ KAZANIM ORANLARI (N=3).....	46
TABLO 4. 4 ANALİZ EDİLEN TAHİL ÜRÜNLERİNDE BELİRLENEN AFLATOKSİN MİKTARI (N=3).....	47



## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2. 1 AFLATOKSİN B1, B2, G1, G2, M1 VE M2'NİN KİMYASAL YAPILARI .....	12
ŞEKİL 4. 1 TABLO 4.1'DE VERİLEN KALİBRASYON VERİLERİNE AİT KROMATOGRAM.....	41
ŞEKİL 4. 2 EN DÜŞÜK KONSANTRASYONDAKİ STANDART KARIŞIMI İÇİN ALINAN KROMATOGRAM .....	41
ŞEKİL 4. 3 AFLATOKSİN G2 STANDARDI KALİBRASYON EĞRİSİ .....	42
ŞEKİL 4. 4 AFLATOKSİN G1 STANDARDI KALİBRASYON EĞRİSİ .....	42
ŞEKİL 4. 5 AFLATOKSİN B2 STANDARDI KALİBRASYON EĞRİSİ .....	43
ŞEKİL 4. 6 AFLATOKSİN B1 STANDARDI KALİBRASYON EĞRİSİ .....	43

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AB</b>	: Avrupa Birliği
<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>AFB<sub>1</sub></b>	: Aflatoksin B <sub>1</sub>
<b>AFB<sub>2</sub></b>	: Aflatoksin B <sub>2</sub>
<b>AFG<sub>1</sub></b>	: Aflatoksin G <sub>1</sub>
<b>AFG<sub>2</sub></b>	: Aflatoksin G <sub>2</sub>
<b>AFGM<sub>1</sub></b>	: Aflatoksin GM <sub>1</sub>
<b>AFGM<sub>2</sub></b>	: Aflatoksin GM <sub>2</sub>
<b>AOAC</b>	: Association of Official Analytical Chemists
<b>ELISA</b>	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>HPLC</b>	: High Performance Liquid Chromatography
<b>IARC</b>	: International Agency for Research on Cancer
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>PBS</b>	: Fosfat Buffer Saline
<b>PDA</b>	: Potato Dekstroz Agar
<b>ppb</b>	: Parts Per Billion
<b>ppm</b>	: Parts Per Million
<b>TLC</b>	: Thin Layer Chromatography
<b>mV</b>	: Mili Volt
<b>UV</b>	: Ultraviolet

## 1.GİRİŞ

Günlük yaşantımızda sık görülen ve hemen her çeşit gıda maddesinde üreyebilen küfler, son yıllarda üzerinde önemle durulan bir araştırma konusu olmuştur. Küfler, uygun koşullarda ham ve işlenmiş materyalde çoğalarak bir yandan ürünün kalite ve kantitesini değiştirip bozulmasına neden olmakta diğer yandan da insan sağlığı için az veya çok zararlı toksik maddeler oluşturmaktadırlar.

*A.flavus*'un birçok ırkı aflatoksin meydana getirmedığı halde yaygın olarak bulunması ve karbonhidratça zengin substratlar üzerinde çok geniş sıcaklık sınırları içinde gelişebilmesi, doğada aflatoksin oluşumunu teşvik edici öğelerdir. Arpa, fasulye, mısır, pamuk tohumu, pirinç, buğday, yer fıstığı, ceviz, kakao, Antep fıstığı, fındık, incir, baharatlar, zeytin, ayçiçeği gibi birçok üründe doğal olarak belirlenmiştir.

Doğada aflatoksin oluşumunu teşvik eden ana faktörler, yüksek sıcaklık ve yüksek nem koşullarıdır. Bu nedenle, mikotoksinler yeryüzündeki tüm ülkelerin sorunu olarak belirtilirken aflatoksinler, tropik ve subtropik kuşakta sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Tarla koşullarında zararlıların yapmış olduğu hasarlar, çiğ düşmesi gibi faktörler, aflatoksin oluşumunu sınırlayıcı etki yapabilmektedir.

Aflatoksin sentezleyen küfler dünyada yaygın şekilde bulunurlar. Gerek üretim gerekse depolama aşamasında şartlar uygun olduğunda gıda maddelerinde gelişerek aflatoksin sentezleyebilir<sup>1</sup>.

Aflatoksinler, insan ve bütün hayvanlarda zehirli etkiye sahiptir. Ayrıca aflatoksinler bilinen en güçlü karaciğer karsinojeni olup insan ve hayvanlarda karsinojenik, mutajenik, teratojenik, nefrotoksik, immun sistemde zayıflama ve verim düşüklüğü gibi etkilere neden olurlar<sup>2,3</sup>.

Aflatoksinler ultraviyole ışık altında ışımaya yaptıkları renge göre isimlendirilmekte ve mavi ışımaya yapanlar B, yeşilimsi mavi ışımaya yapanlar da G ile gösterilmektedir. Daha çok sayıda aflatoksin olmasına rağmen en önemlileri B1, B2, G1, G2, B2n, G2n, M1, M2, GM1, GM2, M2n, GM2n, P1, aflatoksikol ve dihidroaflatoksikol'dur.

Bunlar içinde ilk dördü (B1, B2, G1 ve G2 ) diğerlerine göre çok daha yaygın bulunur. B2 (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>), B1 (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) in; G2 (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>) ise G1 (C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>) in dihidro türevidir. M grubu aflatoksinler ise ilk olarak sütte belirlenmiş olmaları nedeni ile M ile isimlendirilmişlerdir. Ancak süttten başka, vücutta safra salgısında ve idrarda da saptanmıştır.

Aflatoksin M'lerin ortak özelliği, hidroksil grubunun son furan halkasında C-2 pozisyonunda olmayıp C-4 pozisyonunda olmasıdır. Görüldüğü gibi, aflatoksinlerin temel yapıları benzemekle birlikte bileşimlerdeki küçük farklılıklar toksisiteleri üzerinde etkili olabilmektedir.

Aflatoksin analizleri, genel olarak immünolojik ve kromatografik teknikler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. İmmünolojik olarak aflatoksin analizinde özellikle ELISA test kitleri belirgin olarak öne çıkmaktadır. Kromatografik tekniklerde ise immüno afinite kolon kromatografisi yöntemi, mini kolon görüntüleme yöntemi, ince tabaka kromatografisi ve yüksek basıçlı sıvı kromatografisi yöntemleri aflatoksin analizlerinde ön yeterli duyarlılık ve düşük tayin limitleri ile ön plana çıkmaktadır.

Bu çalışmanın amacı Diyarbakır'da tüketilmekte olan baharat ve tahıl ürünlerindeki AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2 türlerinin HPLC ile analizlerinin yapılarak ulusal standartlara uygunluğunun belirlenmesidir. Yapılan literatür taramasında ilimizde tüketilmekte olan baharat ve tahıl ürünlerindeki aflatoksin düzeylerinin tespiti için yapılmış bir çalışma olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmada hem bu konudaki referans olabilecek niteliğindeki çalışmamızla literatür boşluğunun giderilmesi ve hem de günlük hayatta bölgemizde yoğun olarak tüketilmekte olan baharat ve tahıl ürünlerinin ulusal standartlara uygunluğunun araştırılması hedeflenmektedir. Bu amaçla ters faz ayırma tekniği ile ayrılan aflatoksin türleri iyot ile türevlendirilerek floresan dedektör ile tayin edilmiştir.

## **1.2 KAYNAKLAR**

1. Wood GE. Aflatoxin M<sub>1</sub> Mycotoxin and Phytoalexins, Sharma R. P. and Salunkhe D. K. (Editors). 1991; 145-163.
2. FAO. Prevention of mycotoxins. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Nutrition paper. Rome, 1979; 10.
3. Castegnaro M, Gregor MC. Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. Rev Med Vet. 1998; 671-678.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. MİKOTOKSİNLER

Küflerin salgıladıkları sağlık için zararlı sekonder metabolitlere mikotoksin adı verilmektedir. Mikotoksin terimi Yunanca “mukoz” ve Latince zehir anlamına gelen “toxicum” kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Bu toksinler, insanlarda ve hayvanlarda bazı hastalıklara sebep olmaları yanında birlikte büyük ekonomik zararlara da yol açmaktadırlar <sup>1,2</sup>.

Mikotoksinlerden kaynaklanan hastalıklara genel olarak mikotoksikozis adı verilmektedir. Küflerin neden olduğu en eski mikotoksikozis olayı “Claviceps purpurea” toksinleri ile enfekte olan çavdarların yenmesi sonucu görülen ‘ergotizm’ dir. Diğer önemli mikotoksikozis olayı ikinci dünya savaşı sırasında Rusya da görülmüştür. Bu olayda depo edilen bozuk tanelerden elde edilen besinleri tüketen insanlardan bazıları hayatını kaybetmiştir <sup>3</sup>.

Mikotoksinler çok eskiden beri bilindiği halde dünya çapında anlaşılması ve irdelenmesi 1960 yılında İngiltere de aflatoksinle kontamine olmuş yemle beslenen yüz bin civarında hindi ölümleri ile başlamıştır. Hastalığa ilk olarak “Turkey X” adı verilmiştir. Turkey X hastalığının ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra civcivlerde ve ördek yavrularında da toksikolojik zehirlenmeler görülmüştür. Bu hastalık kanatlı hayvanlarda akut hepatit nekroz, akut iştahsızlık kaybı, kanatlılarda zayıflık ve uyuşukluk gibi belirtilerle karakterize edilmiştir <sup>4</sup>.

Ülkemizde aflatoksin sorunu 1960'lı yıllarda gündeme gelmeye başlamıştır. İhraç ürünlerimizde sıklıkla aflatoksin görülmeye başlamış, büyük ekonomik kayıplara neden olmuştur. 1967 yılında Kanada'ya gönderilen 10 ton fındık ile 1971 yılında ABD'ye ihraç edilen 45 parti Antep fıstığının 31 partisi aflatoksin içerdiği gerekçesiyle iade edilmiştir. Daha sonraki yıllarda da bu sorunu azaltabilmek için birçok çalışma yapılmıştır <sup>5,6</sup>.

## **2.2. MİKOTOKSİNLERİN ÖNEMİ, OLUŞMA ŞARTLARI VE SINIFLANDIRILMASI**

Mikotoksin oluşturan küfler çoğunlukla Deuteromycetes sınıfına ait olan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria* ve *Byssochlamys* cinslerindedir. Sayıları tam olarak bilinmemekle birlikte doğada 300.000'in üzerinde küf olduğu tahmin edilmektedir. Toksin oluşturan küf sayısı ise yaklaşık 200'ün üzerindedir. Bunların oluşturduğu mikotoksin sayısı da yaklaşık 100 civarındadır<sup>7,8</sup>. Tablo 2.1 de gıdalarda ve yemlerde sıklıkla rastlanılan mikotoksinler ve üretici funguslar gösterilmiştir<sup>9</sup>.



<b>Mikotoksinler</b>	<b>Toksini Üreten Funguslar</b>
Aflatoksin	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. Parasiticus</i> , <i>A. Nomius</i>
Alternaria tokenleri	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alt. Tenuissima</i>
Sitrinin	<i>A. terreus</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. Citrinum</i> , <i>P. Citreonigrum</i> , <i>P. puberulum</i>
Siklopiazonikasit	<i>Asp. flavus</i> , <i>Asp. tamarii</i> , <i>Pen. camambertii</i> , <i>Pen. griseofulvum</i> , <i>Pen. puberulum</i>
Fusarium toksinleri: - Trikotesen - Zearalenon	<i>Fus. culmorum</i> , <i>Fus. equiseti</i> , <i>Fus. graminearum</i> , <i>Fus. moniliforme</i> , <i>Fus. poae</i> , <i>Fus. sambucinum</i> , <i>Fus. sporotrichioides</i> , <i>Fus. verticillioides</i>
Okratoksin A	<i>Asp. achraceus</i> Gr., <i>Asp. alutaceus</i> , <i>Asp. fresenii</i> , <i>Eur. herbariorum</i> , <i>Pen. verrucosum</i> Chemotyp I ve II
Patulin	<i>Asp. clavatus</i> , <i>Asp. terreus</i> , <i>Bys. fulva</i> , <i>Bys. nivea</i> , <i>Pae. variotii</i> , <i>Pen. griseofulvum</i> , <i>Pen. expansum</i> , <i>Pen. roquefortii</i> Chemotyp II
Penisilikasit	<i>Asp. alutaceus</i> , <i>Pen. auratiogriseum</i> , <i>Pen. roquefortii</i> Chemotyp II, <i>Pen. simplicissimum</i> , <i>Pen. raistrickii</i> , <i>Pen. viridicatum</i>
Sterigmatosistin	<i>Asp. versicolor</i> , <i>Emer. nidulans</i> , <i>Eurotium spp.</i> (iz miktarda)

**Tablo 2. 1** Gıdalarda bulunan önemli mikotoksinler ve bunları üreten küfler

Mikotoksinler insanlarda ve hayvanlarda kanserojenik ya da toksik etkilere yol açan kimyasal maddelerdir<sup>10, 11</sup>. Gıda ve yemdeki su miktarı % 14'ün üzerine çıkınca ve ortam sıcaklığı 25-30 °C de ise küfler gelişerek mikotoksin üretebilirler<sup>7,8</sup>. Mikotoksinlerin toksikolojik yönden önemi; akut ve kronik zehirlenmelere neden olmalarının yanında mikotoksinle kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen hayvansal gıdalar aracılığıyla da bunların insanlara geçebilmesi ve toplum sağlığı açısından sorun yaratabilmelerinden kaynaklanmaktadır<sup>12,13</sup>. Mikotoksinlerin güçlü doğal toksik etkilerinin bulunması, oldukça yaygın olmaları ve doğal şartlarda oluşabilmelerinden dolayı, son yıllardaki önemi daha da artmıştır

Mikotoksinlere fındık, fıstık, badem, ceviz gibi çerezlik gıdalarda; buğday, arpa, mısır, yulaf gibi tahıllarda; yağlı tohumlardan susam, kolza ve ayçiçeğinde; kurutulmuş meyvelerde ve bazı baharatlarda sıklıkla rastlanılmaktadır<sup>15</sup>. Yapılan bir araştırmada kontamine arpa ve üzümden yapılan bira ve şaraplarda da mikotoksin varlığı tespit edilmistir<sup>16</sup>. Mikotoksin oluşumu çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerden etkilenmektedir. Bu faktörler Tablo 2.2 de belirtilmiştir<sup>6</sup>.

<b>Fiziksel Etkenler</b>	<b>Kimyasal Etkenler</b>	<b>Biyolojik Etkenler</b>
Bağıl Nem	Mineral İçeriği	Bitki Türü
Sıcaklık	O <sub>2</sub>	Hastalık Zararı
Kurutma Hızı	CO <sub>2</sub>	Mikrobiyal Yük
Kızışma	Substratın Özelliği	Böcek Zararı
Mekanik Parçalanma	Kimyasal İşlemler	Bitki Stresi

**Tablo 2. 2** Mikotoksin oluşumunu etkileyen başlıca faktörler

### **2.3. MİKOTOKSİN OLUSUMUNUN ÖNLENMESİ VE BERTARAF EDİLMESİ**

Gıda ve yemlerde mikotoksin oluşumunu önlemek için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. En iyi metot gıda ve yemlerde küf gelişimini önlemektir. Küf gelişimi önlenememişse oluşan mikotoksini ortamdaki ayırmak veya parçalamak gerekir. Küf gelişimini önlemek için düşük veya yüksek sıcaklık, düşük nem, ışınlama, kontrollü atmosfer ve kimyasal koruyucular uygulanmaktadır. Ancak bütün bu uygulamalara rağmen küf gelişimi görülebilmekte bunun sonucu olarak da, oluşan küfler toksin oluşturabilmektedir.

Küf gelişimi ile küfün toksin oluşturabilme şartları farklı olduğu için küf gelişimi görüldüğü halde ortamda mikotoksin olmayabilir. Ayrıca küfleri ortamdaki uzaklaştırmak için 50-55 °C sıcaklık yeterli iken, toksinler 200-250 °C sıcaklıklar da ancak parçalanabilmektedir<sup>8</sup>.

## 2.4. AFLATOKSİNLER

Aflatoksinler *Aspergillus* cinsine ait olan *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* tarafından üretilen potansiyel toksik, kanserojen sekonder metabolitlerdir. Bunların dışında *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Streptomyces* cinsleri de belirtilmiş ise de yapılan küf izolant taramasında aflatoksinle rastlanmamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla üçüncü bir tür olan *Aspergillus nomius* bunlara eklenmiştir. Aflatoksin terimi *Aspergillus* (A-), *flavus* (-fla-) ve toksin kelimelerinden türetilmiştir<sup>17-20</sup>. Aflatoksinlerin neden olduğu akut, subakut ve kronik olarak seyreden mikotoksikozise, aflatoksikozis adı verilir<sup>15,21</sup>.

Görünür şekilde küflenmiş gıdalar yenilmediği için, mikotoksinlerle akut zehirlenme ihtimali oldukça azdır. Uzun dönemde az miktarda alınan aflatoksin karaciğer, böbrek vb. organlara olan zehirli, mutajen ve kanserojen yapıcı etkileri daha önemlidir<sup>10</sup>. Aflatoksinler, karaciğer kanserinin en önemli nedenlerinden biri olarak tanımlanmıştır. AFB1 olarak diyetdeki 1 ppb seviyesi karaciğer tümörünün oluşması için yeterli miktardır. Aflatoksinlere bağlı karaciğer kanserinin Afrika kıtasında diğer kıtalara göre görülme oranı daha fazladır<sup>22</sup>.

Aflatoksin en fazla bitkisel gıdalarda görülmekle birlikte bazı hayvansal ürünlerde de aflatoksine rastlanabilmektedir. Fındık, Antep fıstığı, badem, yerfıstığı en riskli gıdalardır. Tahıllardan buğday, mısır, arpa, çavdar ve yulaflar aflatoksin oluşumuna duyarlıdır. Yağlı tohumlardan susam, kolza, ayçiçeği ve pamuk tohumları; baharatlardan kırmızı biber, karabiber, kişnişte de bu toksinlere sıklıkla rastlanır. Sakatatlar ile süt ve süt ürünleri gibi hayvansal ürünler de riskli gıdalar gurubuna girmektedir <sup>15,23</sup>.

#### **2.4.1. Aflatoksinlerin Yapısı**

Aflatoksinler, B1, B2, G1 ve G2 olmak üzere 4 ana gruba ayrılmışlardır. Aflatoksin B1 ve G2'in yapısı 1965 yılında belirlenmiş, tam konfigürasyonu ise 1967 yılında ortaya konulmuştur. Aflatoksin moleküllerinin temel yapısı, yoğunlaşmış bir bisfuran/kumarin halka siteminden ibarettir. Aflatoksin B2 ve G2 sırasıyla aflatoksin B1 ve G1'in dihidro türevleridir <sup>24,25</sup>.

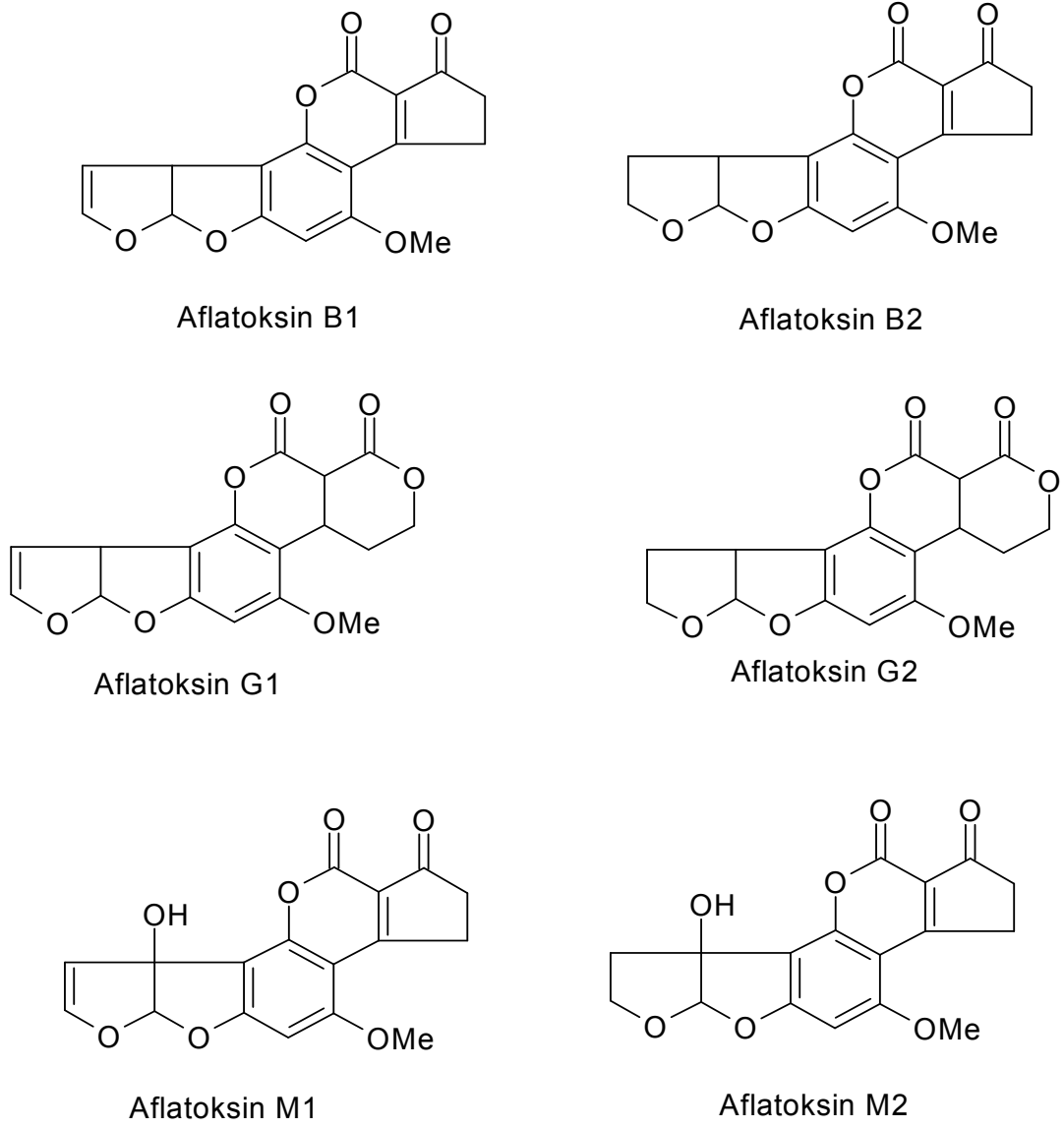
Aflatoksin B1 metabolizması sırasında, içlerinde aflatoksin M1'in de bulunduğu bazı metabolitler üretilir. AFM1, hayvan veya insanın AFB1'i vücuduna aldıktan sonra sütünde ve idrarında tespit edilmiştir <sup>26,27</sup>.

Aflatoksinlerin isimlendirilmesinde UV ışığı altında verdikleri renklerin İngilizce bas harfleri kullanılmıştır. Aflatoksin B1 ve B2 uzun dalgalı UV ışığa maruz kaldığında mavi flüoresan ışık verirken, aflatoksin G1 ve G2 aynı şartlarda yeşil floresan ışık verir, Bu durum, bu toksinlerin ince tabaka kromatografisi gibi fizikokimyasal metotlar kullanılarak belirlenmesine fırsat vermiştir.

Aflatoksinler, metanol, hekzan, aseton ve kloroform gibi bazı çözücülerde çözünürler ve birçoğu substrat ekstraksiyonunda kullanılır<sup>25</sup>.

Günümüzde ise aflatoksinler, doğal olarak küfler tarafından üretilenler ile hayvan veya insan vücudunda oluşanlar olmak üzere sayıları 18 i bulmuştur. Bunlar B1, B2, G1, G2, M1, M2, B2a, B3, G2a, GM1, GM2, GM2a, M2a, P1, Q1, Ro ve aflatoksikol şeklinde isimlendirilmişlerdir. Bunlardan en önemli ve toksik etkileri yüksek olan B1, B2, G1, G2, M1 ve M2'in kimyasal yapıları Şekil 2.1 de gösterilmiştir<sup>28</sup>

Bazı önemli aflatoksin bileşiklerinin moleküler formülü, moleküler ağırlığı ve erime noktası Tablo 2.3 de verilmiştir<sup>29</sup>.



**Şekil 2. 1** Aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1 ve M2'nin kimyasal yapıları

Aflatoxin	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Erime Noktası (°C)
B1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269
B2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289
G1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246
G2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240
M1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299
M2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	203

**Tablo 2. 3** Bazı önemli aflatoxinlerin moleküler formülü, ağırlığı ve erime noktası

## 2.4.2. Aflatoksinlerin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Aflatoksin oluşumunu etkileyen faktörleri dört kategori de sınıflandırmak mümkündür. Bunlar; fiziksel, kimyasal, substratın içeriği ve biyolojik faktörlerdir. Fiziksel etkiler; sıcaklık, su aktivitesi, pH, nem, hava ve atmosferdeki gaz oranları şeklinde sıralanabilir. *Aspergillus*'lar mezofilik karakterli küfler olup 6-8 °C den 50 – 60 °C ye kadar gelişip çoğalabilmektedirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 35-38 °C iken toksini 25-30 °C'lerde oluşturmaktadır.

Ancak diğer etkenlere de bağlı olarak 7.5--40 °C arasında aflatoksini üretebildiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur<sup>30, 15</sup>. Normal ısılarda oldukça stabil olan aflatoksinleri ortamdan tamamen uzaklaştırabilmek için 300 °C'nin üzerindeki sıcaklıklara ihtiyaç vardır. Kısa süreli yüksek ısıda pastörizasyon ile sütlerdeki aflatoksin miktarında azalma olmadığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir<sup>31, 5</sup>.

Aflatoksin oluşturan küfler yüksek düzeyde aflatoksin oluşturmaları için gereken optimum pH aralığı 5.0-6.0'dır. Aflatoksinler çok düşük veya yüksek pH larda (3'ten az ve 10'dan büyük) ve ultraviyole (UV) ısınına maruz kaldıklarında bu aktivitelerini hızla yitirdikleri belirlenmiştir<sup>15, 32</sup>. Aflatoksinler % 15 ve üzeri nem içeren gıda ve yemlerde kolayca üreyerek mikotoksin sentezleyebilmektedir. Küfler % 12 – 13' den daha düşük nem seviyesinde yok olmaz, ancak küf gelişimi belirgin derecede azalırken küf toksisitesinde herhangi bir değişiklik olmamaktadır<sup>33, 5, 34</sup>

Düşük tuz konsantrasyonları (% 1-3 NaCl) küflerin gelişimini ve toksin oluşturmalarını olumlu etkilemekte, % 8 NaCl'de toksin oluşumu sınırlanmakta ve % 14 de ise küf gelişimi tamamen durmaktadır. Küf gelişimi ve aflatoksin üretimini azaltmak için çeşitli kimyasal yöntemler denenmiştir. Aflatoksin; çinko, manganeye karşı duyarlıdır. Kadmiyum ve demir karışımı da küf gelişimini ve aflatoksin oluşumunu baskılamaktadır <sup>35</sup>.

Aflatoksin oluşumunu etkileyen biyolojik etkenler ise; bitki çeşidi, böcek ve hasat sırasında meydana gelen yaralanmalar, mikroorganizma yükü ve substrat içeriği şeklinde sıralanabilir. Toksin sentezlemede en uygun substrat genellikle karbonhidratça zengin ürünlerdir. Glukoz, galaktoz ve sakkaroz en uygun substratlardır. Ayrıca küf gelişimi, maltoz ve laktoz da kısmen görülürken, şeker alkollerinden sorbitol ve mannitolde gelişme görülmez <sup>15, 6, 5</sup>.

Yapılan bir araştırmada *A. flavus* ve *A. parasiticus* toksik suşları çeşitli gıdalara aşılınmış ve bunlardan susam tohumlarının yüksek seviyede toksin oluşturan en iyi substrat olduğu saptanmıştır <sup>36</sup>.



### 2.4.3. Aflatoksinlerin Canlılar Üzerindeki Etkileri

Aflatoksinlerin neden olduğu akut, subakut ve kronik olarak seyreden mikotoksikosis; aflatoksikosis adı verilir. Gıdalarda ve yemlerde sıklıkla rastlanılan aflatoksinlerin toksisite sıralaması; AFB1>AFM1=AFG1>AFB2>AFG2>AFM2 şeklindedir<sup>15, 24</sup>. Hayvan türlerinin hiçbiri, aflatoksinlerin akut toksik etkilerine karşı dirençli değildir. At, sığır, domuz, koyun, keçi, rat, tavuk, ördek ve gökkuşuğu alabalığı gibi hayvanlar aflatoksinlere karşı oldukça duyarlıdır. Düşük konsantrasyonlarda bile kontamine yemlerin tüketimi, aflatoksinlere duyarlı olan bu hayvanlarda 72 saat içinde ölüme yol açmaktadır<sup>33, 24</sup>.

Aflatoksinlerle akut zehirlenmede hayvanlarda; burun akıntısı, solunum güçlüğü, kanlı diyare, akut karaciğer hasarı, iç organlarda kanamalar gibi belirtiler görülmekte ve ölüme sonuçlanmaktadır. Hayvanlarda akut seyreden aflatoksikosisde direkt etkilenen organ karaciğerdir. Toksinler karaciğere yerleştikten sonra lipit infiltrasyonu, hepatositlerde nekroza ya da ölüme yol açmaktadır<sup>37</sup>.

Aflatoksinlerin subakut etkileri; iştahsızlık, diyare, karaciğer hasarı, bağışıklık sisteminde zayıflama, kanamalı bağırsak yangısı ve trombosit sayısında azalma şeklinde ortaya çıkmaktadır. Trombosit sayısında azalma kanın pıhtılaşma yeteneğinin bozulması ve kapiler damarların kolayca çatlayabilmesi sonucu iç kanamalar meydana gelmektedir<sup>38, 5</sup>.

Aflatoksinlerin hayvanlardaki kronik belirtileri; besini reddetme, gelişiminde yavaşlama, halsizlik, zayıflama ve hafif diyare şeklindedir. İnsanlarda ise; bağışıklık sistemini zayıflatarak, çeşitli enfeksiyonlara karşı vücudun direncini azaltmaktadırlar<sup>5</sup>.

#### **2.4.3.1. İnsanlarda Aflatoksinin Etkileri**

Toksinlerin insan sağlığı üzerine etkileri bireylerin bağışıklık sistemi, beslenme durumu, yaş, cinsiyet gibi özellikler bağlı olarak değişmektedir<sup>17</sup>. Aflatoksinlerin insan sağlığı üzerine etkileri akut ve kronik etki olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Aflatoksinlerin akut etkilerine bağlı ölümlere çeşitli tarihlerde rastlanmaktadır.

Aflatoksin kontaminasyonu ile ilgili önemli bir vaka, 1974 yılında Hindistan'ın Kuzeybatısında, 900 – 1100 ppb mikotoksin kontamine olmuş mısırlardan tüketen 397 kişinin şiddetli aflatoksizden zarar görmesi ve 108 kişinin ölümüdür. Kenya da 2004 ve 2005 yıllarında ortaya çıkan başka bir aflatoksikozis olayında 150'den fazla kişi hayatını kaybetmiştir.

Aflatoksinlerin akut ve kronik toksisitesi ile kanserojenik potansiyeli, ülkemizde ve bazı ülkelerde kabul edilebilir maksimum limitler bakımından düzenlemeler yapılmasına yol açmıştır.

Tüketicilere ve hayvanlara bulaşan kontamine gıda ve yem maddelerindeki toksini azaltmak için çeşitli düzenlemeler yayınlanmaktadır. 1995 yılında en az 77 ülkede, gıda ve yemler için mikotoksin düzenlemesi yapılmıştır. 1998 yılında Avrupa Birliği, tahıl, süt, fındık ve kurutulmuş meyve gibi insanlar tarafından yaygın olarak tüketilen gıdalar için toplam ve AFB1 miktarı olarak sırasıyla 4 ve 2 ppb'lik bir limit belirlemiştir. Bu limitler, standartları sağlamak ve uluslar arası ticareti kolaylaştırmak için çıkarılmıştır. Tablo 2.4 de AB ülkelerinde aflatoksinlere dair yürürlükteki limitler gösterilmektedir. Ülkemizde yürürlükte bulunan limitler AB ülkelerinde uygulanan limitlerle paralellik göstermektedir<sup>25, 39</sup>.

<b>Gıda Maddesi</b>	<b>Maksimum limit (µg/kg)</b>		
	<b>B<sub>1</sub></b>	<b>B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub></b>	<b>M<sub>1</sub></b>
<b>2.1. AFLATOKSİN</b>			
2.1.1. Fındık, antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yer fıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5,0 <sup>(1)</sup>	10,0 <sup>(1)</sup>	-
2.1.2. Yerfıstığı (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0 <sup>(1)</sup>	15,0 <sup>(1)</sup>	-
2.1.3. Tahıllar (karabuğday ( <i>Fagopyrum</i> sp.) dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan tüketilen veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2,0	4,0	-
2.1.4. Mısır (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	-
2.1.5. Çiğ süt <sup>(2)</sup> , ısıtılmış işlem görmüş süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,050
2.1.6. Baharatların aşağıdaki türleri için; - Kırmızıbiber ( <i>Capsicum</i> spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, kırmızıbiber ve acı kırmızıbiberin bütün ve toz hali dahil) - Karabiber ( <i>Piper</i> spp.) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) - Hintceviz/Muskat ( <i>Myristica fragrans</i> ) - Zencefil ( <i>Zingiber officinale</i> ) - Zerdeçal ( <i>Curcuma longa</i> )	5,0	10,0	-
2.1.7. Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları <sup>(3)</sup>	0,10	-	-
2.1.8. Bebek formülleri ve devam formülleri <sup>(4)</sup> (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0,025
2.1.9. Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar <sup>(5)</sup>	0,10	-	0,025
2.1.10. Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	5,0	10,0	0,5

<sup>(1)</sup> Maksimum limit yerfıstığı, fındık ve kuru meyvelerin yenilebilir kısımlarına uygulanır. Fındık, kabuklarıyla analiz edilecek ise aflatoksin içeriği hesaplanırken bulaşanın tümünün yenilebilir kısım üzerinden olduğu kabul edilir.

**Tablo 2. 4** Türkiye ve AB ülkelerinde aflatoksinlere dair yürürlükteki limitler

Sonuç olarak toksinler insanlarda; karaciğer kanserine ve gen yapısında değişikliklere neden olur, hormonal dengeyi bozar, kısırlığa, sakat ve ölü doğumlara yol açar, gıda ve vitamin emilimini azaltır ve bağışıklık sistemini zayıflatarak vücudu hastalıklara açık hale getirmektedir <sup>6</sup>.

#### **2.4.4. Gıdalarda Aflatoksin**

Aflatoksinlere genellikle bitkisel ürünlerde rastlanmakla birlikte bazı hayvansal ürünlerde de toksinlere rastlanabilmektedir. Bitkisel ürünlere küf bulaşması hasattan önce ve hasat sırasında olmakla birlikte, küflerin üremesi ve aflatoksin sentezi en çok depolama sırasında olmaktadır. Bu nedenle aflatoksin oluşumu önlenmesinde en iyi strateji, ürünlerin doğru olarak depolanması ve hijyenik şartlara uygun şekilde işlenmesi olacaktır. Gıda maddeleri içinde fındık, yer fıstığı, Antep fıstığı, badem, ceviz, ayçiçeği gibi yağlı tohumlarda ve bunların ürünleri olan fıstık ezmesi, fındık ezmesi ve badem ezmesinde; buğday, arpa, mısır gibi tahıllarda ve bu tahıl ürünlerinde, karabiber, pul biber, kırmızı toz biber, kimyon gibi baharatlar da kurutulmuş meyvelerden incirde, süt, et ve yumurta gibi hayvansal ürünler de aflatoksinler bulunabilmektedir. Bahsi geçen gıda maddelerinde uygun şartlar oluştuğunda küf üremesinin ve toksin sentezinin daha sıklıkla görülmesi nedeni bu gıda maddelerinde küflerin çoğalmaları için gerekli olan kullanılabilir serbest su miktarının yüksek olmasındandır <sup>24, 28</sup>.

Gıda maddelerindeki en yüksek toplam aflatoksin miktarı (1706 mg/kg) Brezilya'daki yemeye hazır fıstıklarda tespit edilmiştir. Hayvanlar kontamine yemle beslendiği zaman toksin, aflatoksin M1 formuna dönüşerek süte geçtiği için, süt ve süt ürünlerinde de aflatoksine rastlanılmaktadır. Ayrıca, pastörizasyon ve sterilizasyon işlemleri ile AFM1'in tamamen inaktive edilmesi için yeterli değildir. Bu yüzden işleme yoluyla tamamen uzaklaştırılmayan ürünler piyasaya sürülebilir ve kalıntı olarak toksin içerecek şekilde tüketilebilir<sup>25</sup>.

#### **2.4.4.1. Bitkisel Gıdalarda Aflatoksin**

Bitkisel gıdalara küf bulaşması hasat sırasında olmakla birlikte, küflerin üremesi ve toksin sentezi daha çok depolama sırasında olmaktadır. Ülkemizde bitkisel gıdalar da aflatoksin kontaminasyonu hakkında bazı çalışmalar yapılmıştır. Ancak bu araştırmalar daha çok ihraç edilen fındık, Antep fıstığı ve kuru incirlerde yapılmaktadır. Bununla birlikte az da olsa süt ve süt ürünleri ile bazı baharatlar da (kırmızı, toz ve pul biber) aflatoksinlerin varlığı açısından incelenmeye başlanmıştır. Aflatoksinlerin meydana geldiği bitkisel ürünler arasında baharatlar önemli yer tutmaktadır. Baharatlardan özellikle kırmızı biber aflatoksin açısından oldukça risklidir.

Baharatlar birçok hammadde ve üründe kullanılmaktadır. Sucuk, sosis, pastırma gibi et ürünlerine yüksek oranda kırmızı toz ve pul biber katılmaktadır. Baharatın herhangi bir küf veya toksin ile kontaminasyonu, et ürünlerine de geçebilmekte ve bu ürünler, potansiyel olarak toksin ihtiva edebilmektedir.

Konuyla ilgili olarak değişik ülkelerde birçok araştırma mevcut iken ülkemizde baharatlarla ilgili yeterli sayıda çalışma mevcut değildir.

#### **2.4.4.2. Hayvansal Gıdalarda Aflatoksin**

Hayvansal gıdalardan et ve et ürünleri ile süt ve süt ürünleri, insan beslenmesinde en temel besin maddeleri arasında yer almaktadır. Ancak özellikle son yıllarda gıda kaynaklı hastalıklar giderek yaygınlaşmaktadır. Ülkemizde çoğu et kombinaları ve çiftlikler yeterli derecede hijyenik şartlara sahip değildir. Hayvanlara verilen yemler ise uygun olmayan koşullarda depolanmakta, bunun sonucu olarak yemlerde küflenmeler görülebilmektedir. Özellikle şehir kenar mahallelerinde yetiştirilen hayvanlar çoğunlukla çöplüklerdeki yiyecek artıklarıyla beslenmekte ve küflenmiş yemleri de tüketebilmektedir. Bu tür yiyeceklerde küfe bağlı olarak toksin bulunması halinde yemi tüketen hayvanın etinde ve sütünde, dolayısıyla et ve süt ürünlerinde de aflatoksin bulunması olasılığı düşünülebilir.

Ülkemizde ince tabaka kromatografisi ile yapılan bir çalışmada, süt, peynir, süt tozu, tereyağı, yoğurt ve ayran olmak üzere toplam 334 numune analiz edilmiş, örneklerin hiç birinde Aflatoksin M1'e rastlanmamıştır<sup>40</sup>.

Yünde Aflatoksin B1'in çalışıldığı bir çalışmada, TLC sonuçlarının HPLC yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile benzer olduğu sonucuna varılmıştır<sup>41</sup>.

Toksin içeren sütlerden yapılan peynirlerden aflatoksin dağılımı hakkında birçok araştırmacı tarafından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı araştırmacılar sütte bulunan aflatoksinlerin % 40'nın peynir suyuna, % 10'un yıkama suyuna geçtiğini, geriye kalan % 50'lik kısmının ise peynirde kaldığını ileri sürerken, başka bir araştırmacı aflatoksinin tamamının peynir suyuna geçtiğini ileri sürmüştür<sup>42, 43, 18</sup>. Süt ve süt ürünleri ile yapılan başka bir araştırmada 150 süt, 24 süt tozu, 21 yoğurt, tereyağı ve 102 peynir örneği incelenmiş hiçbirinde insan sağlığını etkileyecek düzeyde aflatoksin M1 'e rastlanılmamıştır<sup>44, 18</sup>.

Et ürünleri ile ilgili bir çalışmada, 40 pastırma örneğinde TLC yöntemi ile aflatoksin varlığı incelenmiş, örneklerde 2.8 ile 47 ppb arasında toplam aflatoksin olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada pastırma örnekleri kış ve yaz ayları olmak üzere iki kez analiz edilmiş, yaz aylarında analiz edilen örneklerdeki toplam aflatoksin miktarının, kış aylarına göre daha fazla olduğu görülmüştür<sup>45</sup>.

Diğer bir araştırmada Ankara'da, değişik firmalara ait 85 pastörize süt örnekleri ELISA yöntemi kullanılarak analiz edilmiş, örneklerin % 63.86'ında belirlenen Aflatoksin M1'in, Türk Gıda Kodeksi tolerans limitlerini aştığı bulunmuştur<sup>46</sup>.

Yapılan başka bir çalışmada 48 adet çiğ süt örneği aflatoksin M1 yönünden incelenmiş, örneklerin % 70.83'ünün aflatoksin M1 içerdiği ve % 33.3'ünün tolerans limit değerinin üzerinde olduğu tespit edilmiştir<sup>47</sup>.

Bir diğer araştırmada 5 farklı mandıradan temin edilen 54 pastörize süt örnekleri, HPLC ile aflatoksin M1 varlığı yönünden incelenmiştir. Çalışmada incelenen örneklerin % 88.8'inde farklı miktarlarda aflatoksin M1 olduğu tespit edilmiştir<sup>48</sup>.

Yine benzer bir çalışmada 316 adet pastörize süt örnekleri, HPLC yöntemi ile aflatoksin M1 varlığı yönünden incelenmiş, örneklerin 5'inde farklı miktarlarda aflatoksin M1 tespit edilmiştir<sup>49</sup>.

#### **2.4.5. Aflatoksinleri Belirleme Metotları**

Gıda maddelerindeki aflatoksinin belirlenmesi için farklı kalitatif ve kantitatif metotlar geliştirilmiştir. Tüm metotlar çözücü ya da bir çözücü kombinasyonu yardımıyla, toksinlerin ekstrakte edilmesine ve ekstraktın saflaştırılmasına gereksin duyar. Aflatoksin belirleme yöntemleri çok çeşitli olup en çok kullanılanlar, immünoafinite kolon kromatografisi yöntemi, mini kolon görüntüleme yöntemi, florimetrik metot, ince tabaka kromatografisi, ELISA ve HPLC yöntemleridir Bu metotlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

##### **2.4.5.1. Immünoafinite Kolon Kromatografisi Yöntemi**

Bu yöntemin, mısır, çiğ fıstık ve fıstık yağında >10 ng toplam aflatoksin/g düzeyindeki aflatoksinlerin belirlenmesinde uygulanabilir olduğu bildirilmiştir<sup>50</sup>. Aflatoksinin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasının ardından ekstrakt, aflatoksin B1, B2, G1 ve G2'ye özgü monokloanal antikorlar içeren bir affinite kolona uygulanır.



Daha sonra aflatoksinler kolonda konsantre edilir ve bir brom veya iyot çözeltilisi ile reaksiyona sokulmasının ardından fluoresan ölçümle miktar belirlenir. Bu yöntemle geri dönüşüm % 60 – 90 arasındadır. Bu yöntem bazı ürünlerde kullanılmakla birlikte, bazı kompleks ürünler, çapraz reaksiyonlar ve müdahalelerden dolayı hatalı pozitif sonuçlar da verebilmektedir<sup>25</sup>.

#### **2.4.5.2. Minikolon Görüntüleme Yöntemi**

Minikolon görüntüleme, > 5 ppb'lik bir toplam aflatoksin (B1+B2+G1+G2) tespit imkanı olan kalitatif bir yöntemdir<sup>50</sup>. Uygun çözücülerle saflaştırmanın sonrasında, aflatoksin ekstraktı, farklı adsorban tabakalarıyla (CaSO<sub>4</sub>, florisil, silikajel ve nötral alüminyum) kaplanmış 6 mm çaplı bir minikolondan geçirilir.

Karanlık bir odada UV ışık altında test edilen kolonlarda, aflatoksin varsa, florisil tabakasının tepesinde fluoresan ışık ortaya çıkar. Minikolon yöntemi hızlı ve basittir, ancak bu yöntemle miktar tayini mümkün olmadığı için sadece aflatoksinin kalitatif olarak tespitinde kullanılır<sup>25</sup>.

### **2.4.5.3. İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi**

İnce tabaka kromatografisi, hızlı bir aflatoksin görüntüleme yöntemi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Silika jel ile kaplı TLC tabakaları kullanılarak aflatoksin türlerinin ayırımı ve bunların doğal floresan özelliklerinin uzun dalga boylu UV ışık altında belirlenmesine dayanır. Kloroform, metanol, aseton, benzen, etanol, su veya bu çözücülerin kombinasyonu gibi farklı çözücüler kullanılarak bazı modifikasyonlar değerlendirilmiştir. Bu yöntemin geliştirilebilmesi için örneklerin aynı koşullarda muamele edildiği aflatoksin standartları gereklidir.

TLC yöntemi basit ve pratik olması nedeniyle yaygın olarak tercih edilir. TLC kullanılarak fıstık ve fıstık yağında 0.5 – 1.0 ppb pamuk yağı ve pamuk yağı ürünlerinde ise 1 – 4 ppb gibi düşük aflatoksin tespit limitleri belirlenmiştir<sup>25, 51</sup>. Aflatoksin analizleri ile yapılan bir çalışmada, yerfıstığı yağında, TLC'nin HPLC' ye göre daha kesin sonuçlar verdiği rapor edilmiştir<sup>52</sup>.

### **2.4.5.4. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Yöntemi**

ELISA denemeleri antijen – antikor reaksiyonuna dayanmaktadır. Aflatoksin uygun bir çözücü ile ekstrakte edilir. Bu ekstrakt aflatoksine özgü antikorlara yerleştirilir. Antikorlar, örnekte bulunan aflatoksine bağlanırlar. Örneğe bağlanmamış serbest antikorlarla reaksiyona giren bir aflatoksin – enzim konjugesi ilave edilir. Bağlanmamış enzim konjugesi, bir yıkama aşaması ile uzaklaştırılır. Enzim substratı (üre peroksit) ve kromojen (tetrametilbenzidin) ilavesinin ardından aflatoksin – enzim bağı konjugesi inkübe edilir.

Bu süre zarfında bağı enzim konjugesi, renksiz kromojeni, mavi renkli bir ürüne çevirir. Renk değişiminin derecesi, örnekteki aflatoksin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Fotometrik olarak 450 nm’de ölçüm yapılır ve analizin tespit limiti, firmaya bağlı olarak değişir. Örneğin; Biofarm’ın ürettiği Ridascreen toplam aflatoksin için 1.75 ppb, AFB1 için 0.62 ppb’lik bir tespit limitine sahiptir. ELISA testinin avantajları; çok spesifik olması, kolayca yapılabilmesi ve çok kısa sürede sonuç vermesidir<sup>25</sup>.

ELISA ve TLC ile yapılan bir araştırmada kuru incirlerde metanol ile ekstraksiyon işlemi yapılmış ve ELISA ve TLC metodu ile bulunmuş değerlerin birbirine çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Whitaker ve ark.<sup>53</sup>, yayınladıkları bir makalede tarımsal ürünlerde aflatoksin ölçümü için birçok metot ile çalıştıklarını ve ELISA’nın kesinliğinin TLC ‘ye göre daha az olduğunu belirtmişlerdir.

Ayrıca ELISA yönteminin bazı gıda ve yemlerde düşük düzeylerde bulunan toksinlerin tespiti için uygun olmadığı bildirilmiştir<sup>54</sup>. Yine başka bir araştırmada ELISA ‘nın yüksek geri kazanım vermediği, ancak TLC ‘ye göre daha hızlı ve daha az zahmetli bir yöntem olduğu belirtilmiştir<sup>55</sup>.

#### 2.4.5.5. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

##### Yöntemi

Modern aflatoksin analizi yaygın olarak HPLC'nin kullanımına dayanır. Çünkü bu sistem, diğer kromatografi tekniklerinin kullanıldığı temel ayırma prensiplerini kullanarak, her türlü bileşiğe duyarlı, çok hızlı, hassas ve güvenilir sonuçlar verebilmektedir.

Bununla birlikte HPLC'nin dezavantajı, maliyetinin yüksek olmasıdır. HPLC, tahıl ve yemlerden uygun saflaştırma yöntemleri ile elde edilen ekstraktlar gibi kompleks bileşiklerin analizi için son derece uygundur. Bununla birlikte, aflatoksinler güçlü bir floresan hemiasetal oluşturacak şekilde trifloraasetik asitle türevlendirilmelidirler. Ardından mikotoksin türleri ters fazlı sıvı kromatografisi ile ayrılarak floresan dedektör ile tespit edilir. Bu yöntemle 0.1 ng gibi çok düşük miktarlardaki aflatoksin (B1, B2, G1 ve G2) miktarları belirlenebilmektedir. Tespit limiti, her bir aflatoksin için yaklaşık 0.3 ng/g'dır.

Geri kazanım oranı ise % 90 civarındadır<sup>51, 25, 50</sup>. Kuru kayısı da aflatoksin oluşumunun ve düzeylerinin incelendiği bir araştırmada, TLC ile HPLC yöntemleri karşılaştırılmıştır. TLC de CB (Contaminant Branch) ekstraksiyonu ile ortalama geri kazanım oranı % 85 olarak bulunurken, HPLC de immunoaffinite kolon kullanılarak yapılan geri kazanım oranı % 97 olarak tespit edilmiştir<sup>56</sup>.

Diğer bir araştırmada bazı hayvan karaciğerlerinde TLC ve HPLC ile aflatoksin düzeyleri incelenmiştir. Aflatoksin analizlerinde kullanılan TLC metodunun, kalitatif analizlerde çok üstün olmasına rağmen, yarı kantitatif değerlendirmelere uygun olmadığı belirlenmiştir. HPLC ile kesin kantitatif sonuçlar elde edilmesine ve bu yöntemin çok hızlı olmasına karşın TLC'ye kıyasla HPLC yöntemi biraz daha pahalıdır <sup>54</sup>.

Toksin analizlerinde kullanılan metotların karşılaştırıldığı bir çalışmada, TLC ve HPLC'nin kesinlik olarak aynı, ELISA yönteminin ise bu yöntemlere göre kesinlik açısından daha az güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır <sup>57</sup>.

Pastörize sütte aflatoksin M1 miktarını tespit etmek amacıyla yapılan bir araştırmada, ELISA ile HPLC yöntemleri karşılaştırılmıştır. ELISA'da ortalama geri kazanım oranı % 95.1 olarak bulunurken, HPLC de ise geri kazanım oranı ortalama % 109 olarak tespit edilmiştir <sup>58</sup>.

Yine benzer bir araştırmada, inek sütünde aflatoksin M1 miktarını tespit etmek amacıyla, ELISA ve HPLC yöntemleri karşılaştırılmıştır. ELISA'da ortalama geri kazanım oranı ortalama % 93.4 olarak bulunurken, HPLC de ise bu oran ortalama % 89.3 olarak tespit edilmiştir <sup>59</sup>.

Bu alışmada Diyarbakır ilinde piyasada satılan bazı baharat ve tahıl ürünlerindeki aflatoksin miktarlarının belirlenmesi ve yapılacak analizler sonrasında elde edilecek sonuçların Türk Gıda Kodeksi ve uluslararası standartlara uygunluğunun kontrol edilmesi amaçlanmış bulunmaktadırdır.

## 2.5 KAYNAKLAR

1. Hussein, H.S., Brassel, J.M., Toxicity, Metabolism and Impact of Mycotoxins on Humans and Animals, *Toxicology*, 167, 101 – 134, 2001.
2. Devries, J.W., Trucksess, M.W., Jackson, L.S., Mycotoxins and Food Safety, <http://www.cplbookshp.com/contents/C869.htm>, Mayıs 2007.
3. Papp, E., Otta, H.K., Zaray, G., Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins, *Microchemical Journal*, 73, 39 – 46, 2002.
4. Eaton, D.L., Groopman, J.D., The Toxicology of Aflatoxins, Human Health, Veterinary and Agricultural Significance, Acedemic Pres (INC), 3 – 62, 1994.
5. Kaya, S., Pirinçci, D., Bilgili, A., Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, Mikotoksinler, Medisan Yayın Serisi, 53, 537 – 574, 2002.
6. Akpınar, S., Gıdalar, Yemler ve Mikotoksinler. [http://www.ordutarim.gov.tr/subeler/kontrol/aflatoksin/toksinler.htm\\_](http://www.ordutarim.gov.tr/subeler/kontrol/aflatoksin/toksinler.htm_), Mart 2007.
7. Müller, G., Grudlagen Der Lebesmittel – Mikrobiologie, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 220 – 343, 1986.
8. Reiss, J., Schimmelpilze Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekaemptning, Springer Verlag, Berlin, New York, 308, 1998.
9. Weidenbörner, M., Lebensmittel Mycologie, B. Behr's Verlag Gmbh, Hamburg, 376, 1999.
10. Özçelik, S., Sağdıç, O., Dığrak, M., Özçelik, N., Gıda ve Yemlerde Mikotoksin Olusumunun Önlenmesi ve Eliminasyonu, I. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, Bildiriler Kitabı, 139 – 145, Dstanbul, 2003.
11. Gilbert, J., Validation of Analytical Methods for Determining Mycotoxins in Foodstuffs, *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 468 – 470, 2002.

12. Herrman, T., Mycotoxins in Feed Grains and Ingredients, Kansas State University, MF- 2061, Feed Manufacturing, 1 – 3, 2002.
13. Sener, S., Yıldırım, M., Veteriner Toksikoloji, Teknik Yayıncılık, İstanbul, 240 – 252, 2000.
14. Goyal, R.K., Mycotoxin Prevention and Control in Foodgrains [http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E17.htm#Prevention%20and%20\\_control%20of%20mycotoxins%20in%20foodgrains%20in%20India](http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E17.htm#Prevention%20and%20_control%20of%20mycotoxins%20in%20foodgrains%20in%20India), 2005.
15. Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, D., Doğan, H.B., Gürgün, V., Halkman, K.A., Kaleli, D., Kuleasan, H., Özkaya, F.G., Tunail, N., Tükel, Ç., Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Sim Matbaacılık, 2. Baskı, Ankara, 2000.
16. Scudamore, K.A., Mikotoksinler ve Gıda Zincirinde Kontrolleri, European Mycotoxin Seminer Series, 19 – 37 , 2005.
17. Tayfur, M., Mikotoksinler ve Karsinojenik Etkileri, <http://www.un.org.tr/who/nutrition/mikotoksinler.htm>, Mayıs, 2006.
18. Iqbal, A.S., Khalil, A.I., Shah, H., Aflatoxin Contents of Stored and Artificially Inoculated Cerals and Nuts, Food Chemistry, 98, 699 – 703, 2006.
19. Gürbay, A., Aydın, S., Girgin, G., Engin, A.B., Sahin, G., Assessment of Aflatoxin M1 Levels in Milk in Ankara, Food Control, 17, 1 – 4, 2006.
20. Aydın, A., Erkan, M.E., Baskaya, R., Çiftçiöğlü, G., Determination of Aflatoxin B1 Levels in Powdered Red Pepper, Food Control, 18, 1015 – 1018, 2007.
21. Gürses, M., Erdoğan, A., Sert, S., Farklı Depolama Sartlarının Aspergillus parasiticus NRRL 2999 Küf Şusu ile Asılanan Tulum Peynirlerinde Aflatoksin Oluşumu Üzerine Etkisi, Türk J., Vet. Anim. Science, TÜBİTAK, 28, 233 – 238, 2002.



22. Timbrell, J.A., Introduction to Toxicology, CRC Pres, ISBN:9780415247634, London – England, 78 – 79 , 1989.
23. Lagana, A., Cavaliere, C., Berni, E., Spotti, E., Immunoaffinity Clean-up and Direct Fluorescence Measurement of Aflatoxins B1 and M1 in Pig Liver: Comparison with High-performance Liquid Chromatography Determination, Food Additives and Contaminants, 22(11), 1154 – 1161, 2005.
- 24 Tunail, N., Funguslar ve Mikotoksinler,  
[http:// www.mikrobiyoloji.org/dokgoster.asp\\_dosya=891112005](http://www.mikrobiyoloji.org/dokgoster.asp_dosya=891112005), 2006.
- 25 Arrus, K., Microbiology and Aflatoxin Production in Brazil Nuts, Master of Science, Department of Food Science University of Manitoba Winnipeg, Manitoba, 2004.
- 26 Qian, G.S., Ross, R.K., Yuan, J.M., Gao, Y.T., Henderson, B.E., Wogan, G.N., Groopman, J.D., A Follow-up Study of Urinary Markers of Aflatoxin Exposure and Liver Cancer Risk Shanghai, People’s Republic of Chiana, Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 3, 3 – 10, 1994.
- 27 Wang, J.S., Huang, T., Su, J., Liang, F., Wei, Z., Liang, Y., Luo, H., Kuang, S.Y., Qian, G.S., Sun, G., He, X., Kensler, T., Groopman, J., Hepatocellular Carcinoma and Aflatoxin Exposure in Zhuqing Village, Fusui County , People’s Replie of China, Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 10, 143 – 146, 2001.
28. Özbek, E., Marmara Bölgesi Askeri Birliklerinde Tüketime Sunulan Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin M1 Düzeylerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2006.
29. Reddy, S.V., Waliyar, F., Propeties of Aflatoxin and Producing Fungi,  
<http://www.aflatoxin.info/aflatoxin.asp>, Ocak 2007.

30. Ünlütürk, A., Turantas, F., Gıda Mikrobiyolojisi, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri Bornova – Dzmir, 155 – 156, 2003.
31. Harris, B., Staples, C.R., The Problems of Mycotoxins in Dairy Cattle Rations, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1992.
32. Özkaya, S., Temiz, A., Aflatoksinler; Kimyasal Yapıları, Tosisiteleri ve Detoksifikasyonları, Orlab Online Mikrobiyoloji Dergisi, <http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702030101.pdf>, 1(1), 1 – 21, 2003.
33. Cassel, E.K., Campell, B., Draper, M., Epperson, B., Aflatoxins Hazards in Grain Aflatoxicosis and Livestock, FS, 907, 2001.
34. Shanahan, J.F., Brown, W.M., Blunt, Jr., Blunt, T.D., Aflatoxins, Crop Series Production, <http://www.ext.colostate.edu/pubs/crops/000306.pdf>. Nisan 2006\_.
35. Ruiquion, L., Qian, Y., Thanaboripat, D., Thansukon, P., Biocontrol of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Production, KMITL Science Journal, 4 – 1, 2004.
36. Boyacıoğlu, D., Nilüfer, D., Tahinde Aflatoksin Tarama Çalışması, Dünya Gıda Dergisi, 7, 1, 2002.
37. Bommakanti, A.S., Waliyar, F., Importance of Aflatoxins in Human and Livestock Health, <http://www.aflatoxin.info/health.asp>, Eylül 2006.
38. Cardwell, K.F., Mycotoxin Contamination in Foods-Anti-Nutritional Factors, Improving Human Nutrition Through Agriculture, The Role of International Agricultural Research, 1999.
39. Taydas, E., Aflatoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri, [www.ordutarim.gov.tr/subeler/kontrol/aflatoksin/insan%20sag%20etkisi.htm](http://www.ordutarim.gov.tr/subeler/kontrol/aflatoksin/insan%20sag%20etkisi.htm)\_, Ocak, 2006.

40. Demirer, M.A., Süt ve Mamüllerinde Aflatoksin M1 ve B1 Aranması Üzerine Araştırmalar, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 2, 3, 421 – 443, 1973.
41. Lee, L.S., Wall, J.H., Cotly, P.J., Bayman, P., Integration of Enzyme – linked Immunosorbent Assay With Conventional Chromatographic Procedures for Quantitation of Aflatoxin in Individual Cotton Bolls, Seeds and Seed Sections, Journal of Association of Official Analytical Chemists, 73, 4, 581 – 584, 1990.
42. Grant, W.D., Carlson, F.W., Partitioning Behaviour of Aflatoxin M1 in Dairy Products, Bulletin of Enviromental Contamination and Toxicology, 6, 6, 521 – 523, 1971.
43. Purchase, I.F.H., Steyn, R.R., Tutsin, R.C., Reduction of Aflatoxin M1 Content of Milk by Processing, Food Cosmet Toxicology., 10, 383 – 387, 1972.
44. Demirer, M.A., Bazı Peynirlerde İzole Ettiğimiz Küfler ve Bunların Aflatoksin Niteliklerinin Arastırılması, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1 – 2, 180 – 198, 1974.
45. Refai, M.K., Niazi, Z.M., Aziz, N.H., Khafaga, N.E.M., Incidence of Aflatoxin B1 in The Egyptian Cured Meat Basterma and Control by ? – irradiation, Nahrung Food, 47, 6, 373 – 382, 2003.
46. Sarımeahmetoğlu, B., Çelik, H., Kuplulu, O., Detection of Aflatoxin M1 in Cheese Samples by ELISA, Food Control, 15, 45 – 49, 2004.
47. Akdemir, Ç., Altıntas, A., Ankara’da İslenen Sütlerde Aflatoksin M1 Varlığının ve Düzeylerinin HPLC ile Araştırılması, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 51, 175 – 179, 2004.

48. Zinedine, A., Osnaya, L.G., Soriano, J.M, Molto, J.C., Idrissi, L., Mones, J., Presence of Aflatoxin M1 in Pasteurized Milk from Morocco, *International Journal of Food Microbiology*, 114, 25 – 29, 2007.
49. Nachtman, C., Gallina, S., Rastelli, M., Ferro, G.L., Decastelli, L., Regional Monitoring Palm Regarding The Presence of Aflatoxin M1 in Pasteurized and UHT Milk in Italy, *Food Control*, 18, 623 – 629, 2007.
50. Horwitz, W., In: Cunniff, P., *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th Edition. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 2000.
51. Yetim, H., *Enstrümental Gıda Analizleri*, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, 2. Baskı, Erzurum, 2002.
52. Dell, M.P.K., Haswell, S.J., Roch, O.G., Coker, R.D., V.F.P. Medlook, K.Tomlins, *Analyst*, 115, 1435, 1990.
53. Whitaker, Th., Harwitz, W., Albert, R., Nesheim, S., Park, D.L., Pohland, A.E., Thin – layer Chromatography of Mycotoxins and Comparison with Other Chromatographic Methods, *Journal of AOAC International.*, 79, 476, 1996.
54. Özpala, A., *Aydın Yöresi Kuru İncirlerde Aflatoksin Tayini ve Yöntemlerin Karşılaştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 2006.
55. Wolf, H.E., Bullerman, L.B., Thin – layer Chromatography of Mycotoxins and Comparison with Other Chromatographic Methods, *Journal of Food Protection*, 59, 438, 1996.
56. Çelik B., *Kuru Kayısıda Muhtemel Aflatoksin Olusumu ve Düzeylerinin Tespiti*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2001.
57. Horwitz, W., Albert, R., Nesheim, S., Reliability of Mycotoxins Assays – An Update, *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 76, 461 – 491, 1993.

58. Kim, E.K., Shon, D.H., Ryu, D., Park, J.W., Hwang, J.J., Kim, Y.B., Occurrence of Aflatoxin M1 in Korean Dairy Products Determined by ELISA and HPLC, Food Additives and Contaminants, 17, 1, 59 – 64, 2000.

### **3. MATERYAL ve METOT**

#### **3.1. MATERYAL**

##### **3.1.1. Tahıl ve Baharat Ürünleri**

Bu çalışmada Diyarbakır ilinde piyasadan toplanan buğday (3), nohut (3) pirinç (3), fındık(3), Antep fıstığı (3), mercimek(3), mısır(3) gibi 21 tahıl ürünü ile kırmızı pul biber (3), siyah pul biber (3), toz biber (3), karabiber (3), kişniş (3), nane (3), tarçın (3) ve kekik(3) gibi toplam 24 baharat hammaddeleri bu araştırmanın deneme materyalini oluşturmuştur. Çalışmada analiz edilen bu materyaller Mayıs 2009 tarihinde toplanmıştır.

##### **3.1.2. Aflatoksin Standartı**

- Miycotxin Mix-1 (Biopure, BRM 062021)

##### **3.1.3. Kimyasal Maddeler**

- Metanol (Merck, HPLC saflığında)
- Asetonitril (Merck, HPLC saflığında)
- Sodyum Klorür (Carlo Erba)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)
- KCl (Merck)
- İyot (Merck)

### 3.1.4. Makine ve Teçhizat

- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC, LabAlliance )
- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Kolonu (Macherey – Nagel EC 250/5 C18)
- Enjektör (Hamilton 100 µL )
- Dedektör (Shimadzu RF-10A Floresan Dedektör)
- Mixer (Ultra Turrax, T18 Basic)
- Homojenizatör (Masticator, Nr 1147/470)
- Hassas Terazi (Denver APX-200)
- İmmuno Afinite Kolon ( BioPharm, Alfaprep P07)

## 3.2. METOT

### 3.2.1. Metot

Aflatoksinlerin miktar tayininde kullanılan metotlar, genel olarak mikotoksin analiz aşamalarına (ekstraksiyon, temizleme, ayırma, saptama ve miktar tayinin yapılması) göre farklılık arz etmektedir.

Yapılan literatür araştırmasında baharat ve tahıl ürünlerinin HPLC ile aflatoksin analizi için **TS EN 12955** “*Gıda Maddeleri Hububatlarda, Kabuklu Meyvelerde ve Türetilmiş Ürünlerde Aflatoksin B1 ile Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 Toplamlarının Tayini-Artkolon Türevlendirmeli ve İmmunoaffinite İle Kolondan Geri Almalı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi*” kullanılmıştır.

### 3.2.2. Ekstraksiyon

Tahıl ve baharat ürünlerinin afla toksin içerikleri için aşağıdaki ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Bu amaçla alınan 25 gr örnek ve 5 gr NaCl 250 ml'lik kapaklı bir balona konuldu. Daha sonra üzerine 125 ml (Metanol-su; 70:30) eklenerek karıştırıcıda 500 rpm de 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra elde edilen karışım bir süzgeç kağıdı (Whatman, 24 cm, Cat No: 1202240, İngiltere) ile süzdükten sonra, yine bir filtre kağıdı (Whatman, 934 – AH, 11 cm, Cat No:1827900646) kullanılarak tekrar süzüldü ve elde edilen filtrat 100 ml'lik bir erlen de toplandı. Filtrattan 15 ml alınarak üzerine 30 ml su ilave edilerek 50 ml'lik bir tüpe konuldu.

Kullanılacak immuno affinite kolonuna (AflaTest, ABD), 50 ml seyreltilmiş 10 ml filtrat önce 2 ml/dak hızla kolondan geçirildi, daha sonra 10 ml PBS (Fosfat Buffer Saline: 8 g NaCl, 1.2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g, 0.2 g KCl, 990 ml saf su konulmuş ve pH 7.4 e ayarlanmış) 5 ml/dak'lık bir hızla immuno affinite kolonundan geçirildi.

Aflatoksinler kolondan saniyede 1 damla geçecek şekilde 1 ml metanol ile elue edildi. Bu eluattan 20 µL'e alınarak HPLC'ye enjekte edildi.



### 3.2.3. HPLC'de Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 Düzeylerinin Saptanması

Deneysel aşamalarda kullanılan koşullar ve parametreler Tablo 3.1 de gösterilmiştir.

Parametre	
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Akış hızı	1 ml/dk
Durdurma zamanı	10 dk
Mobil faz	Metanol – asetoniril – su (22:22:56)
Çalışılan basınç	131 – 142 bar
Max. basınç	400 bar
Sıcaklık	42 °C
Dedektör	Floresans
Uyarılma dalga boyu	365 nm
Emisyon dalga boyu	430 nm
HPLC Kolon	RP-C18

**Tablo 3. 1** HPLC parametreleri

Aflatoksin analizleri, LabAlliance marka bir HPLC, cihazı ile gerçekleştirildi. Ekstraktlar için hareketli faz olarak su:metanol:asetonitrilden (56:22:22) oluşan mobil faz sabit oranda analitik HPLC pompası aracılığı ile akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde sisteme pompalandı, enjeksiyon miktarı ise 20 µL olarak ayarlandı. Analiz için C18 kolonu (5 µm, 250 mm X 4.6 mm, Macherey – Nagel) kullanıldı ve bu kolon 131 – 142 bar basınçta tutuldu. Kolon sıcaklığı, 42 °C de tutuldu, degazer olarak ise Systec sistemi kullanıldı. Analizler, eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 365 nm ve 430 nm'ye ayarlanan bir floresan dedektörde (Shimadzu RF-10A) , aflatoksin türevlendirme işlemi ise LabAlliance (Post Column Reactor) kolon sonrası türevlendirme sistemi kullanıldı, burada etkin bir türevlendirme ajanı olan 100 ppm iyot çözeltisi akış hızı 0,3 ml/dk olacak şekilde ayarlandı. Piklerin çıkış süresine göre her bir analiz, yaklaşık 10 dk'da tamamlandı.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. KALİBRASYON VE VE GERİ KAZANIM ÇALIŞMALARI

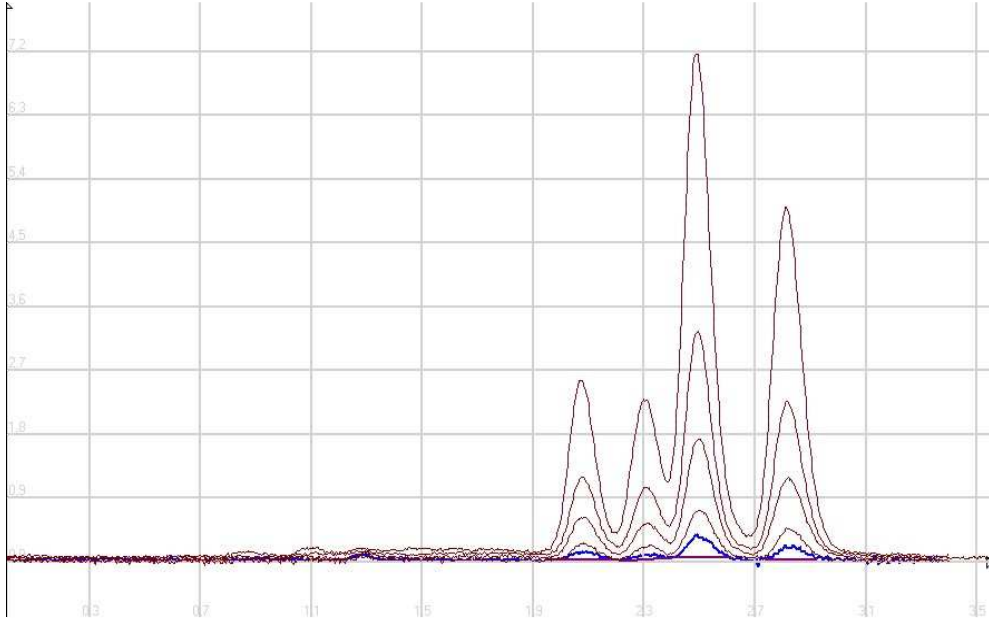
Farklı konsantrasyonlarda aflatoksin B1, B2, , G1, ve G2 içeren standart çözeltilerin HPLC ile ayrıldıktan sonra iyot ile türevlendirilmesi ve floresans dedektör ile tayin edilmesi neticesinde aflatoksin bileşenlerine ait pik alan değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Konsatrasyon ppb				Alan mV			
G2	G1	B2	B1	G2	G1	B2	B1
0,5	2	0,5	2	0.45	0,503	1,389	1,568
1	4	1	4	0.80	1,096	2,404	2,811
1.5	6	1,5	6	1.24	1,589	3,536	4,781
2	8	2	8	1.69	2,123	4,894	5,888

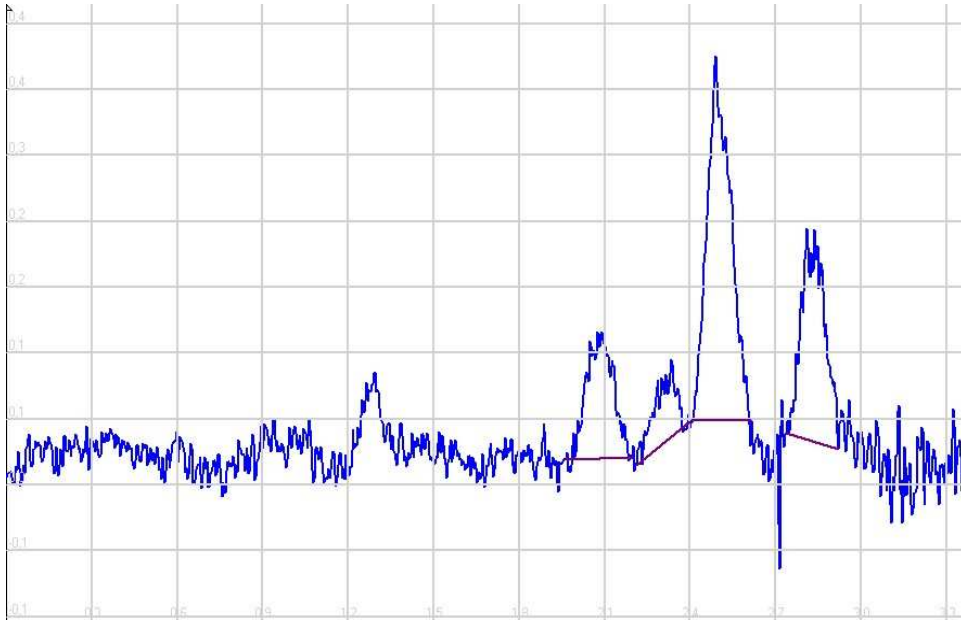
**Tablo 4. 1** Kalibrasyon standartları için konsantrasyon ve alan değerleri

Tablo 4.1’de verilen sonuçlara ilişkin kalibrasyon kromatogramı Şekil 4.1’de verilmiştir.

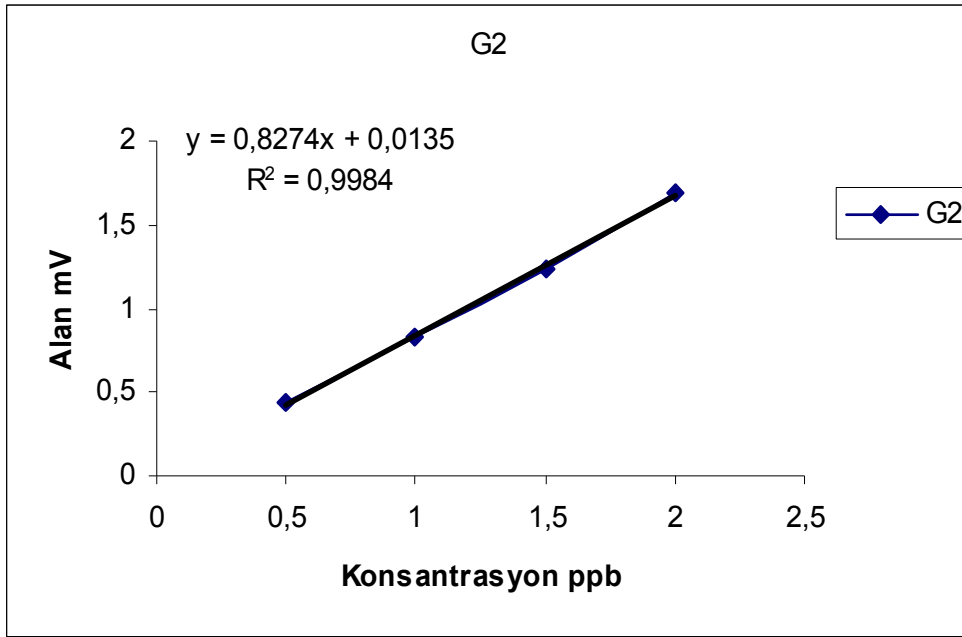
Aflatoksin türlerine ait bileşenler ters fazlı HPLC’de net olarak birbirinden ayrılabilmeyle birlikte immüno affinite kolon ile önderiştirme işlemi sonrasında floresans dedektör kullanımı ile ng/mL seviyelerinde duyarlı bir analiz yapmak mümkündür. Tablo 4.1’de sunulan verilerden en düşük konsantrasyonlardaki standart karışımı için alınan kromatogram Şekil 4.2’de verilmiştir



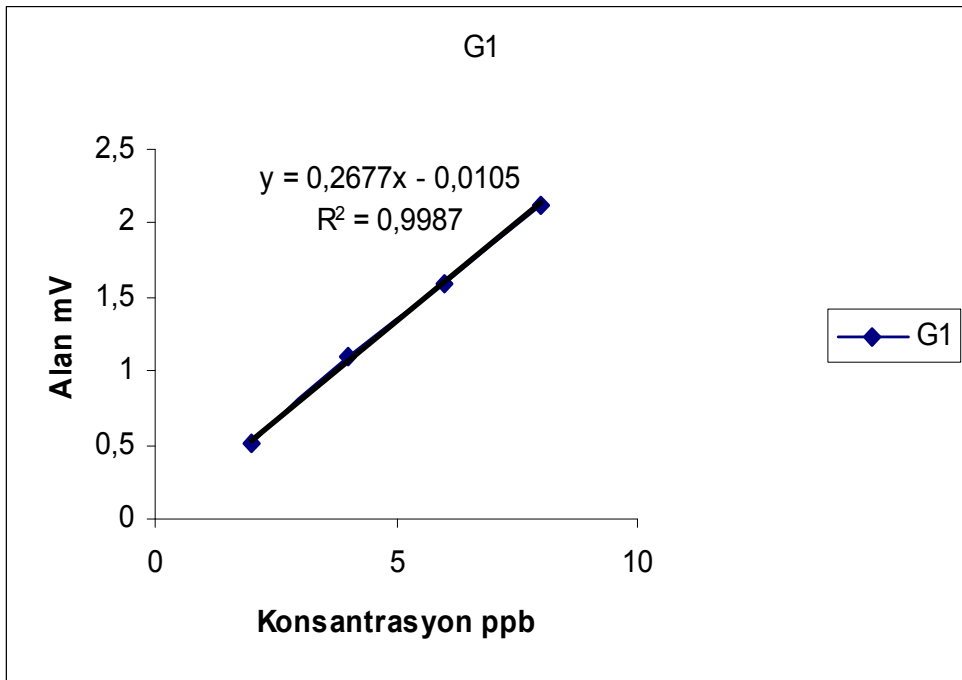
**Şekil 4. 1** Tablo 4.1’de verilen kalibrasyon verilerine ait kromatogram



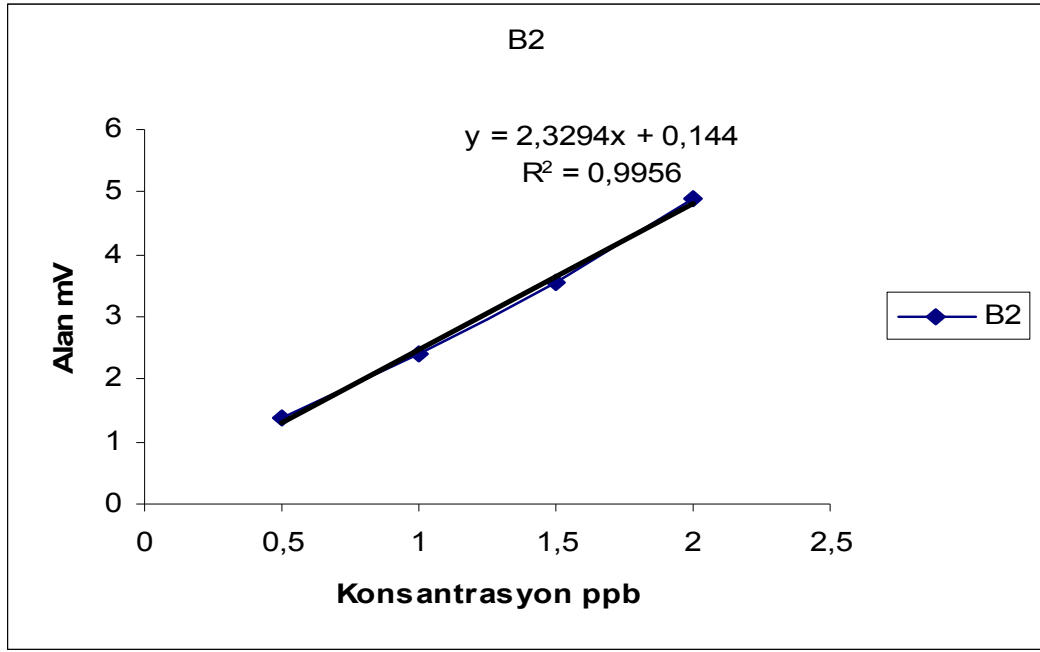
**Şekil 4. 2** En düşük konsantrasyondaki standart karışımı için alınan kromatogram (AFG2:0.5 ng/mL, AFG1:2 ng/mL, AFB2:0.5 ng/mL, AFB1:2 ng/mL)



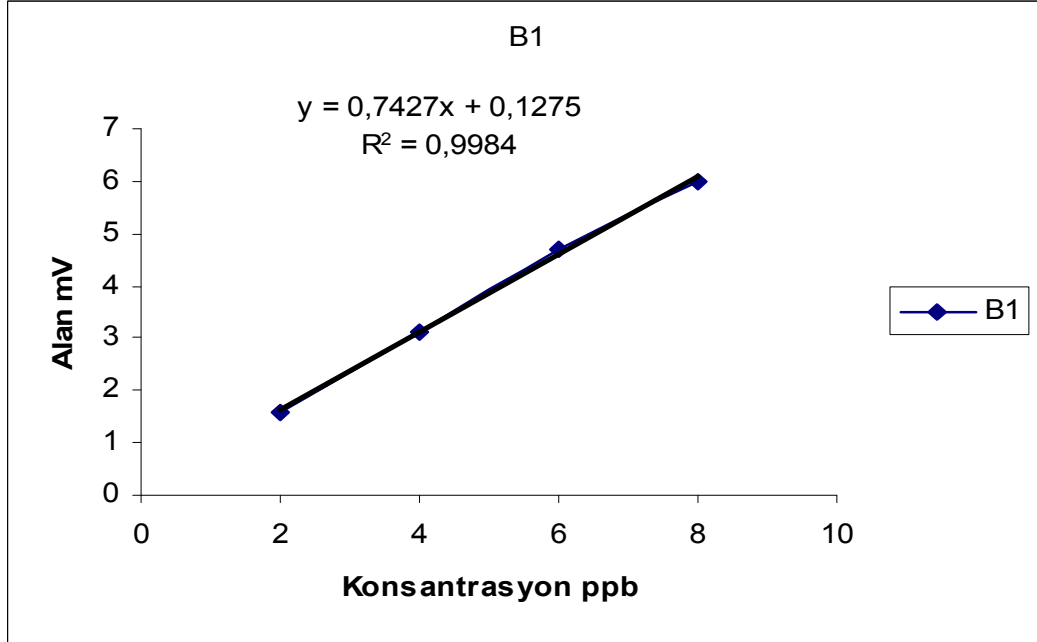
Şekil 4. 3 Aflatoxin G2 standardı kalibrasyon eğrisi



Şekil 4. 4 Aflatoxin G1 standardı kalibrasyon eğrisi



Şekil 4. 5 Aflatoksin B2 standardı kalibrasyon eğrisi



Şekil 4. 6 Aflatoksin B1 standardı kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6’de verilen kalibrasyon grafikleri dikkate alındığında, çalışılan konsantrasyon aralığında lineer kalibrasyon eşitlikleri elde edildiği görülmektedir. Elde edilen eşitliklerin korelasyon katsayısı değerleri de bunu doğrulamaktadır. Metodun tayin limiti ve gözlenebilme sınırının hesaplanabilmesi için ise içerisinde aflatoksin içermeyen şahit bir deney yapılmış ve elde edilen kromatogramlarda aflatoksin türlerine ait piklerin alıkonma zamanlarındaki sinyal değerleri alınarak ortalama şahit sinyalinin standart sapmasının 3 katının tayin limiti, 10 katının ise gözlenebilme sınırı değerlendirmesiyle tayin sınırlarının AFG1 için 0.24 ng/mL, AFG2 için 0.06 ng/ml, AFB1 için 0.18 ng/mL, AFB2 için 0.015 ng/mL ve gözlenebilme sınırlarının ise AFG1 için 0.8 ng/mL, AFG2 için 0.2 ng/mL, AFB1 için 0.6 ng/mL, AFB2 için 0.05 ng/mL olduğu belirlenmiştir.

Bu amaçla hazırlanan farklı konsantrasyondaki aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 standart kalibrasyon eğrileri, Şekil 4.3,4.4, 4.5, 4.6 da verilmiştir.

## 4.2. BAHARAT ÜRÜNLERİ ANALİZLERİ

Araştırmada toplam 24 adet Baharat ürünü örneği analiz edilmiş ve analiz edilen, bu baharat ürünlerine ait aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 miktarları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Ürün	Örnek	Belirlenen Aflatoksin Miktarları (ppb)				
		B1	B2	G1	G2	Toplam
Kırmızı pul biber	1	5.61	TE*	0.13	TE	5.74
	2	5.38	TE	0.23	TE	5.61
	3	4.32	TE	TE	TE	4.32
Siyah pul biber	1	2.13	TE	0.21	TE	2.34
	2	1.03	TE	0.35	TE	1.38
	3	1.58	TE	0.11	TE	1.69
Toz biber	1	1.85	0.36	TE	1.18	3.39
	2	2.15	TE	0.14	0*	2.29
	3	0.96	TE	TE	0*	0.29
Karabiber	1	TE	0.80	TE	TE	0.80
	2	TE	1.80	TE	TE	1.80
	3	TE	2.60	TE	TE	2.60
Kişniş	1	TE	TE	TE	TE	TE
	2	TE	TE	TE	TE	TE
	3	TE	TE	TE	TE	TE
Nane	1	TE	TE	TE	TE	TE
	2	TE	TE	TE	TE	TE
	3	TE	TE	TE	TE	TE
Tarçın	1	TE	TE	TE	TE	TE
	2	TE	TE	TE	TE	TE
	3	TE	TE	TE	TE	TE
Kekik	1	TE	TE	TE	TE	TE
	2	TE	TE	TE	TE	TE
	3	TE	TE	TE	TE	TE

**Tablo 4. 2** Analiz edilen baharat ürünlerinde belirlenen aflatoksin miktarı (n=3)

<sup>a</sup> TE-Tespit edilemedi

Tablo 4.2’e göre kırmızı pul biber örneklerinin %66’nda aflatoksin B1 miktarı Türk Gıda Kodeksi Limit değerlerini aştığı görülmüş, siyah pul biber ve toz biber örneklerinde aflatoksin miktarının Türk Gıda Kodeksine uygun olduğu görülmüştür. Diğer baharat örneklerinde aflatoksin türlerine rastlanmadı.

Bu araştırmada 21 adet tahıl ürünü ile 24 adet baharat ürünlerinde aflatoksin varlığı yönünden incelenmiştir. Öncelikle, Tahıl ve baharat ürünleri için HPLC de geri kazanım oranlarını belirlemek amacıyla karabiber ve fındık örneklerine farklı miktarlarda Miycotoxin Mix-1 standardı eklenerek, her bir aflatoksin için geri kazanım değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.3).

**Tablo 4. 3** Geri kazanım oranları (n=3)

	İlave Edilen Miktar (ppm)				Analiz Sonucu (ppm)				Geri Kazanım (%)			
	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2
<b>K.Pul Biber<sup>a</sup></b>	-	-	-	-	5.61±0.45	-	0.13±0.01	-	-	-	-	-
	2	0.5	2	0.5	6.97±0.56	0.39±0.04	1.66±0.12	0.41±0.03	68	78	76.5	82
<b>Fındık<sup>b</sup></b>	-	-	-	-	4.10±0.39	-	-	-	-	-	-	-
	2	0.5	2	0.5	5.41±0.30	0.40±0.05	1.50±0.10	0.39±0.02	65.5	80	75	78

<sup>a</sup> Tablo 4.2 de 1 nolu örnek

<sup>b</sup> Tablo 4.4 de 1 nolu örnek

Analiz sonucunda aflatoksin içeriği tespit edilebilir limitin altındaki karabiber ve buğday örneklerine aflatoksin standardından bilinen konsantrasyonlarda aflatoksin standardı eklenerek geri kazanım oranları Tablo 4.3 de belirtilmiştir.

HPLC ile aflatoksin oranlarının belirlenmesi amacıyla yapılan bu araştırmada geri kazanım oranlarına bakıldığı zaman karabiber için aflatoksin G1 oranının % 76,5, aflatoksin B2 oranının ise % 78 civarında olduğu görölmektedir (Tablo 4.2). Buğday da aflatoksin B2 için bu oran % 80 iken, aflatoksin G2 için % 78 bulunmuştur.



### 4.3. TAHIL ÜRÜNLERİNDE AFLATOKSİN ANALİZLERİ

Araştırmada; toplam 21 adet Tahıl ürün örnekleri analiz edilmiş ve analiz edilen örneklerde tespit edilen aflatoksin B1, B2,G1 ve G2 miktarları Tablo 4.4 ‘de gösterilmiştir.

**Tablo 4. 4** Analiz Edilen Tahıl Ürünlerinde Belirlenen Aflatoksin Miktarı (n=3)

Ürün	Örnek	Belirlenen Aflatoksin Miktarları (ppb)				
		B1	B2	G1	G2	Toplam
Pirinç	1	TE*	TE	TE	TE	TE
	2	TE	TE	TE	TE	TE
	3	TE	TE	TE	TE	TE
Buğday	1	TE	TE	TE	TE	TE
	2	TE	TE	TE	TE	TE
	3	TE	TE	TE	TE	TE
Mısır	1	TE	TE	TE	TE	TE
	2	TE	TE	TE	TE	TE
	3	TE	TE	TE	TE	TE
Nohut	1	TE	TE	TE	TE	TE
	2	TE	TE	TE	TE	TE
	3	TE	TE	TE	TE	TE
Mercimek	1	TE	TE	TE	TE	TE
	2	TE	TE	TE	TE	TE
	3	TE	TE	TE	TE	TE
Antep	1	TE	1.2	TE	TE	1.2
	2	TE	1.6	TE	TE	1.6
Fıstığı	3	TE	2.1	TE	TE	2.1
Fındık	1	4.1	TE	TE	TE	4.1
	2	3.8	TE	TE	TE	3.8
	3	1.8	TE	TE	TE	1.8

#### \*Tespit Edilemedi

Tablo 4.4’den de izlenebildiği gibi analiz edilen tahıl ürünlerinde Antep fıstığı ve fındık dışındaki ürünlerde aflatoksin türlerine rastlanmadı. Bununla beraber fındık ve Antep fıstığı örneğinde bulunan aflatoksin B1 ve B2 miktarları Türk Gıda Kodeksi Değerlerine uymaktadır.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile Diyarbakır ili piyasasında bulunan baharat ve tahıl ürünlerinde aflatoksin kontaminasyon düzeylerinin durumlarını tespit etmek hedeflenmiştir. Yapılan bu çalışmada tahıl ve baharat ürünlerinin bazılarında belli oranlarda aflatoksin tespit edilmiş olmakla beraber kırmızı pul biber örneklerinde belirlenen limit değerlerin üstünde çıkmıştır.

Örneklerin satış yerlerinde gıda ürünlerinin uygun koşullarda bulundurulduğu çok bekletilmeden satışa sunulduğu değerlendirilmiştir.

Gerek Gıda ürünlerinin satış yerlerinde gerekse üretim ve depolama tesislerinde şartlar elverişli olduğu takdirde her zaman için toksijenik küf dolayısıyla aflatoksin bulunma riski olacağı göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle üretimden tüketime kadar geçen tüm evrelerde küf gelişimini engelleyecek tedbirler alınmalıdır. Bu amaçla; modern üretim teknikleri uygulanmalı, Gıda ürünleri uygun biçimde depolanmalı ve gıda satış noktalarında uzun süre bekletilmemeli, olası muhtemel kontaminasyonlara yönelik olarak sürekli kontrol edilmelidir. Gıda ürünleri her aşamada aflatoksin kontaminasyonu yönünden analiz edilmeli ve limitleri aşan ürünlerin tüketimine izin verilmemelidir.

Aflatoksin oluşumunda ürünün nem içeriği, bulunduğu ortamın sıcaklığı ve depolama şekli çok önemlidir. Depolama koşullarının yanında ürünlerin hasat edilmesi sırasında üründe meydana gelen mekanik tahribatta kontaminasyon riski oluşturur.

Yapılan bir çok araştırma kurutma ve depolamanın aflatoksin oluşumu ve gelişimi açısından son derece önemli olduğunu ortaya koymuştur. Depolama işlemi mikotoksin oluşumu açısından en kritik asama olup, depolama sırasında ürünün kontamine olmaması için depolarda uygun bağıl nem ve sıcaklık koşulları kontrollü olarak sağlanmalıdır. Uygun şekilde ambalajlanmış ürünler olarak piyasaya sürülmelidir.

Sonuç olarak; gerek ülkemizde gerekse dünyada kanserojen olduğu bilinen Aflatoksinlerin denetiminin halk sağlığı açısından çok önemli olduğu bir gerçektir.

Bulgularımız kırmızı pul biber örneği dışında limit değerlerin altında olmasına rağmen insan sağlığı açısından riskli gıdalar olarak değerlendirilmelidir. Ülkemizde daha sağlıklı ve kaliteli gıdalar üretilmesi amacıyla kodekste bildirilen Aflatoksin limit değerlerinin daha alt seviyelere çekilmesinin gerektiğini düşünmekteyiz.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : **Kadir Serdar ÇELİK**

Doğum Yeri: **Diyarbakır**

Doğum Tarihi: **1984**

Medeni Hali: **Bekar**

Yabancı Dili: **İngilizce**

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : **2002**

Lisans : **2007**

Yüksek Lisans : **2010**

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: **Dicle Üniversitesi Kimyasal Analiz Laboratuvarı, 2009**

Yayımları (SCI ve diğer):