

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**GIDA ÖRNEKLERİNDE AFLATOKSİN (G1, G2, B1, B2) VE
OKRATOKSİN A'NIN HPLC METOT VALİDASYONU VE
MİKTAR TAYİNLERİ**

İŞİL HACİBEKİROĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. UFUK KOLAK**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında Işıl Hacıbekiroğlu tarafından hazırlanan "Gıda Örneklerinde Aflatoksin (G1, G2, B1, B2) ve Okratoksin A'nın HPLC Metot Validasyonu ve Miktar Tayinleri" başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

14 / 11 / 2013

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Gülaçtı Topçu (Tez İzleme Komitesi Üyesi), Bezmialem Vakıf Üniversitesi Ecz. Fak., Farmakognozi AD	
2.Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan, İstanbul Üniversitesi Ecz. Fak. Analitik Kimya AD	
3.Prof. Dr. Ufuk Kolak (Tez Danışmanı), İstanbul Üniversitesi Ecz. Fak. Analitik Kimya AD	
4.Doç. Dr. Olcay Sağırlı, İstanbul Üniversitesi Ecz. Fak. Analitik Kimya AD	
5.Yrd. Doç. Dr. Evrim Tekkeli, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Ecz. Fak. Analitik Kimya AD	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Işıl Hacıbekiroğlu

İTHAF

*Beni seviyorsanız eğer ve anlıyorsanız,
Laboratuvarlarda sabahlayın, kahvelerde değil,
Bilim ağartsın saçlarınızı, kitaplar,
Ancak böyle aydınlanır o sonsuz karanlıklar.*

M. Kemal ATATÜRK

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında bilgisinden ve deneyiminden yararlandığım, sabrına ve disiplinine hayran olduğum, ilgisini benden esirgemeyen, beni her konuda teşvik eden ve cesaretlendiren, kendisini örnek aldığı, hayata bakış açısından çok şey öğrendiğim, çok değerli bilim insanı, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ufuk Kolaç'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarımı yapabilmemde imkanlarını sunan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'na teşekkür ederim.

Tezimin konusunu oluşturan aflatoksin ve okratoksin A analizlerinde bana yol gösterici olan, bilgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen Redo Analyzer Gıda Kontrol ve Analiz Laboratuvar Müdürü Sayın Oya Erdoğan'a, Nanolab Gıda Kontrol ve Analiz Laboratuvarı Müdürü Sayın Dr. Gökçe Gürsoy'a, Nanolab Gıda Kontrol ve Analiz Laboratuvarı Mikotoksin ve Kalıntı Laboratuvar Şefi Sayın Gülten Rumeli'ye, R-Biopharm Türkiye distribütörü Sincer firması satış temsilcisi Gıda Yüksek Mühendisi Cengiz Yıldız'a ve teknik yardımlarından ötürü Shimadzu Türkiye distribütörü Ant Teknik teknik servis elemanı Kimyager Sayın Ömer Turmuş'a teşekkür ederim.

Tezimin deneysel çalışmalarında bana destek olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı Arş. Gör. Demet Dinçel'e teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında fikir ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Tuba Kuşman ve Arş. Gör. Burcu Çulhaoğlu'na teşekkür ederim.

Tezimi hazırlama aşamasında yaşadığım problemleri ve sıkıntıları paylaştığım, beni bıkmadan, usanmadan dinleyerek manevi desteğini hissettiğim İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Arş. Gör. Pelin Köseoğlu Yılmaz'a teşekkür ederim.

Bu stresli dönemimde beni yalnız bırakmayan, büyük sabır gösteren, benim için çok değerli, güzel insan Eren Gazioğlu'na çok teşekkür ederim.

En büyük teşekkür Annem, Babam ve Kardeşime...

Bu tez çalışması, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 22522).

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikotoksinler.....	3
2.2. Mikotoksin Çeşitleri.....	3
2.2.1. Aflatoksin.....	5
2.2.2. Okratoksin.....	8
2.2.3. Ergot alkaloidleri	11
2.2.4. Zeralenon	13
2.2.5. Patulin	14
2.2.6. Fumonisin.....	15
2.2.7. Triketesenerler	16
2.3. Gıdaların Mikotoksinlerle Kontaminasyon Yolları	18
2.4. Mikotoksinlerin İnsan ve Hayvan Sağlığına Etkileri.....	21
2.5. Mikotoksinlerin Kontrolü ve Önlenmesi	24
2.6. Yasal Mikotoksin Limitleri.....	26
2.7. Mikotoksinlerin Analizi	31
2.7.1. Mikotoksin Analizlerinde Kullanılan Metotlar.....	32
2.7.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi.....	32
2.7.1.2. Kalitatif İnce Tabaka Kromatografisi	34
2.7.1.3. Kantitatif İnce Tabaka Kromatografisi	34

2.7.1.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi.....	35
2.7.1.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	37
2.7.1.6. Gaz Kromatografi.....	38
2.7.1.7. Kromatografik Metotların Kütle Spektroskopisi ile Birlikte Kullanımı	39
2.7.1.8. Diğer Yöntemler.....	39
2.7.2. Aflatoksin Analiz Yöntemleri.....	41
2.7.3. Okratoksin A Analiz Yöntemleri	43
2.8. Mikotoksin Analizlerinde Kalite Kontrol/Kalite Güvence (QA/QC) Kriterleri	44
2.8.1. Örnekleme.....	44
2.8.2. Metot Validasyonu.....	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1. Analizin Yapıldığı Yer.....	47
3.2. Materyal	47
3.3. Kimyasal maddeler, Çözücüler, Çözeltiler	52
3.4. Cihaz ve Gereçler.....	52
3.5. Örneklerin Analize Hazırlanması	53
3.5.1. ELISA Tarama Testi İçin Örneklerin Hazırlanması ve Analiz Metodu	53
3.5.2. HPLC Çalışması için Örneklerin Hazırlanması	54
3.6. Metot Performans Parametrelerinin Belirlenmesi	58
3.7. HPLC’de Aflatoksin Analizi Parametreleri	58
3.8. HPLC’de Okratoksin A Analizi Parametreleri	59
3.9. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	59
3.9.1. Aflatoksin Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması.....	59
3.9.2. Okratoksin A Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması.....	59
3.10. Aflatoksin ve Okratoksin A Analiz Yöntemlerinin Validasyonu	59
3.10.1. Gözlenebilme (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları	60
3.10.2. Doğruluk	60
3.10.3. Kesinlik	60
3.10.3.1. Tekrar edilebilirlik	60
3.10.3.2. Tekrar üretilebilirlik	61
3.10.3.3. Tekrar üretilebilirlik limiti	61
3.10.4. Geri kazanım	61

3.10.5. Uygunluk testi	61
3.11. Modifiye Edilen Yöntemle Aflatoksin Miktar Tayini	61
3.12. Modifiye Edilen Yöntemle Okratoksin A Miktar Tayini	61
4. BULGULAR.....	62
4.1. ELISA Testi Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	62
4.2. Aflatoksin Tayininde Kullanılan Temel Metodun Validasyonu.....	64
4.2.1. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	64
4.3. Aflatoksin Tayini İçin Modifiye Edilen Metodun Validasyonu	77
4.4. Okratoksin A Tayini İçin Kullanılan Temel Metodun Validasyonu	90
4.4.1. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	90
4.5. Okratoksin A Tayini İçin Modifiye Edilen Metodun Validasyonu	95
4.6. Modifiye Toplam Aflatoksin ve Okratoksin A Metotları Uygunluk parametreleri	101
4.7. Örneklerde Aflatoksin ve Okratoksin A Miktar Tayin Sonuçları.....	101
5. TARTIŞMA	102
KAYNAKLAR	105
HAM VERİLER	112
ÖZGEÇMİŞ	116

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Mikotoksin çeşitleri.....	4
Tablo 2-2: Aflatoksinlerin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	7
Tablo 2-3: Mikotoksinlerin sağlık üzerindeki etkileri	22
Tablo 2-4: AB kriterlerine göre düzenlenmiş Türk Gıda Kodeksindeki mikotoksin limitleri (2011, Sayı: 28157, Ek:1)	27
Tablo 3-1: Analiz örneklerinin sınıflandırılmaları ve kodları	47
Tablo 4-1: Temel toplam Aflatoksin metodu LOD ve LOQ değerleri	68
Tablo 4-2: Temel Aflatoksin B1 metodu geri kazanım çalışması	69
Tablo 4-3: Temel Aflatoksin B2 metodu geri kazanım çalışması	70
Tablo 4-4: Temel Aflatoksin G1 metodu geri kazanım çalışması	71
Tablo 4-5: Temel Aflatoksin G2 metodu geri kazanım çalışması	72
Tablo 4-6: Temel Aflatoksin B1 metodu doğruluk çalışması.....	73
Tablo 4-7: Temel Toplam Aflatoksin Metodu Doğruluk Çalışması.....	73
Tablo 4-8: Temel Aflatoksin B1 Metodu Tekrarlanabilirlik Çalışması (1. Analist)	73
Tablo 4-9: Temel Aflatoksin B1 metodu tekrarlanabilirlik çalışması (2. Analist).....	74
Tablo 4-10: Temel Toplam Aflatoksin metodu tekrarlanabilirlik çalışması (1. Analist).....	74
Tablo 4-11: Temel Toplam Aflatoksin metodu tekrarlanabilirlik çalışması (2. Analist).....	75
Tablo 4-12: Temel Aflatoksin B1 metodu tekrar üretilebilirlik çalışması.....	75
Tablo 4-13: Temel toplam Aflatoksin metodu tekrar üretilebilirlik çalışması	76
Tablo 4-14: Temel Aflatoksin B1 metodu tekrar üretilebilirlik limiti çalışması	76
Tablo 4-15: Temel Toplam Aflatoksin metodu tekrar üretilebilirlik limiti çalışması	76
Tablo 4-16: Modifiye toplam Aflatoksin metodu LOD ve LOQ değerleri	81
Tablo 4-17: Modifiye metot Aflatoksin B1 geri kazanım çalışması	82
Tablo 4-18: Modifiye metot Aflatoksin B2 geri kazanım çalışması	83
Tablo 4-19: Modifiye metot Aflatoksin G1 geri kazanım çalışması	84
Tablo 4-20: Modifiye metot Aflatoksin G2 geri kazanım çalışması	85
Tablo 4-21: Modifiye Aflatoksin B1 metodu doğruluk çalışmaları	86
Tablo 4-22: Modifiye toplam Aflatoksin metodu doğruluk çalışmaları.....	86
Tablo 4-23: Modifiye Aflatoksin B1 metodu tekrarlanabilirlik çalışması (1. Analist) ..	86
Tablo 4-24: Modifiye Aflatoksin B1 metodu tekrarlanabilirlik çalışması (2. Analist) ..	87

Tablo 4-25: Modifiye toplam Aflatoksin metodu tekrarlanabilirlik çalışması (1. Analist)	87
Tablo 4-26: Modifiye toplam Aflatoksin metodu tekrarlanabilirlik çalışması (2. Analist)	88
Tablo 4-27: Modifiye Aflatoksin B1 metodu tekrar üretilebilirlik çalışması	88
Tablo 4-28: Modifiye toplam Aflatoksin metodu tekrar üretilebilirlik çalışması	89
Tablo 4-29: Modifiye Aflatoksin B1 metodu tekrar üretilebilirlik limiti çalışması	89
Tablo 4-30: Modifiye toplam Aflatoksin metodu tekrar üretilebilirlik limiti çalışması	89
Tablo 4-31: Temel Okratoksin A metodu LOD ve LOQ sonuçları	92
Tablo 4-32: Temel Okratoksin A metodu geri kazanım çalışması sonuçları (8 µg/kg ve 3 µg/kg)	92
Tablo 4-33: Temel Okratoksin A metodu doğruluk çalışması sonuçları	93
Tablo 4-34: Temel Okratoksin A metodu tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları (1. analist)	93
Tablo 4-35: Temel Okratoksin A metodu tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları (2. analist)	94
Tablo 4-36: Temel Okratoksin A metodu tekrar üretilebilirlik çalışması sonuçları	94
Tablo 4-37: Temel Okratoksin A metodu tekrar üretilebilirlik limiti çalışması sonuçları	95
Tablo 4-38: Modifiye Okratoksin A metodu LOD ve LOQ sonuçları	98
Tablo 4-39: Modifiye Okratoksin A metodu geri kazanım sonuçları (8 µg/kg ve 3 µg/kg)	98
Tablo 4-40: Modifiye Okratoksin A metodu doğruluk çalışması sonuçları	98
Tablo 4-41: Modifiye Okratoksin A metodu tekrarlanabilirlik sonuçları (1. analist)	99
Tablo 4-42: Modifiye Okratoksin A metodu tekrarlanabilirlik sonuçları (2. analist)	99
Tablo 4-43: Modifiye Okratoksin A metodu tekrar üretilebilirlik sonuçları	100
Tablo 4-44: Modifiye Okratoksin A metodu tekrar üretilebilirlik limiti sonuçları	100
Tablo 4-45: Modifiye Toplam Aflatoksin ve Okratoksin A Metotları Uygunluk Parametreleri	101
Tablo 4-46: HPLC ve ELISA ile örneklerde tespit edilen Aflatoksin ve Okratoksin A düzeyleri	101

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Aflatoksin B1, B2, G1, G2, M1, M2 ve B2a'nın kimyasal yapısı	6
Şekil 2-2: Aflatoksin B1 biyosentezinde öncü kabul edilen norsolorinik asidin oluşma aşamaları	8
Şekil 2-3: Aflatoksin B1 biyosentezine kadar oluşan ara ürünler	8
Şekil 2-4: OTA.....	10
Şekil 2-5: OTA'nın biyosentezi.....	11
Şekil 2-6: Ergot alkaloidleri.....	13
Şekil 2-7: Liserjik asit.....	13
Şekil 2-8: Zeralenon.....	14
Şekil 2-9: Patulin	15
Şekil 2-10: Fumonisin B1 ve fumonisin B2	16
Şekil 2-11: Reaktif metabolitlerin ve biyogöstergelerin oluşumuna aracılık eden AFB1 metabolizması	24
Şekil 2-12: Mikotoksin analizlerinde numune hazırlık aşaması.....	37
Şekil 2-13: Aflatoksin B1'in TFA ile olan reaksiyonu.....	42
Şekil 2-14: Aflatoksin B1'in iyot ve PBPB ile reaksiyonları	42
Şekil 2-15: KOBRA-cell.....	43
Şekil 3-1: Mikotoksin ELISA test kitleri.....	53
Şekil 3-2: Aflatoksin analiz örneğinin hazırlanması (temel metot).....	54
Şekil 3-3: Aflatoksin analiz örneğinin hazırlanması (modifiye metot)	55
Şekil 3-4: Okratoksin A analiz örneğinin hazırlanması (temel metot).....	56
Şekil 3-5: Okratoksin A analiz örneğinin hazırlanması (modifiye metot).....	57
Şekil 4-1: ELISA yöntemi toplam aflatoksin kalibrasyon eğrisi.....	62
Şekil 4-2: ELISA yöntemi aflatoksin B1 kalibrasyon eğrisi	63
Şekil 4-3: ELISA yöntemi okratoksin A kalibrasyon eğrisi	63
Şekil 4-4: Aflatoksin B1 kalibrasyon eğrisi.....	64
Şekil 4-5: Aflatoksin B2 kalibrasyon eğrisi.....	65
Şekil 4-6: Aflatoksin G1 kalibrasyon eğrisi	65
Şekil 4-7: Aflatoksin G2 kalibrasyon eğrisi	66
Şekil 4-8: Temel Aflatoksin metodu kalibrasyon verilerine ait kromatogram	66

Şekil 4-9: Temel toplam Aflatoksin metodu LOD kromatogramı.....	67
Şekil 4-10: Temel toplam Aflatoksin geri kazanım kromatogramı	67
Şekil 4-11: Modifiye Aflatoksin B1 metodu kalibrasyon eğrisi.....	77
Şekil 4-12: Modifiye Aflatoksin B2 metodu kalibrasyon eğrisi.....	78
Şekil 4-13: Modifiye Aflatoksin G1 metodu kalibrasyon eğrisi.....	78
Şekil 4-14: Modifiye Aflatoksin G2 metodu kalibrasyon eğrisi.....	79
Şekil 4-15: Modifiye Aflatoksin metodu kalibrasyon verilerine ait kromatogram.....	79
Şekil 4-16: Modifiye Aflatoksin metodu LOD kromatogramı	80
Şekil 4-17: Modifiye Aflatoksin metodu geri kazanım çalışması kromatogramı.....	80
Şekil 4-18: Okratoksin A kalibrasyon eğrisi.....	90
Şekil 4-19: Temel Okratoksin A metodu kalibrasyon verilerine ait kromatogram	91
Şekil 4-20: Temel Okratoksin A metodu LOD çalışması kromatogramı	91
Şekil 4-21: Temel Okratoksin A metodu geri kazanım çalışması kromatogramı.....	92
Şekil 4-22: Modifiye Okratoksin A metodu kalibrasyon eğrisi.....	96
Şekil 4-23: Modifiye Okratoksin A metodu kalibrasyon verilerine ait kromatogram....	96
Şekil 4-24: Modifiye Okratoksin A metodu LOD çalışması kromatogramı	97
Şekil 4-25: Modifiye Okratoksin A metodu geri kazanım çalışması kromatogramı	97

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μA	: Mikroamper
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
AFB1	: Aflatoksin B1
AFB2	: Aflatoksin B2
AFM1	: Aflatoksin M1
AFM2	: Aflatoksin M2
AOAC	: American Official Analytical Chemistry
Atm	: Atmosfer
ATP	: Adenozin trifosfat
aw	: Su aktivitesi
C	: Konsantrasyon
cm	: Santimetre
CoA	: Koenzim A
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
DON	: Deoksinivalenol
ECD	: Electron capture dedector
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
FAO	: Food and Agriculture Organization
FAS	: Fatty acid synthesis
FB1	: Fumonisin B1
FB2	: Fumonisin B2
FID	: Flame ionization dedector
g	: Gram
GC-MS	: Gaz kromatografisi- Kütle spektrometrisi
Hex A	: Hexosaminidase A

Hex B	: Hexosaminidase B
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IAK	: Immunoafinite Kolon
IARC	: International Agency for Research on Cancer
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
k'	: Kapasite faktörü
KBr	: Potasyum bromür
kg	: Kilogram
kGy	: Kilogray
KOBRA	: Kok-bromination apparatus
LOD	: Gözlenebilme limiti
LOQ	: Teşhis limiti
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
MS	: Kütle Spektroskopisi
N	: Teorik plato sayısı
ng	: Nanogram
NOAEL	: No adverse effect levels
O ₃	: Ozon
OH ⁻	: Hidroksit
OTA	: Okratoksin A
PAT	: Patulin
PBPB	: Piridinyum hidrobromür perbromür
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PKS	: Poliketit sintaz
PMTDI	: Provisional maximum tolerable daily intake
ppb	: Parts per billion
RP	: Reversed phase

RSD	: Relatif standart sapma
S/N	: Sinyal/gürültü
SD	: Standart sapma
SF	: Seyreltme faktörü
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu
T	: Kuyruklanma faktörü
TFA	: Triflorasetik asit
t_R	: Retansiyon zamanı
UV	: Ultraviyole Spektroskopisi
WHO	: World Health Organization
ZON	: Zeralenon

ÖZET

Hacıbekiroğlu I. (2013). Gıda Örneklerinde Aflatoksin (G1, G2, B1, B2) ve Okratoksin A'nın HPLC Metot Validasyonu ve Miktar Tayinleri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi. İstanbul.

Birçok ülkede mikotoksinler ile ilgili yasal limitler belirlenmiş ve bu yasal limitler çerçevesinde gıda ürünlerinin kontrolü için güvenilir test yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu tez çalışmasının amacı, toplam aflatoksin (G2, G1, B2, B1) ve okratoksin A için HPLC metodu geliştirip valide etmek ve bu metotlarla 82 adet işlenmiş tahıl örneğinde aflatoksin ve okratoksin A tayini yapmaktır. Modifiye edilen metotlarla 0,5 µg/kg kadar düşük seviyelerde toplam aflatoksin ve okratoksin A içeren örneklerin analizi mümkün oldu. Örnek hazırlık aşamasında metanol:su ile yapılan ekstraksiyonda % 80'in üzerinde geri kazanım elde edildi. Modifiye metotların temel metotlardan daha hassas oldukları saptandı. Toplam aflatoksin, aflatoksin B1 ve okratoksin A için teşhis limitleri sırasıyla, 0,4 µg/kg, 0,117 µg/kg ve 1,477 µg/kg olarak bulundu. Geri kazanım çalışmaları toplam aflatoksin analizinde 8 µg/kg and 5 µg/kg olarak iki seviyede yapıldı, ortalama geri kazanım değeri %98 olarak bulundu. Okratoksin A analizinde 8 µg/kg and 3 µg/kg olarak iki seviyede yapıldı, ortalama geri kazanım değeri %91 olarak bulundu. Modifiye edilen metotların tekrarlanabilirlik çalışmalarında relatif standart sapma değerleri toplam aflatoksin metodunda % 2,83-3,90 arasında, okratoksin A metodunda % 11,15-12,48 arasında bulundu. Sonuç olarak, modifiye metotlar, aynı laboratuvarında ve farklı analistlerle yapılan çalışmalarda bütün seviyelerde kabul edilebilir sonuçlar verdi. Bu nedenle, modifiye edilen bu metotlarla, Avrupa Birliği'nin düzenlediği işlenmiş tahıl ürünlerinde aflatoksin ve okratoksin A limitlerine göre analiz yapılabileceği ve çok düşük seviyelerde bile bu mikotoksinlerin analizine olanak sağlayacakları kanıtlandı. Sonuç olarak, floresans dedektör ve KOBRA-cell kombinasyonlu HPLC kullanılarak aflatoksin ve okratoksin A tayini için modifiye ve valide edilen yöntemler analiz örneği için seçici ve iyi bir kromatografik ayırımın kısa sürede yapılmasını sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Mikotoksin, Toplam Aflatoksin, Aflatoksin B1, Okratoksin A, Metot Validasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22522

ABSTRACT

Hacıbekiroğlu I. (2013). Method Validation and Determination of Aflatoxin (G1, G2, B1, B2) and Ochratoxin A in Food Samples by HPLC. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Istanbul.

Regulatory limits for mycotoxines have been established in many countries, and reliable testing methodology is needed to implement and enforce the regulatory limits. The aim of this thesis is to develop and validate the HPLC methods for the determination of the total aflatoxin (G2, G1, B1, B2) and ochratoxin A in 82 processed cereal samples. The methods with all tested variations were found to be fit-for-purpose for the determination of total aflatoxin, aflatoxin B1 and ochratoxin A in processed cereal samples at levels of 0.5 µg/kg and above with mean recoveries 80% for the extraction with methanol-water. The LOQs of total aflatoxin, aflatoxin B1 and ochratoxin A were 0.117 µg/kg, 0.4 µg/kg and 1.477 µg/kg, respectively. For total aflatoxin, the mean recovery at 8 µg/kg and 5 µg/kg was 98 % and for ochratoxin A, the mean recovery at 8 µg/kg and 3 µg/kg was 91 %. The relative standard deviation for repeatability was found to be 1.03 – 9.34 % for modified method of total aflatoxin and 11.15 – 15.05 % for modified method of ochratoxin A. In conclusion, the modified methods showed acceptable results at the same laboratory with different analysts for cereals products at all levels. Therefore, the newly modified methods allow the enforcement of EU legislative limits for aflatoxins and ochratoxin A in processed cereal products. Finally, the modified and validated methods for determination of aflatoxins and ochratoxin A using high performance liquid chromatography in combination with a fluorescence detector and KOBRA-cell, resulted in a selective and good chromatographic and analyte selective separation within a shorter time.

Keywords: Mycotoxin, Total Aflatoxin, Aflatoxin B1, Ochratoxin A, Method Validation

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University, Project No:22522.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler, esas olarak protein yapısında ve antijen özellikte olan bakteriyel toksinlerin aksine, çok çeşitli kimyasal yapı ve biyolojik aktiviteye sahip maddelerdir. Üzerinde en çok çalışılmış mikotoksin grubu olan aflatoksinler 1960 yılında keşfedilmiştir, 1962 yılında ise güçlü “hepatotoksik” ve “hepatokarsinojen” etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*'un bazı suşları, *Aspergillus parasiticus*'un ise hemen hemen bütün suşları tarafından üretilmektedir. Ancak 1987 yılında *A. flavus*'a fenotipik olarak benzeyen *A. nomius* ve son olarak da *A. pseudotamarii*'nin de aflatoksin ürettikleri tespit edilmiştir.

Asya ve Afrika'nın çeşitli ülkelerinde yapılan çalışmalarda, karaciğer kanserine yakalanma sıklığı ile aflatoksinle kontamine olmuş gıdaların tüketim düzeyi arasında kuvvetli bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalarda bir dönem diğer hepatokarsinojenik etmen olan hepatit B virüsü enfeksiyonunun dikkate alınmadığı gerekçesiyle bir tartışma başlatılmıştır. Ancak yapılan moleküler genetik çalışmalarda, aflatoksinin insanlarda karaciğer kanserine neden olduğu konusunda önemli bulgular elde edilmiştir.

Okratoksin A ve daha az toksijenik olan Okratoksin B ilk kez 1965 yılında Güney Afrikalı kimyacılar tarafından tanımlanmıştır ve D.B. Scott tarafından sorgum tanelerinden izole edilen *A. ochraceus* K-804 suşundan izole edilmiştir. Bunu takip eden çalışmalarda arpa, buğday, pirinç, yulaf, soya fasulyesi, kahve çekirdekleri, kırmızı biber gibi bitkisel ürünlerde, un, kahve, ekmek, bira gibi bitkisel orijinli gıdalarda, hayvan yemlerinde ve yem hammaddelerinde tespit edilmiştir. Bugün hemen hemen bütün ülkeler, bu tehlikeden korunmak ve ihraç ettikleri ürünlerin geri dönüşünü azaltmak için gıda ve yemlerde bulunabilecek aflatoksin ve okratoksin düzeyleri için limitler belirlemektedir. Avrupa Birliği'nin bir direktifinde; “Bugünkü bilimsel ve teknolojik bilgilerin ve üretim/depolama tekniklerindeki gelişmelerin, bu toksinlerin oluşumunu tamamen önleyemediği bu nedenlerle de mümkün olduğu kadar düşük limitler belirlenmesi gerektiği” belirtilmektedir.

Ülkemizde de Türk Gıda Kodeksi'nde gıdalar, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın Tebliği'nde ise gıda ve yemler için aflatoksin ve okratoksin A limitleri belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, tahıl bazlı işlenmiş gıda örneklerinde aflatoksin (G1, G2, B1, B2) ve okratoksin A'nın HPLC metot validasyonunun yapılması ve valide edilen yöntemlerle bu mikotoksinlerin miktar tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, küfler tarafından üretilen, gıdalarda ve hayvan yemlerinde meydana gelen sekonder toksik metabolitler olarak tarif edilen doğal kontaminantlardır. Sekonder toksik metabolit terimi, bütün yaşayan organizmalardaki primer metabolitler (amino asitler, nükleik asitler, proteinler v.d.) ve bitkinin büyümesi için gerekli olan bileşiklerden ayırmak için kullanılmıştır.

Mikotoksin terimi Yunanca “mukoz” ve Latince zehir anlamına gelen “toksikum” kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur (Turner ve ark. 2009). Bugüne kadar çeşitli kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı yapısal farklılık gösteren yüzlerce mikotoksin çeşidi keşfedilmiştir. Aflatoksin, okratoksin, fumonisin, trikotesen, zeralenon, patulin ve ergot alkaloidleri insan ve hayvan sağlığını tehdit eden ve en sık karşılaşılan mikotoksinlerdir (Bennett ve Klich 2003).

Mantarların gelişmesi ve mikotoksin üretebilmeleri, sıcaklık, pH, rutubet, oksijen ve karbondioksit düzeyleri, mikroorganizma rekabeti, mantarın türü gibi koşullara bağlıdır. Ayrıca, mantarın gelişmesi gıda ve bileşimine de bağlıdır. Bütün bu etkenler mikotoksinlerin sınıflandırılmasında da önemli rol oynar (Ominsk ve ark. 1994 pp. 287-314). Mikotoksinlerin sınıflandırılmaları bilim adamlarının çalışma alanlarına göre farklılıklar göstermiştir. Klinisyenler mikotoksinleri organlar üzerinde gösterdikleri etkiye göre; hepatotoksinler, nefrotoksinler, nörotoksinler, immunotoksinler olarak, biyologlar kimyasal risklerine göre; teratojen, mutajen, karsinojen ve alerjen olarak, organik kimyacılar kimyasal yapılarına göre; lakton, kumarin olarak, biyokimyacılar biyosentetik orijinlerine göre; poliketitler, aminoasit türevleri olarak, mikolojistler hangi mantar tarafından üretildiklerine göre; *Aspergillus* toksinleri, *Penicillium* toksinleri olarak sınıflandırırlar. (Scott 1991).

2.2. Mikotoksin Çeşitleri

Tablo 2-1’de mikotoksinler üretildikleri mantar türlerine göre gruplandırıldı.

Tablo 2-1: Mikotoksin çeşitleri

Mikotoksin üreten mantar cinsleri	Mantar türleri	Mikotoksinler
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i>	Aflatoksin
	<i>A. ochraceus</i>	Okratoksin
	<i>A. clavatus</i> <i>A. terreus</i>	Patulin
	<i>A. flavus</i> <i>A. versicolor</i>	Siklopiazonik asit
<i>Claviceps</i>	<i>C. purpurea</i> <i>C. fusiformis</i> <i>C. paspali</i> <i>C. africana</i>	Ergot alkaloitleri Klavinler Liserjik asit Ergopeptinler
<i>Fusarium</i>	<i>F. moniliforme</i> <i>F. proliferatum</i>	Fumonisin
	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. poae</i> <i>F. acuminatum</i> <i>F. sambucinum</i> <i>F. sporotrichioides</i>	<u>A tipi Trikotesenler</u> T-2 Toksin, HT-2 Toksin <u>B tipi Trikotesenler</u> Nivalenol Doeksinivalenol Fusarenon - X
	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. sporotrichioides</i>	Zeralenon
<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i> <i>P. virridicatum</i>	Okratoksin

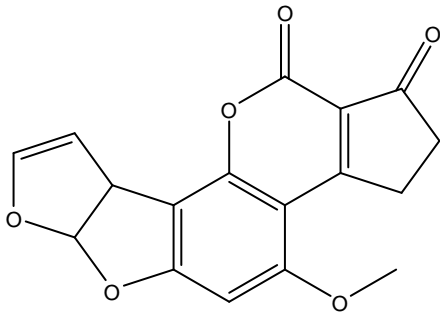
	<i>P. citrinum</i> <i>P. verrucosum</i>	Sitrin
	<i>P. roqueforti</i>	Roquefortin
	<i>P. cyclopium</i> <i>P. camemberti</i>	Siklopiazonik asit
	<i>P. expansum</i> <i>P. claviforme</i> <i>P. roqueforti</i>	Patulin

2.2.1. Aflatoksin

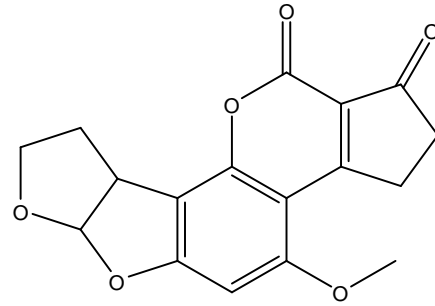
Aflatoksinler *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* tarafından üretilen toksik metabolitlerdir. Başlıca 4 çeşit aflatoksin türü vardır: B1, B2, G1, G2. Aflatoksin B1, bu dördü arasında toksisite derecesi en yüksek olanıdır. Artan toksisite sıralaması B1>G1>B2>G2 şeklindedir. Aflatoksin ile kontaminasyon riski en yüksek olan gıdalar arasında mısır, yer fıstığı, pamuk tohumu, Antep fıstığı yer alır.

Aflatoksin kelimesi *Aspergillus*'un ilk harfi "a" ile *flavus*'un ilk üç harfi "fla" dan türemiştir. Aflatoksinin **B1** ve **B2** formu UV ışık altında mavi floresans renk göstermesinden (**B**lue), **G1** ve **G2** formu ise yeşil floresans renk göstermesinden (**G**reen) dolayı bu şekilde adlandırılmışlardır. Aflatoksinin diğer iki formu olan **M1** ve **M2**, aflatoksin bulaşan gıdalarla beslenen laktasyondaki hayvanların sütünden (**M**ilk) izole edilmişlerdir (Creppy 2002).

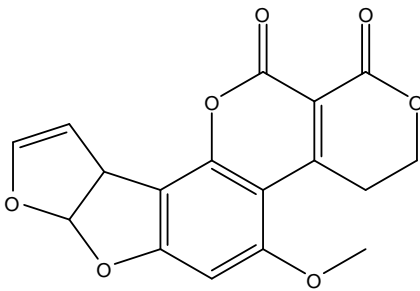
Aflatoksinler metanol, kloroform ve asetonda çözünmelerine rağmen su ve petrol eterinde çözünmezler. Kuru halde erime noktalarına kadar ısıya dayanıklıdırlar. Aflatoksinlerin kimyasal ve fiziksel özellikleri Tablo 2-2'de, kimyasal yapıları Şekil 2-1'de gösterilmektedir.



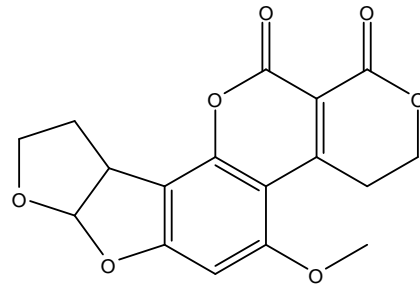
Aflatoxin B1



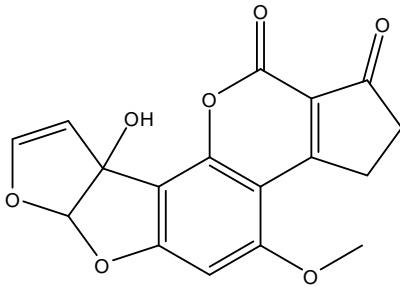
Aflatoxin B2



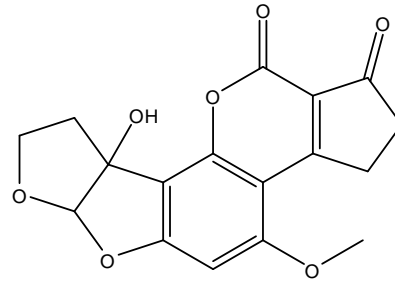
Aflatoxin G1



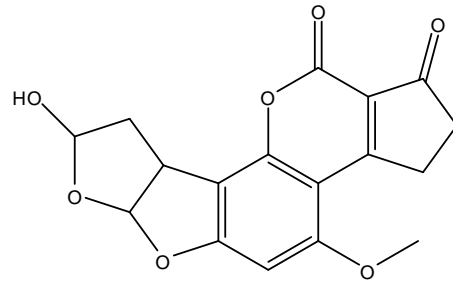
Aflatoxin G2



Aflatoxin M1



Aflatoxin M2



Aflatoxin B2a

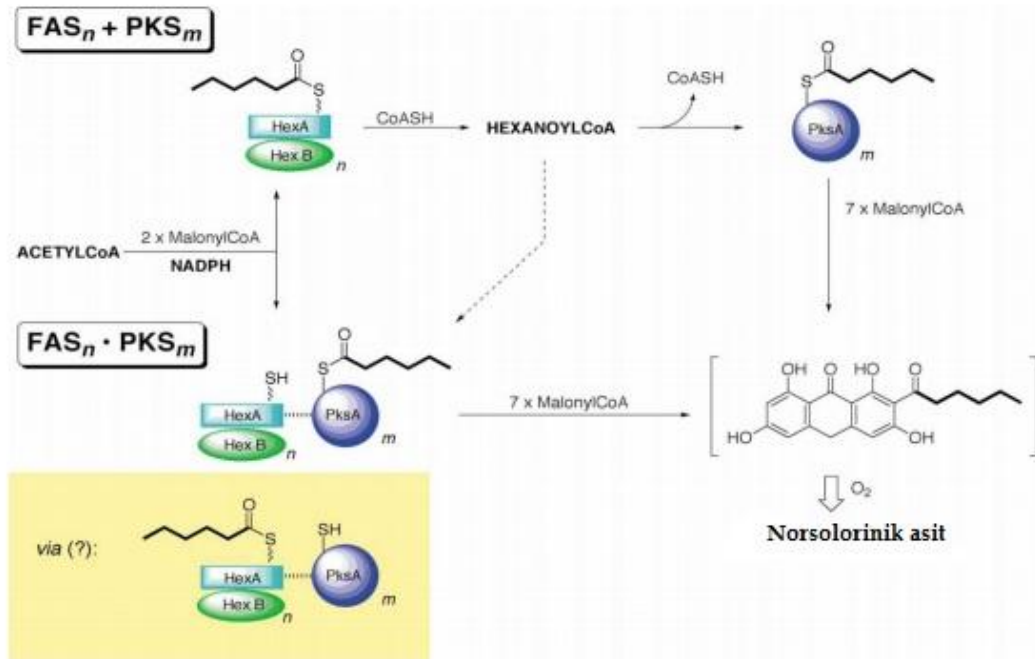
Şekil 2-1: Aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, M2 ve B2a'nın kimyasal yapısı

Tablo 2-2: Aflatoksinlerin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

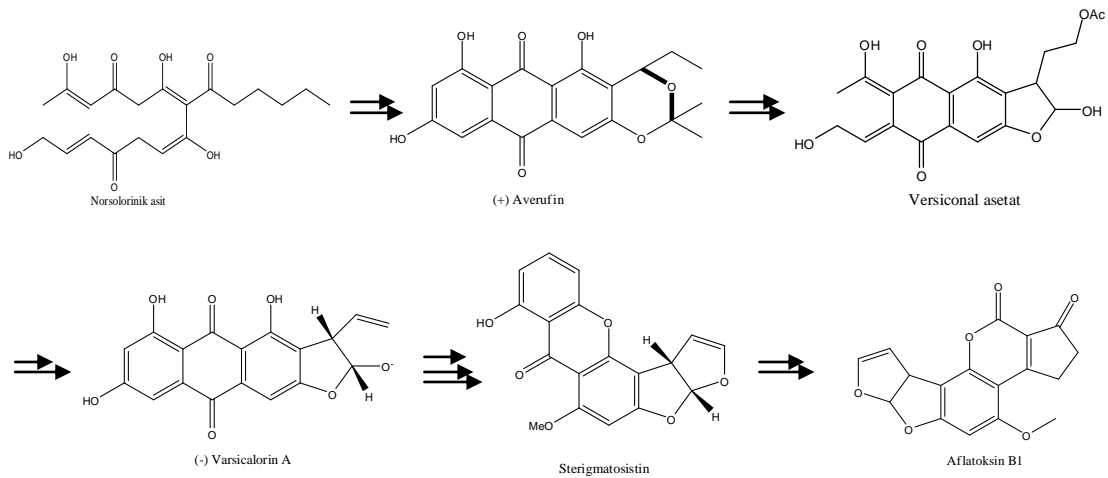
Aflatoksin	Molekül Formülü	Moleküler Ağırlık [g/mol]	Erime noktası [°C]
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,28	268-269
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,30	286-289
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,28	244-246
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,30	237-240
M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,28	299
M2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,30	293
B2a	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,30	240

AFB1'in biyosentez yolu kısmen aydınlatılmıştır. Aflatoksinin yapısında bulunan furan ve kumarin halkaları, primer metabolitlerden olan asetik asit ve malonik asitten oluşmaktadır. Sekiz kademeli reaksiyon zincirinin son ürünü AFB1'dir. Başka funguslar tarafından oluşturulan, özellikle *A. versicolor* suşlarının yüksek düzeyde ürettiği sterigmatosistin, AFB1 biyosentez yolunda bir ara metabolit olarak görülür.

AFB1, 25 genin dahil olduğu poliketit yolunu izleyerek sentezlenir (Papa 1984). Aflatoksin B1'in biyosentezinde ilk aşama, Hex A ve Hex B olmak üzere, iki tane Fatty Asit Sintaz (FAS) enziminin, asetat ve malonil CoA'yı, 6 karbonlu "starter ünitesi" diye de adlandırılan alkil ara ürününe uzatılarak, fungal poliketit sintaz (PKS)'lara transfer edilmesi ile başlar (Coran ve ark. 2002). FAS ve PKS enzimleri, 2-4 karbon üniteli yapılardan başlayarak çok çeşitli ve çok daha kompleks yapıları oluşturabilmektedir. PKS'ye transfer edilen bu "starter ünitesi", burada 7 malonik asidin de dahil olmasıyla 7 kez gerçekleşen 2 karbon ekleme işleminden sonra, aldol dehidrasyonu ve Claisen kondensasyonu ile aflatoksinin öncüsü olarak da adlandırılan norsolorinik asitin sentezlenmesi gerçekleşir (Minto ve Townsend 1997) (Şekil 2-2). Bazı *Aspergillus* türlerinde norsolorinik asit redüktaz enzimi bulunmamaktadır. Bu yüzden, bu asidin AFB1'e dönüşümü gerçekleşmez ve biriken asit kırmızı-turuncu renkte bir pigment olarak gözlemlenebilir (Papa 1984). Norsolorinik asit oluşumundan sonra, bu asitten aralarında averufin ve sterigmatosistin gibi ara ürünlerin de bulunduğu ve yaklaşık olarak 15 ve üzeri enzimin katalizlenmesi sonucu AFB1 sentezlenmektedir (Şekil 2-3) (Minto ve Townsend 1997).



Şekil 2-2: Aflatoxin B1 biyosentezinde öncü kabul edilen norsolorinik asidin oluşma aşamaları



Şekil 2-3: Aflatoxin B1 biyosentezine kadar oluşan ara ürünler

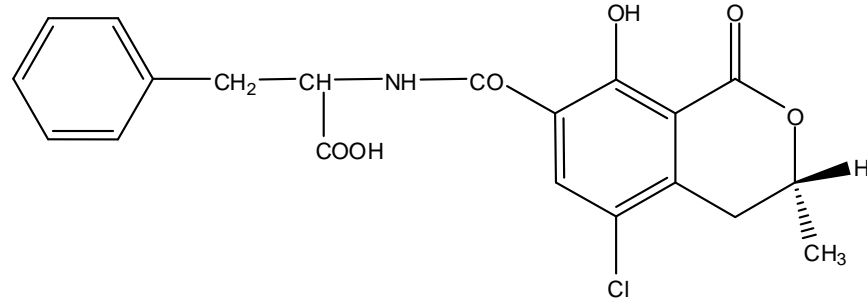
2.2.2. Okratoksin

Okratoksin A (OTA) ve daha az toksik dekloro analogu olan Okratoksin B ilk kez 1965 yılında Güney Afrika'lı kimyacılar tarafından tanımlanmış ve D.B. Scott tarafından sorgum tanelerinden elde edilen *Aspergillus ochraceus* K-804 suşundan izole edilmiştir (Fukal 1990; Steyn 1984). İnsanlarda Balkan endemik nefropatisi, domuzlarda Danimarka böbrek nefropatisi ve ayrıca kümes hayvanlarındaki önemli bir

sağlık sorununun muhtemel kaynağının OTA olduğu belirlenmiştir. Günümüzde artık OTA, 10'dan fazla ülkede doğal bir kontaminant olarak kabul edilmektedir (Van Egmond 1991). OTA'nın dünyanın çeşitli ülkelerinde baklagillerde, hububatlarda ve diğer bitkisel ürünlerde, hayvan yemlerinde, hayvan etlerinde ve insan dokularında varlığı saptanmıştır. OTA bitkisel ürünler içerisinde özellikle mısır, buğday, arpa, sorgum, yulaf, baklagiller, yer fıstığı ve karışık yemlerde bulunan en önemli mikotoksinlerden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca domuz dokularında da yaygın olduğu ve OTA düzeyinin hayvansal ürünlerde hububatlardakilerden daha fazla olduğu bildirilmiştir (Fukal 1990).

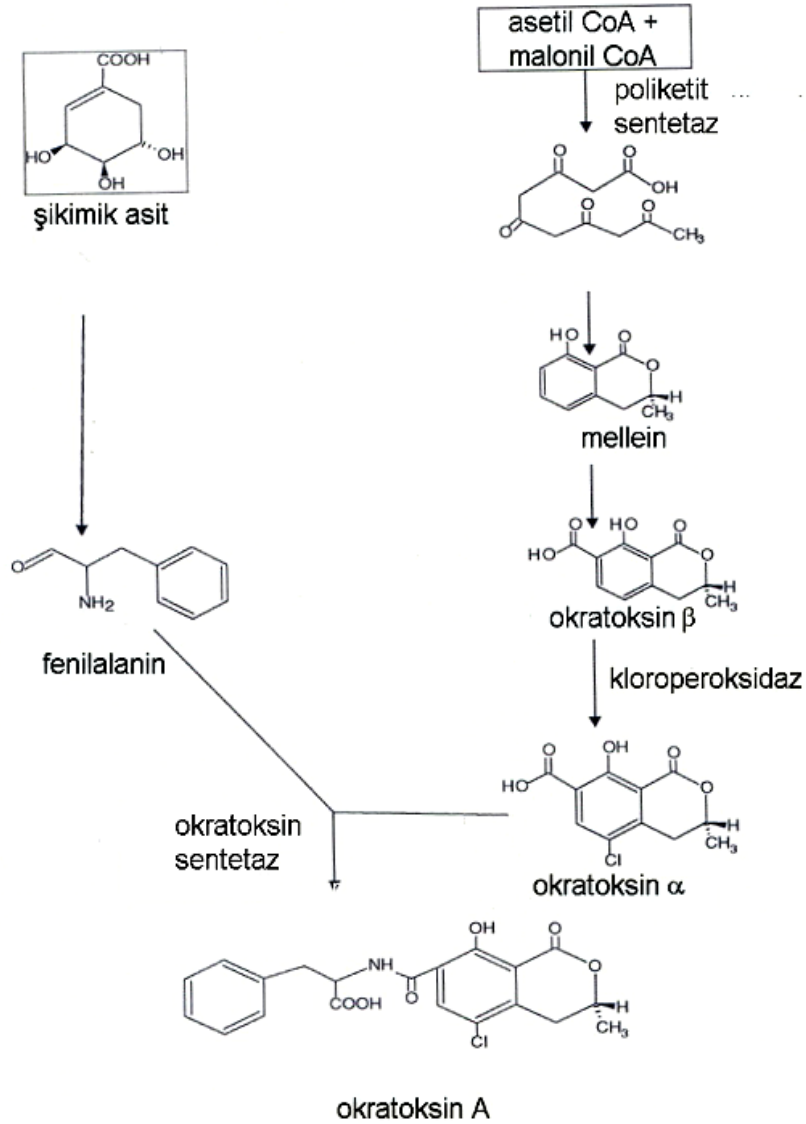
Peptit bağı ile fenilalanine bağlanmış bir izokumarin türevidir. OTA'nın oluşumunu belirleyen en önemli iki faktör sıcaklık ve nemdir. *Aspergillus* türleri yüksek nem ve sıcaklıkta (12-37°C) toksin sentezlerken *Penicillium* türleri daha düşük sıcaklıklarda bile (4-31°C) toksin sentezleyebilmektedirler.

OTA, renksiz, kristalimsi, suda az çözünen, fakat sulu sodyum bikarbonatlı çözeltilerde çözünebilen, zayıf asidik özellikte bir bileşiktir. Ksilen ile yeniden kristalize edilebilir. Kristal formda, ultraviyole altında, asit çözeltide yeşil ve alkalik çözeltide mavi floresans verir, bu kristallerin erime noktası 169°C'dir. OTA'nın serbest asidi polar organik çözücüler içinde çözünebilir. OTA, ışık ve havada dayanıklı değildir. Işık ve özellikle nemli koşullara maruz kaldığı zaman bozulabilir ve etkisini kaybedebilir. Etanol çözeltisinde karanlık ve soğukta muhafaza edildiği zaman, bir yıldan fazla dayanır. OTA, ısıya karşı oldukça dayanıklıdır, hububat ürünlerinin otoklavda (121°C, 1 atm) 3 saat kalması durumunda dahi toksinin %35'i etkinliğini sürdürür. Isıyla ayrıştırıldığı zaman toksinden klorun toksik buharı ve nitrik oksit ortama verilir. Normal koşullar altında okratoksin A ve B oluşturulur. Okratoksin B, OTA'dan daha az toksiktir ve karaciğer hücrelerinde protein biyosentezini inhibe etmez. OTA'nın moleküler formülü 1965 yılında Van der Merwe ve arkadaşları tarafından 7 karboksi-5-kloro-8-hidroksi-3,4-dihidro-3-metil izokumarin olarak açıklanmıştır (Şekil 2-4) (Van der Merwe ve ark. 1965). OTA, dihidro-metil-izokumarin halka sisteminde C5 üzerinde klor atomuna sahiptir, bu atom okratoksin B'de bulunmaz ve klor atomuna fenolik OH eklenmesi toksisiteyi artırır. Fenilalanin ve dihidroizokumarin bileşikleri amit bağı ile bağlanırlar ve bu bağ ısıya ve hidrolize karşı çok dayanıklıdır (Frenettea ve ark. 2008; Park ve ark. 2000).



Şekil 2-4: OTA

Okratoksinler, L- β fenilalanine amit bağı ile bağlı izokumarin türevleridir. Biyosentetik orijinine göre poliketidler grubu içinde pentaketitler olarak sınıflandırılmıştır. Pentaketitler, asetil ve malonil CoA'dan oluşurlar. Pentaketit, siklizasyon ve aromatisasyon ile izokumarine dönüşür. Karboksi türevinin metilasyon, oksidasyon, klorinasyon ve asit aktivasyonları ile şikimik asit yolu sonrası oluşan fenilalanin ve fosfookratoksin A, OTA'yı oluşturmaktadır. Klorinasyon aşamasının kloroperoksidaz enziminin varlığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Kloroperoksidaz düşük substrat spesifitesi gösteren, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan iki yüzden fazla halojenlenmiş maddelerin biyosentezi uyaran bir enzimdir. OTA'daki klor fenolik gruba göre para konumundadır. OTA biyosentezindeki iki ana kısmın (fosfookratoksin A ve fenilalanin etil esteri) oluşmasını, bunların birleşme reaksiyonları takip eder. Birleşme reaksiyonu, okratoksin sentetaz kompleksi ile olur, ATP ve Mg^{+2} reaksiyon için gereklidir. Yapılan çalışmalar ışığında, okratoksinin beş türevi olduğu bilinmektedir. Bunlar; Okratoksin A, B, C, α ve β 'dir. Bunların içinde toksik açıdan en önemlisi molekül ağırlığı 403,83, kimyasal formülü $C_{20}H_{18}ClNO_6$ olan OTA'dır. OTA'nın yarılanma ömrü; farelerde 24-39 saat, sıçanlarda 55-120 saat, domuzlarda 72-120 saat, maymunlarda 456-504 saat, insanlarda ise 840 saattir (Krogh 1992; Huff ve ark. 1979). Şekil 2-5'te OTA'nın biyosentezi özetlenmiştir.



Şekil 2-5: OTA'nın biyosentezi

2.2.3. Ergot alkaloidleri

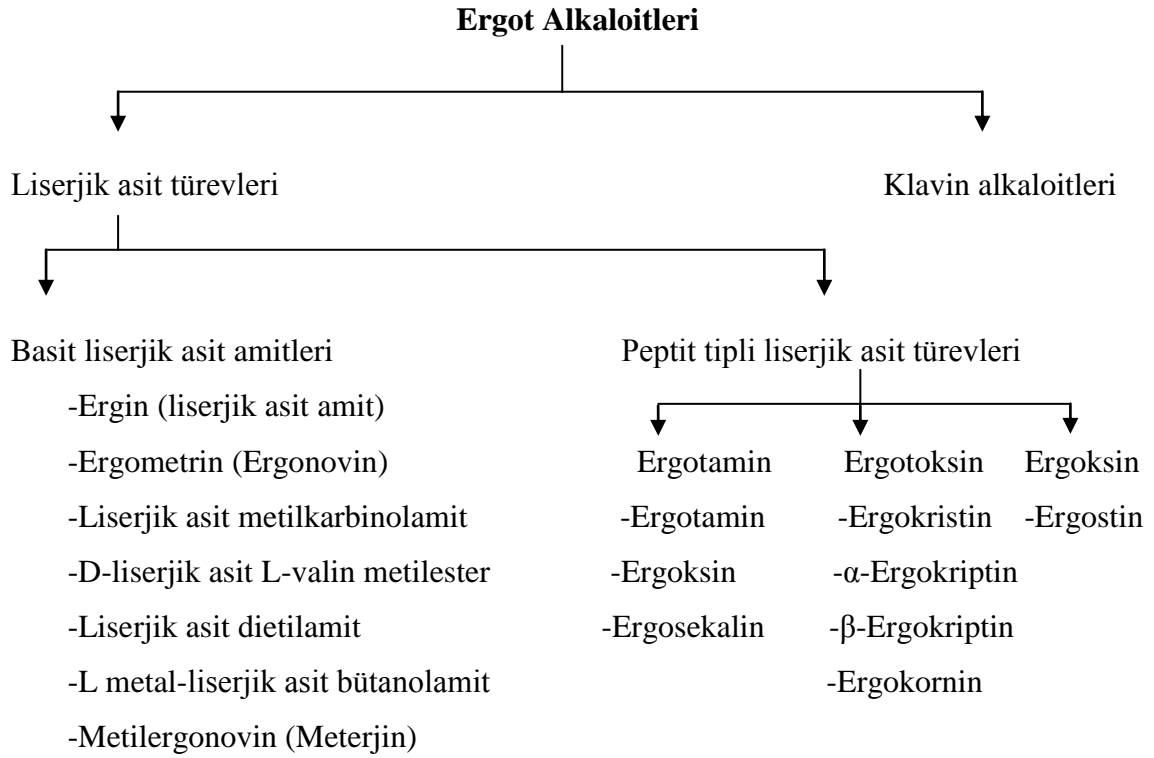
Ergot, *Claviceps purpurea* küfünün ürettiği, özellikle çavdar gibi tahıl ürünlerinde üreyen bir mikotoksindir (Lorenz 1979).

Bazı buğdaygillere asalak olarak yerleşen ve çavdar mahmuzu olarak bilinen küfteki (*C. purpurea*) ergot alkaloidlerinin yol açtığı zehirlenmeye ergotizm denir. Günümüzde ergotizmin biri kangrenli (kronik ergotizm) diğeri konvulsiv (akut ergotizm) olmak üzere iki tipi tarif edilmektedir. Kangrenli ergotizm halsizlik, uzuvlarda soğuma ve karıncalanma hissi ile başlar, sonra özellikle baldırlarda şiddetli sancılar baş gösterir. Bunu yanma ve ardından aşırı soğuma periyotlarının takip ettiği

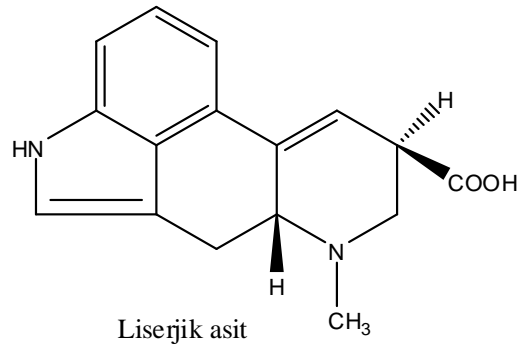
süreç izler. Uzuvarlar hissizleşir, deri soğur, kararır ve mumya gibi bir görüntü oluşur, bazen de sulu kangren görülür. Kangrenin derecesi tırnakların düşmesi, el ve ayak parmaklarının kaybı veya uzuvarların kaybına kadar değişebilir.

Konvulsiv ergotizmde ise daha çok sinirsel semptomlar ön plandadır. Bazı vakalarda hem kangren hem de sinirsel semptomlar karışık halde ortaya çıksa da konvulsiv ergotizmde kangren yoktur. Tipik belirti şiddetli karıncalanma hissidir. Zaman zaman uyuklama, sersemlik baş gösterir. Beyin ve omurilik lezyonlarına, mental bozukluklara ve ölüme yol açabilir (Özkaya 2000). Avrupa'da kangrenli ergotizm ilk kez 857 yılında Almanya'da görülmüştür ve bu bilinen en eski mikotokzikosiz vakasıdır ve binlerce kişinin ölümüne neden olmuştur (Bove 1970).

Günümüzde ergot sklerotiumunun 10 farklı gruptan 100'den fazla madde içerdiği bilinmektedir. Bunlar arasında estolitler, aminoasitler, aminler, pigment maddeleri, 1-3 bağlı β -D glukopiranozil ünitelerinde oluşan glukanlar, enzimler ve yağ asitleri bulunur. Fakat bunlar içinde tıpta ve toksikolojide en önemli olanları alkaloitlerdir. Sayısının 40'tan fazla olduğu belirtilen ergot alkaloitleri iki ana gruba ayrılırlar. Bunlardan birisi liserjik asit türevleri diğeri de liserjik asidin karboksil grubunun hidrosimetil veya metal grubuna indirgendiği klavin alkaloitleridir (Şekil 2-6). Liserjik asit ilk kez 1954 yılında sentezlenmiştir (Şekil 2-7). *C. purpurea* ve *C. paspali* mantarları farmakolojik olarak aktif liserjik asit alkaloitleri içerirler (Özkaya 2000).



Şekil 2-6: Ergot alkaloitleri

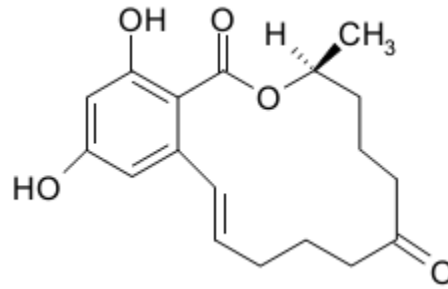


Şekil 2-7: Liserjik asit

2.2.4. Zeralenon

Zeralenon (ZON) *Fusarium* türü mantarlarca üzüm, mısır ve yüksek nem içeriği olan saman yığınlarında sıklıkla üreyen östrojenik yapılı bir mikotoksindir. Çeşitli çalışmalarda, hem insan diyetinde ve hem de hayvan yemlerinde ZON oluşma insidansı yüksek bulunmuştur. Mısır, öğütülmüş arpa ve buğday gibi hububatların *F. gramineorum* ile enfekte edilen ZON içerikli yemin tüketilmesiyle, özellikle domuzda

genital problemlere neden olduğu tespit edilmiştir. Semptomlar, prepubertal dönemdeki dişi domuzda vulvada yumru şeklinde ödem veya vajina ve rektumda sarkma şeklindedir. Üreme ile ilgili düzensizlikler, infertilite veya kuru kangren diye ifade edilen doku ölümü, düşük, gelişim bozukluğu gibi durumlar ile karakterizedir. ZON güçlü östrojenik etkisinin yanında karaciğer lezyonlarına neden olmakta, daha ileride hepatokarsinomayı tetikleyebilmektedir (Massart ve Saggese 2010). ZON, $C_{18}H_{22}O_5$ formülüne sahip, molekül ağırlığı 318,37 olan bir β -rezorsilik asit laktondur (Şekil 2-8). Beyaz, kokusuz, kristal yapılıdır. Erime noktası $161-164^{\circ}C$ arasındadır. Pratikte suda ve tetraklorometanda çözünmeyip, dietileter, kloroform, diklorometan, etil asetat, alkol ve sulu alkali çözücülerde çözünmektedir. ZON standartları genellikle metanoldeki kararsızlık probleminden dolayı asetonitrilde hazırlanmaktadır (Josephs ve ark. 2004).



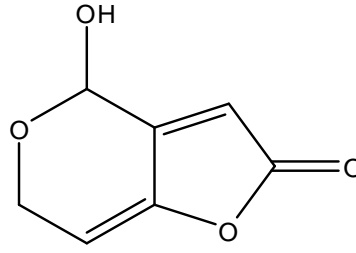
Şekil 2-8: Zeralenon

2.2.5. Patulin

Patulin bazı *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys* türleri tarafından oluşturulan bir metabolittir. 1943 yılında *P. patulum* ve *P. expansum* kültürlerinden izole edilen patulinin antibiyotik özellikte olduğu saptanmıştır.

Patulinin kimyasal yapısı, 1950 yılında Woodward ve Sing tarafından aydınlatılmıştır (Şekil 2-9). Patulin doymamış bir lakton olup kapalı formülü $C_7H_6O_4$ ve molekül ağırlığı 154,12'dir. Laktonlar, hidroksikarbonik asidin esterleridir ve doğada genellikle doymamış halde bulunurlar. Ancak patulin γ -lakton olup kararlı yapıda 5'li halka oluşturmuştur ve bu bakımdan dayanıklı bir yapıya sahiptir.

Patulinin sentezinde, öncelikle küfün suşu, ortamın sıcaklığı, su aktivitesi, pH, süre, ortamdaki besin maddeleri ve osmotik basınç önemli rol oynamaktadır (Acar ve Gökmen 1998).



Şekil 2-9: Patulin

Birçok gıda maddesinde, özellikle meyve ve sebzelerde, patulin oluşmaktadır. Bu konudaki çalışmalara göre elma, armut, şeftali, kayısı, domates gibi ürünlerde sentezlenebildiği, buna karşılık lahana, turp, kereviz, soğan gibi sebzelerde patulin sentelenemediği halde, portakal ve portakal suyunda patulin oluşumu ancak bazı suşlar tarafından gerçekleştirilmektedir (Acar ve Gökmen 1998).

Lakton yapısında olması nedeniyle patulinin kanserojen etkisi de araştırılmıştır. Patulinin etki spektrumunun geniş olduğu ve hayvan denemelerinde kanserojen, mutajen, teratojen etkili bir metabolit olduğu saptanmıştır (Janotová ve ark. 2011).

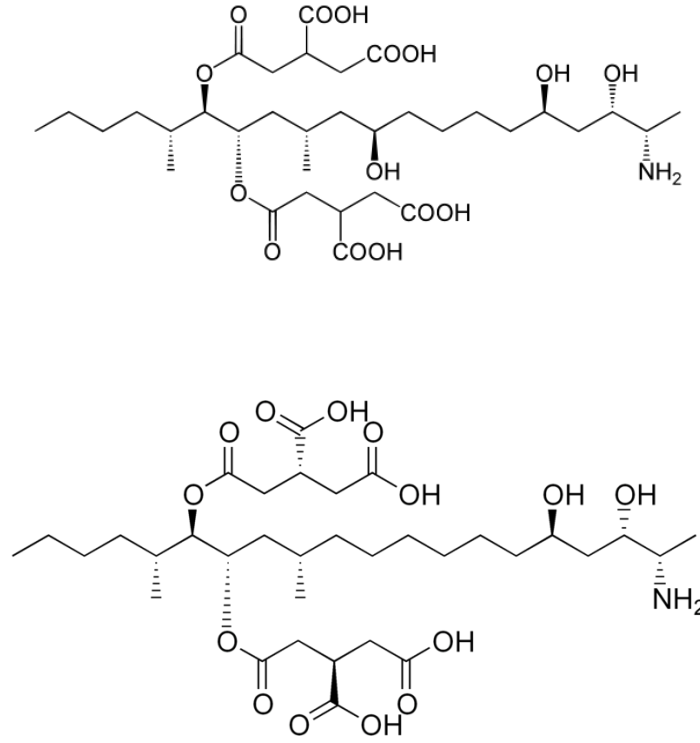
2.2.6. Fumonisin

Fumonisinler önemli toksik küf metabolitleri olup (Weidenbömer 2001) mısırın en yaygın küf kontaminantlarından biri olan *Fusarium moniliforme* tarafından üretilmektedir. *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. napiforme* ve *F. nygamaide*, fumonisin üreten *Fusarium* türleri arasında yer alırlar (Gamanya ve Sibanda, 2001).

Fumonisinlerin kimyasal yapıları incelendiğinde, 20 karbonlu propan-1,2,3-trikarboksilik asit diesteri ve primer amino grubu içeren bir pentahidroksikosan oldukları görülür. Sfingolipidlerin iskeletini oluşturan sfingozine benzer yapıdadırlar (Sweeney ve Dobson 1998). Bugüne kadar fumonisin B1, fumonisin B2, fumonisin B3, fumonisin B4, fumonisin A1 ve fumonisin A2 olmak üzere 6 fumonisin yapısı belirlenmiştir. Bunlar arasında gıdalarda en fazla bulunanlar fumonisin B1 ve fumonisin B2'dir (Şekil 2-10) (Scott 1993; Sweeney ve Dobson 1998).

Fumonisinler polar bileşiklerdir. Suda çözünebilirler, asetonitril:su ve metanolde daha çok çözünebilme özelliğine sahiptirler ancak apolar çözücülerde çözünmezler (Vesander ve ark. 1990). Bir kısmı insan ya da hayvanların dokularına bağlı bulunabilirler ancak çoğu idrar, dışkı ve süt ile dışarı atılırlar. Buna rağmen, fumonisin kalıntıları düşük de olsa domuzların karaciğer ve böbreklerinde, sığırların

karaciğerlerinde bulunur. İnsanlar, kontamine olmuş et, süt, yumurta ve sakatat gibi yenilebilir hayvansal ürünlerin tüketimi yoluyla fumonisinlere maruz kalabilirler. Bu durum ise, insan sağlığı üzerinde oldukça zararlı sonuçlara zemin hazırlayabilir.



Şekil 2-10: Fumonisin B1 ve fumonisin B2

2.2.7. Trikotesenler

Fusarium toksinleri arasında trikotesenler önemli ve büyük bir gruptur. Bilinen 40 türevinin olduğu, ancak 150 civarında farklı bileşiğin bu grupta toplandığı ifade edilmektedir. Hepsinin ortak özelliği tetrasiklik yapı göstermeleridir. Trikotesenler kimyasal yapıları nedeniyle tetrasiklik terpenoitler grubuna girerler. Bu kadar fazla türeğe rağmen tarım ürünlerinde doğal kontaminant olarak saptananlar 4 adedi geçmez. Bunlar; diasetoksisirpenol, T-2 toksin, nivalenol, deoksinivalenol ve T-2 toksinin parçalanma ürünü olan toksik metabolit HT-toksin'dir. 1940 yılında Rusya'nın Orenburg bölgesinde yetişen buğdaylardan yapılan un ve ekmeklerin tüketilmesiyle ortaya çıkan ve çok sayıda insanın ölümüyle sonuçlanan olayın, *Fusarium* toksinlerinden trikotesenlerin neden olduğuna ilişkin iddialar giderek bilimsel destek bulmuştur. Bu

toksik hastalıkta deride nekrozlar, kemik iliğinde hasarlar meydana gelir ve lökosit sayısı düşerek lökopeni oluşur (Bensassi ve ark. 2009).

Trikotesen grubuna ait metabolit ilk kez *Trichothecium roseum*'dan izole edildiği için trikotesen adını almıştır. *F. sporotrichoides*, *F. sambicinum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. nivale*, *F. solani* ve diğer *Fusarium* türleri yanında *Trichoderma viride*, *Myrothecium roridum* ve *Trichothecium roseum* da trikotesen üreticileridir (Freeman ve Marrison 1948).

Toprak veya tarla küfleri olan *Fusarium*'lar düşük sıcaklıklarda gelişirler. Bazıları 0°C nin altında da gelişmelerini sürdürebilir. Gelişimleri için ihtiyaç duydukları minimum sıcaklık istekleri -7°C olan türlere de rastlanır. *F. poae* çok geniş sıcaklık aralığında mikotoksin oluşturmakla beraber optimum mikotoksin üretimi 5-8°C'lerde gerçekleşir. *Fusarium*'larda trikotesenler genellikle 15-20°C arasında yüksek düzeyde sentezlenir. Birçok *Fusarium* türü yüksek sıcaklığa (22°C) oranla düşük sıcaklıkta (8 °C) daha fazla trikotesen oluşturur. Laboratuvar denemeleri 22°C'de 3 hafta süre ile inkübe edilen *Fusarium* kültürüne oranla, 6. gün 8°C'de bir süre tutulup soğutulan kültürde 3 misli fazla mikotoksin oluştuğunu ortaya koymuştur. Bu da tarlada yetiştirilen buğdayların yüksek toksin içeriklerine açıklama getirmektedir.

Trikotesenlerin toksisiteleri yüksektir. Hücre içindeki etkisi protein sentezinin inhibisyonu şeklindedir. Canlıya 30 µgmL⁻¹ düzeyinde verildiğinde protein sentezi durur. Molekül spesifik olarak terminatör bölgeleri yakalar, aynı zamanda ribozomlarda polipeptit-transferaz enzimini bloke eder. Metabolizmada SH-grubu içeren önemli enzim veya koenzimlerle reaksiyona girerek reaksiyonları durdurur. T-2 toksininin sıçanlara oral yolla verilerek belirlenen toksisitesi LD₅₀ = 3,8 mgkg⁻¹ ve diasetoksisirpenolün toksisitesi LD₅₀ = 7,3 mgkg⁻¹ 'dır.

Fusarium türlerinin geliştiği darıları tüketen insanlarda ağız, burun, sindirim sistemi ve böbreklerde kanamalar ve sonuçta ölüm görülmüşse de bu etkilerin sırf trikotesenlerden olduğunu söylemek zordur. İnsan ve hayvanlarda akut dozun altındaki dozlar kusmaya neden olur. Deney hayvanlarında gözlenen en önemli etkileri, deri nekrozları, kusma ve lökopenidir. *Fusarium*' lar tahıllarda (buğday, yulaf, arpa, çavdar, mısır, pirinç), sorgum, fasulye, meyve ve sebzelerde görülür. Avrupa ve Amerika gibi soğuk-serin kuşak iklim bölgelerinde *Fusarium*'lar iyi gelişirler. Özellikle bu klimada trikotesen içerikli yemler hayvan zehirlenmelerine ve ölümlerine neden olur ve yaşanan olaylar çok seyrek değildir. Böyle yemlerde diğer toksinlerin yanı sıra T-2 toksini 2

mgkg⁻¹ düzeyinde bulunmuştur. Yem mısırlarında trikotesenler oldukça fazla görülür. Türkiye tahıl ve yemleri, bulunduğu iklim kuşağı nedeni ile trikotesenler açısından risk altında değildir (Nelson ve ark. 1983 pp. 193).

2.3. Gıdaların Mikotoksinlerle Kontaminasyon Yolları

Gıdalara mikotoksin bulaşması çeşitli yollarla gerçekleşir. Gıdanın gözle fark edilir şekilde küflenmesi mikotoksinin direkt kontaminasyonundan kaynaklanır. Bitkisel ürünlerden; tahıllarda, baklagil danelerinde (soya fasulyesi, fasulye vb), fındık, yer fıstığı, ceviz, Antep fıstığı, badem, ayçiçeği tohumu, pamuk tohumu gibi yağlı tohumlarda, meyvelerde ve baharatta mikotoksin kontaminasyonu direkt yolla ve önemli düzeyde meydana gelir. Gözle görülür şekilde tüm ürünün küflenmesi ürünün işlenmesini ve tüketimini olanaksız hale getireceğinden herhangi bir risk taşımaz. Ancak ürün partilerinin çok az bir kısmında başlayan küflenme özellikle depolama süresince mikotoksin kontaminasyon riskini artırır. Bitkisel ürünlerde mikotoksin kontaminasyonu tarlada olgunlaşma evresinden başlayarak, hasatta, kurutma aşamasında ve ağırlıklı olarak da depolanma evresinde meydana gelir. Yer fıstığı, fındık vb ürünlerde toksin kontaminasyonu hasat edilen ürünlerin kurutulma aşamalarında başlar. Kırılan, hasar gören fındık, fıstık kabukları küf misellerinin iç daneye geçişine ve mikotoksin oluşturmaya olanak sağlar. Ayrıca nem oranında dalgalanmalara neden olur. İstatistiksel bilgilerden parti içindeki yer fıstıklarında 1:700 ve Antep fıstıklarında 1:4500 oranı ile aflatoksinle kontamine dane bulunduğu hesaplanmaktadır.

Direkt kontaminasyon ekmekte, meyvelerde, doğal küflerle olgunlaştırılan et ürünlerinde, süt mamullerinden özellikle peynirlerde görülür. Dış ülkelerde geleneksel olarak üretilen çiğ sucuk benzeri ancak küfle olgunlaştırılan mamuller büyük risk taşırlar. Bunların üretiminde belli bir *Penicillium* türü starter olarak kullanılmakla beraber, startersiz olarak doğal küf popülasyonundan yararlanılarak üretilen fermente et ürünleri de bulunur. Bunların yapımında mutlaka *Penicillium nalgiovense* biyotip 2' nin kullanılması önerilmektedir. Genel olarak etlerde fazla görülmeyen mikotoksinler, mantarlar ile olgunlaştırılan Macar ve İtalyan tipi çiğ fermente sucuklarda, tuzlanarak kurutulmuş çiğ et jambonlarında, çiftlik usulü hazırlanan yağlı jambonlarda tehlike yaratırlar. Bu ürünlerde yaklaşık 10-11 mikotoksinin bulunabileceği hesaplanmalıdır. Spontan olarak olgunlaşan bu ürünlerden izole edilen *Penicillium'* ların % 80' inin

potansiyel mikotoksin üreticisi olduğu ve sıklıkla görülen *Aspergillus versicolor'* un da sterigmatosistin oluşturduğu unutulmamalıdır.

Küflü peynirlerde çok sayıda mikotoksin olduğu görülmüştür. Ayrıca sert peynirlerin kabuklarında ve dış tabakalarında, yumuşak ve yarı sert peynirlerin, eritme peynirlerinin yüzeylerinde, bugüne kadar aflatoksin, sitrinin, siklopiazonik asit, mikofenolik asit, OTA, patulin, penisilik asit, penitrem A, sterigmatosistine rastlanmıştır. Toksinlerin peynir kitlesine kabuktan veya yüzeyden itibaren birkaç cm derinliğe kadar difüze olabildikleri, sitrinin ve OTA'nın ise 8 cm derinliğe kadar inebildiği gösterilmiştir. Türkiye'de kaşar peyniri depolama örneklerinden izole edilen dominant floranın ağırlıklı olarak toksik küflerden oluştuğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Gıdaların mikotoksinlerle indirekt kontaminasyonu, mikotoksinle kontamine olmuş hammaddelerin veya katkı maddelerinin gıda üretiminde kullanılmasıyla meydana gelir. Patulinle kontamine olmuş meyvelerin, meyve suyu ve konsantrelerine işlenmesi, aflatoksin içeren incirlerden kuru incir ve incir ezmelerinin üretilmesi, yine kontamine yer fıstıklarının, fıstık ezmesi vb ürünlerde kullanılması indirekt yolla kontaminasyonlara örnek oluşturur. *Penicillium expansum*, *Byssosclamyces* spp. ve *Aspergillus clavatus'* un oluşturduğu patulin, elma sularında ve konsantrelerinde sıklıkla bulunur. Armut ve karışık meyve sularında da rastlanır. *Trichothecium roseum* tarafından oluşturulan trikotesenler bu küfle kontamine olmuş üzümün sularında görülür. Çeşitli gıdalarda tat ve aroma kazandırmak amacıyla kullanılan baharatlar (kırmızı toz biber, kırmızı pul biber, karabiber, zencefil, safran, kişniş) çoğunlukla mikotoksinlerle kontamine edilirler. Baharat özellikle et ürünlerinde indirekt kontaminasyona neden olur. Tahıllarda ve baklagil danelerinde oluşan çeşitli mikotoksinler (OTA, aflatoksin B1, B2, G1, G2, penisilik asit, siklopiazonik asit, sterigmatosistin, ksantomegnin) değirmen ürünlerine, fraksiyonlara göre artan veya azalan oranlarda geçerler. Soğuk-serin iklim bölgelerinde bazı yıllarda iklime bağlı olarak buğdayda *Fusarium* küfleri daha fazla görülür ve normal yıllarda buğdayda görülen 0,15 mgkg⁻¹ olan deoksinivolenol (DON) miktarı böyle yıllarda 0,30 mgkg⁻¹ düzeyinin üzerine çıkar. DON ile kontamine buğdayların öğütülmesinden sonra yine fraksiyonlara bağlı olarak unlara % 55, % 47 ve % 34 oranında DON geçer. Aflatoksin ile bulaşık pirinçlerin pirinç unlarında toksin konsantrasyonu azalır, pirinç ve kepek unlarında ise 10 kat artar. Küflerin metabolitlerinin daha fazla danelerin dış tabakasında

kalması, endosperme penetre olmaması buna neden olmaktadır. Tahıl unlarında en sıklıkla görülen OTA kontaminasyonuna özellikle soğuk-serin iklimlerde yetiştirilen tahıllar üzerinde gelişen *Penicillium verrucosum* neden olur. Tahıllarda bulunan OTA miktarının yaklaşık % 50 oranıyla unlara geçtiği saptanmıştır.

Aflatoksin ile kontamine mısırların unlarında ise; aflatoksinin danedeki miktarına oranla fraksiyonlarda arttığı, embriyo fraksiyonunda da 2-3 katına ulaştığı görülür. Un, kepek, irmik gibi değirmencilik ürünlerinde veya fırıncılık ürünlerinde görülen aflatoksin, OTA, zearalenon vb mikotoksinler indirekt kontaminasyonlardır.

Gıdaların mikotoksinlerle kontaminasyonlarında "carry over" olarak adlandırılan üçüncü bir yol daha vardır. Çiftlik hayvanları mikotoksinlerle kontamine yemlerle beslendiklerinde toksinleri metabolize ederek, büyük kısmını idrar ve dışkı ile atarlar. Ancak metabolize formlara kanda, sütte, bazı organlarda hatta ender olarak yağlı kas dokularında rastlanır. Aflatoksin içeren yemlerin süt ineklerine yedirilmesi sonucu aflatoksin B1 (AFB1) ve aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin M1 (AFM1) ve aflatoksin M2 (AFM2)' ye dönüşerek kalıntı halinde sütte ortaya çıkar. Besi sığırlarında AFB1 ve AFB2 kalıntıları en fazla karaciğer ve böbreklerde bulunmuştur. Kaslarda aflatoksin türevlerine hem daha ender hem de çok daha düşük miktarlarda rastlanır. Domuzlarda yemlerle alınan AFB1'in % 71' inin 9 günde metabolize olarak dışkı ile atıldığı, kalıntının ise ağırlıklı olarak karaciğerde çok daha azının ise böbrek ve akciğerlerde biriktiği görülmüştür. Aflatoksin biriken karaciğer, patolojik ve anatomik değişiklikler göstermeyebilir ve tüketilme olasılığı yüksektir. Kanatlılarda da AFB1, AFM1 ve AFB1'in parçalanma ürünü olan aflatoksikol karaciğer ve böbreklerde düşük düzeyde birikebilir. Okratoksin A içeren yemlerle beslenen hayvanlardan sığırların sütlerinde ve organlarında kalıntı OTA'ya rastlanmazken, domuzların ve kanatlıların organlarında değişik düzeylerde görülmektedir. Bu durum geviş getiren hayvanların içkembelerinde bulunan mikroorganizmaların OTA'yı metabolize edebilmeleriyle açıklanmaktadır. Tek mideli olan domuzların, en çok kanlarında olmakla beraber böbrek ve karaciğerlerinde de önemli düzeyde kalıntı OTA saptanmıştır. OTA domuzlarda nefropati ajanı olduğu gibi, insanlarda da endemik ve endemik olmayan nefropatilerin kaynağıdır. Bugüne kadar piyasadaki tavuk etlerinde ve yumurtalarında OTA belirlenememiş olmasına karşın OTA ile kontamine yemlerle beslenme denemelerinde kanatlılarda OTA' nın değişik düzeylerde kanda, ette, böbrek ve karaciğerde hatta yumurtada bulunabileceği gösterilmiştir. Yemlerde bulunan *Fusarium* toksinlerinden zearalenon ve trikotesenler

hayvanlarda çok hızlı metabolize olurlar. Hayvanların etlerinde ve sütlerinde zearalenon saptanmazken trikotesenlerden T-2 toksinine inek ve domuzların kaslarında ve sütlerinde rastlanmıştır. Kanatlıların da etlerine ve karaciğerlerine geçebilmekte, hatta yumurtalarında da görülebilmektedir.

2.4. Mikotoksinlerin İnsan ve Hayvan Sağlığına Etkileri

Mikotoksinler gıda ve yemlerle belli bir düzeyin üzerinde vücuda alındıklarında insan ve hayvan sağlığına olumsuz etki ederler. Ancak bu etki, mikotoksin türüne, alındığı miktara, metabolizmaya, savunma mekanizmasına ve maruz kalma süresine bağlıdır (Hussein ve Brasel 2001). Çeşitli şekillerde insan ve hayvanlar tarafından mikotoksinlerin vücuda alınmasıyla bazı toksik belirtilerin ortaya çıkmasına mikotoksikozis denir. İnsanlar ve hayvanlar ya doğrudan, kontamine olmuş gıda ve yemleri tüketerek ya da kontamine yemle beslenen hayvanların yumurta ve süt gibi ürünlerine toksinlerin geçmesi sonucu dolaylı olarak mikotoksinlere maruz kalırlar. En önemli mikotoksikozis St. Anthony's Fire olarak bilinen ergotizm hastalığıdır. Bu hastalık 1750 yılında *Claviceps purpurea* adlı bir çeşit mantarın tahıl ürünlerine bulaşmasıyla ortaya çıkmıştır. Hastalık ortaçağ döneminde orta Avrupa'da salgın haline geldi. Mikotoksinlerin bulaşma potansiyeli yüksek olan ürünler ve sebep oldukları hastalıklar Tablo 2-3'te verilmektedir.

Mikotoksikozis olayına diğer bir örnek toksik lökopenidir. Burun, boğaz ve dış eti kanaması, nekroz, immün sistemin baskılanması gibi belirtilerle 1940 yılında Rusya'da binlerce insanın ölümüne sebep olmuştur (Nelson ve ark. 1994). Aflatoksin ise ilk kez 1960 yılında İngiltere'de 100,000 hindinin ölümüyle keşfedilmiştir.

Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığına olumsuz etkileri şunlardır:

-Akut toksisite: Toksinin bir kez veya kısa zaman diliminde (24 saat gibi) genellikle birkaç kez alınmasından sonra zehirlenmeye neden olmasıdır.

-Kronik toksisite: Akut toksisiteye yol açmayacak düşük dozların uzun süre vücuda alınmasıyla ile oluşan toksisitedir.

Tablo 2-3: Mikotoksinlerin sağlık üzerindeki etkileri

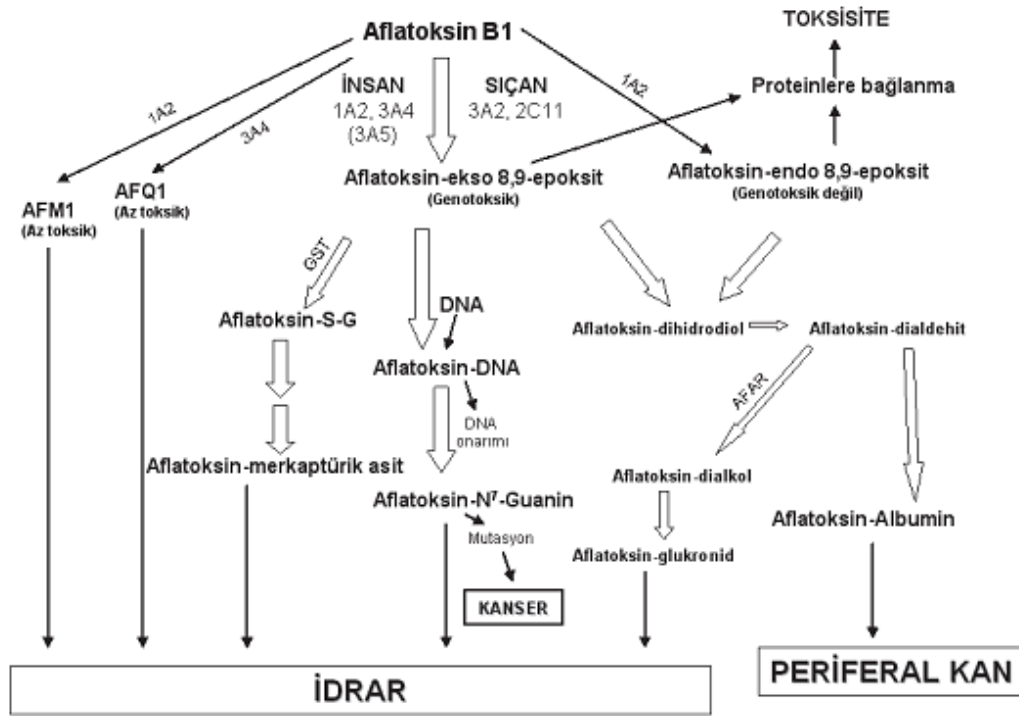
Mikotoksin	Sağlığa zararlı olası etkileri	Ürün
Aflatoksin	Karaciğer hastalıkları (hepatatoksik, hepatokarsinojenik), kanserojen ve teratojenik etkiler, kanamalar (bağırsaklar, böbrekler), bağışıklık sistemine baskı	Yer fıstığı ve fıstıklar, tahıllar (mısır), süt, baharatlar
Okratoksin	Nefrotoksik etki, kanserojen etki, bağışıklık sistemine baskı	Tahıllar (buğday, mısır), şarap, üzüm suyu
Fumonisin	Akciğerde ödem, equine leukoencephalomalacia, nefrotoksik ve hepatotoksik etki, bağışıklık sistemine baskı	Mısır
Trikotesen	Sindirim sisteminde düzensizlik (kusma, ishal), kilo kaybında artış, kanamalar (mide, kalp, ince bağırsak, akciğer, mesane), ağızda yara, iltihap, kısırlık, kemik iliğinde bozulmalar, yavaş büyüme, bağışıklık sistemine baskı	Tahıllar (buğday, arpa)
Zeralenon	Östrojenik etkiler (kusma, ishal), genital bölgede ödem, vajinada sarkma, rahimde genişleme, testislerde atrofi, yumurtalıklarda atrofi, kısırlık, düşük	Mısır, buğday
Ergot alkaloidleri	Kangren, havale, halüsinasyonlar	Çavdar
Patulin	Genetik mutasyon, genotoksik, kanserojen	Meyve suları (elma, armut)

Mikotoksikozler toksinin dozuna ya da türüne bağlı olarak akut toksik, kronik toksik ya da her iki şekilde de meydana gelebilir. Hayvanlarda akut hastalıklar, karaciğer, böbrek, merkezi sinir sistemi üzerinde hasarlar, deri hastalıkları ve hormonal etkiler gibi rahatsızlıkları içerir. Bazı mikotoksinlerin günlük öğünlerde az miktarda da olsa mideye alınmaları, uzun vadeli dönemde insan sağlığı açısından büyük riskler taşıdığı gibi, birçok hayvan türünde de karsinojenik etkiler yaratmasının yanı sıra bağışıklık sistemini etkilemesi mümkündür (Boermans ve Leung 2007). IARC (International Agency for Research on Cancer) mikotoksinleri karsinojenitelerine göre sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırmaya göre patulin (PAT) ve zeralenon (ZON) Grup 3 karsinojenleridir (insanlar için karsinojen değiller). AFB1 ise Grup 1 karsinojenleri (insanlar için karsinojen) içerisinde yer almaktadır (IARC 1993).

Bu kontaminantların yarattığı toksik etkiler, Gıda Tarım Komitesi ve Dünya Sağlık Örgütü Uzman Komitesi'nin oluşturduğu toksikolojik verilerle ortaya konulmuştur. Bu dataaların temeli hiçbir yan etki düzeyinin rastlanmadığı (no adverse effect levels = NOAEL) seviyelere dayanmaktadır (NOAEL μgkg^{-1} vücut ağırlığı/gün). NOAEL, hayvanlar üzerinde yapılan toksikolojik çalışmalarda, tespit edilebilir herhangi bir yan etkinin bulunmadığı en düşük mikotoksin konsantrasyonu olarak tarif edilebilir (WHO Technical Report Series 2002).

Başka bir değerlendirmeye göre, kontaminantın toksisitesi, günlük alınan maksimum tolere edilebilen seviyeyle hesaplanabilir (PMTDI = provisional maximum tolerable daily intake). PMTDI kullanıldığında yapılan bu hesaplamaya, farklı türlerin farklı koşullarda farklı savunma mekanizmalarına sahip oldukları düşünülerek bir belirsizlik faktörü eklenmelidir. Hayvanlarda bu değer, en düşük NOAEL değerinin 100'e bölünmesiyle, insanlarda ise 10'a bölünmesiyle hesaplanır. Patulin ile ilgili olarak PMTDI $0,4 \mu\text{gkg}^{-1}$ vücut ağırlığı, zeralenon için $0,2 \mu\text{gkg}^{-1}$ vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (WHO Technical Report Series 2002).

Mikotoksin zehirlenmelerinde etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Kontamine olan besinlerin mikotoksinlerden arındırılması da olası görünmemektedir. Bu nedenle, insan sağlığı bakımından kontamine gıdaların tüketiminden kaçınılması ve gıdaların kontaminasyonuna karşı etkin önlemlerin alınması önemlidir (Şekil 2-11) (Yentür ve Er 2012).



Şekil 2-11: Reaktif metabolitlerin ve biyogöstergelerin oluşumuna aracılık eden AFB1 metabolizması

2.5. Mikotoksinlerin Kontrolü ve Önlenmesi

Mikotoksinlerin gelişmesinde nisbi nem ve sıcaklık önemli parametrelerdir. Aflatoksinjenik küflerin gelişmesi için optimum şartlar 24 – 35°C ve % 70'in üzerindeki nisbi nemdir (Arrus ve ark. 2005). Ayrıca gıdalarda aflatoksin üretimi ve misel gelişimi sıcaklık ve su aktivitesi ile kontrol edilmektedir. Diğer faktörler ise sıcaklık uygulaması, paketlenme ve koruyucu madde kullanımındır (Molina ve ark. 2002). Bu nedenle mikotoksinler, hava veya güneşte kuruyan tahıl, pamuk, yer fıstığı ve fındık gibi tohumlarda yaygın kontaminantlardır. Mısır da yetiştirme, hasat, depolama, taşıma ve işlem basamaklarında genellikle mikotoksinlere maruz kalan gıdalardandır. Hasat öncesi ve sonrasında *A. flavus* ile enfekte olan mısırlarda kurutma ve depolama koşullarının iyi olmaması halinde aflatoksin kontaminasyonunda artış görülmektedir (Bonjar 2004). Küf gelişimi için gerekli olan sıcaklık ve su aktivitesi (aw) değerleri toksin oluşumu için gereksinim duyulan değerler ile aynı olmamakta ve türe göre de değişiklik göstermektedir. Örneğin *A. flavus*'un gelişmesi ve mikotoksin üretiminde aw sırasıyla 0,73 ve 0,85'dir. Bu durumda nem içeriği de % 8–12 ve % 17–19'dur. Küf ve toksin oluşumu için gerekli minimum sıcaklık değerleri de farklılık göstermektedir. *A.*

parasiticus'un gelişmesi için en düşük sıcaklık aralığı 6–8°C iken 25–35°C'de optimum gelişme sağlanmaktadır. *A. flavus* için ise en iyi gelişme aralığı 19–35°C iken 12–42°C arasında toksin üretmektedir (Giorni ve ark. 2008; Bhat ve ark. 2010).

Mikotoksinlerin yapısal degradasyonu veya inaktivasyonu kimyasallarla mümkündür. Özellikle de sodyum hipoklorit, klor dioksit, klor gazı, hidrolitik ajanlardan organik ve inorganik asitler ve sodyum hidroksit, amonyum hidroksit ve potasyum hidroksit gibi alkaliler ile degradasyon sağlanabilmektedir. Bu kimyasalların bir kısmı gıda endüstrisinde kullanılmasına rağmen çoğu toksik kalıntı bıraktığından, besin içeriğine zarar verdiği için, tat, koku, renk, tekstür ve ürünün fonksiyonel özelliklerini etkilediğinden kullanılmaları uygun değildir (Banu ve Muthumary 2010). Gıdaların ve hayvan yemlerinin kontaminasyonunun fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlarla önlenmesi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bunlar toksini daha az mutajenik etkili ve daha az zararlı hale dönüştürmek içindir. Bu kimyasallar asitler, oksitleyici ajanlar, bisüfitler ve gazlardır (Safara ve ark. 2010). Mikrodalga ile ısıtma, ozon ile muamele (ozonlama) veya amonyak gibi birçok fiziksel ve kimyasal yöntemler aflatoksin ile kontamine olmuş gıdaların detoksifikasyonu için tavsiye edilmektedir. Son zamanlarda gıdalarda aflatoksin detoksifikasyonu için bir oksidasyon yöntemi olan ozonlama geliştirilmiştir. Ozon (O₃), güçlü bir dezenfektan ve oksitleyici ajandır (İnan ve ark. 2007).

Mikotoksinler, radyasyon dozuna bağlı olarak gıda ve mikotoksinin tipine göre gama (γ) ışınları radyasyonu ile inaktive olabilmektedirler. Bununla birlikte γ-radyasyon ile aflatoksinlerin bozunmasında su aktivitesi kritik rol oynamaktadır (Rustom 1997). Rustom, 1 ve 10 kGy dozunda γ-ışını uygulanan yer fıstığı örneklerinde sırasıyla % 75 ve % 100 azalma görüldüğünü belirtmiştir. Aflatoksinler 222, 265 ve 362 nm'de UV radyasyonuna duyarlıdır. En büyük absorpsiyonu ise 362 nm'de göstermektedir. 1 ppb AFM1 ile kontamine süt örneklerine 20 dakika 365 nm radyasyon uygulandığında % 56,2'sinin yıkımlandığı bildirilmiştir (Rustom 1997; Kabak ve Dobson 2006). Mikroorganizmalarla aflatoksin detoksifikasyonuna ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır. Thanaboripat ve ark., yaptıkları çalışmada, ticari olarak üretilen yoğurtlarda laktik asit bakterilerinin ve *Streptococcus lactisile*'in aflatoksinin detoksifikasyonunu araştırmışlardır (Thanaboripat ve ark. 1997). Sonuç olarak *S. lactisile* varlığında AFB1 düzeyinin 50'den 33,70 µgml⁻¹'ye düştüğünü ve laktik asit bakterilerine göre detoksifikasyon için daha güçlü olduklarını belirtmişlerdir.

Dekontaminasyon veya detoksifikasyon işlemi mikotoksin ile kontamine olan besin maddeleri açısından yararlıdır. İdeal dekontaminasyon işlemi ucuz ve uygulaması kolay olmalı, toksik metabolit oluşumuna yol açmamalıdır. Yem ve gıda maddelerinde besinsel ve tat özelliklerini değiştirebilecek ve yeni mikotoksin oluşumuna yol açabilecek özellikte olmamalıdır. Bu nedenle mikotoksin kontaminasyonunun önlenmesi daha önemlidir (Leibetseder 2006 pp. 439-465).

2.6. Yasal Mikotoksin Limitleri

Aflatoksin içerikli gıdaların detoksifikasyonunda çok başarılı yöntemlerin bulunamaması, birçok tarımsal ürün ihraç eden ülke ürünlerinin mikotoksinlerle bulaşık olması, gıdaların ve en az onlar kadar da yemlerin kontrol edilmesini gerekli kılmıştır. İlk olarak WHO (World Health Organization), FAO (Food and Agriculture Organization) gibi organizasyonlar, gıdalarda tolere edilebilecek aflatoksin miktarını $30 \mu\text{gkg}^{-1}$ olarak belirlemişler ve bu miktardan fazla aflatoksin içeren gıdaların ithal edilmemesi kararını almışlardır. Bu sınır değerler zaman içerisinde düşürülmüştür. Aynı tarihlerde bazı Avrupa ülkeleri WHO ve FAO normlarından daha düşük miktarları benimsemiş, UNICEF gibi kuruluşların da çocuklar tarafından tüketilecek gıda maddelerinde daha düşük sınır değerlerin saptanmasında katkısı olmuştur. Günümüzde altmış kadar ülke aflatoksin, okratoksin A, sitrinin, patulin, zearalenon, deoksinivalenol, T-2 toksin, fumonisin gibi mikotoksinlerin gıda ve yemlerde bulunabilecek en yüksek düzeylerini yasal olarak belirlemiştir. Avrupa Birliği'ne üye ülkelerin saptadıkları aflatoksin sınır değerleri bile büyük farklılıklar göstermektedir. Sınır değerler tartışılabilir, eleştirilebilir gerektiğinde de değiştirilebilir değerlerdir. Önemli olan uluslararası tarımsal ürün, gıda ve yem ticaretinde ortak normlara yaklaşılması, dolayısıyla ticarete rekabet koşullarının bozulmasının önlenmesi ve tüketicilerin özellikle de çocukların çok iyi korunmasıdır. Her ülke, kendi koyduğu limit değerlerini zaman içinde Avrupa Birliği ülkelerinin belirlediği değerlere yaklaştırma çabası içinde olmuştur. Türkiye'de de 2011 yılında gıda ve yem maddelerinde bulunabilecek mikotoksin miktarlarıyla ilgili sınır değerler Avrupa Birliği uyum yasaları çerçevesinde tekrar belirlenmiştir (Tablo 2-4) (Türk Gıda Kodeksi 2008).

Tablo 2-4: AB kriterlerine göre düzenlenmiş Türk Gıda Kodeksindeki mikotoksin limitleri (2011, Sayı: 28157, Ek:1)

	Maksimum Limit (µg/kg)		
	B1	B1+B2+G1+G2	M1
AFLATOKSİN			
Yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar hariç	8,0	15,0	—
Badem, Antep fıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	12,0	15,0	—
Fındık ve Brezilya fıstığı (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	8,0	15,0	—
Sert kabuklu meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0	15,0	—
Yer fıstığı, diğer yağlı tohumlar ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine edilecek bitkisel ham yağ ve rafine bitkisel yağ hariç	5,0	10,0	—
Badem, Antep fıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—
Fındık ve Brezilya fıstığı (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	5,0	10,0	—
Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	5,0	10,0	—
Kurutulmuş meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—

Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri	2,0	4,0	—
Mısır ve pirinç (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	—
Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	—	—	0,050
Baharatın aşağıdaki türleri için; — Kırmızı biber (<i>Capsicum spp.</i>) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) — Karabiber (<i>Piper spp.</i>) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) — Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) — Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) — Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>) — Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	5,0	10,0	—
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	—	—
Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	—	—	0,025
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	—	0,025
OKRATOKSİN A			
İşlenmemiş tahıllar		5,0	
İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)		3,0	
Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm)		10,0	
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve		5,0	
Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve		10,0	
Şarap ve meyve şarapları (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az % 15 olan şaraplar hariç)		2,0	
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli		2,0	

Üzüm suyu, konsantreden üretilen üzüm suyu, üzüm nektarı, üzüm şırası ve konsantreden üretilen üzüm şırası (doğrudan insan tüketimine sunulan)	2,0
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,5
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,5
Baharatın aşağıdaki türleri için; — Kırmızı biber (<i>Capsicum spp.</i>) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) — Karabiber (<i>Piper spp.</i>) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) — Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) — Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) — Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>) — Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	30,0 (30.6.2012 tarihine kadar) 15,0 (1.7.2012 tarihinden sonra)
Meyan kökü (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>G. inflata</i> ve diğer türler)	20,0
Meyan kökü (bitkisel infüzyon bileşeni olarak kullanılanlar)	80,0
Meyan kökü ekstraktı (özellikle alkolsüz içecek ve şekerleme üretiminde kullanılan)	
PATULİN	
Meyve suları, konsantreden üretilen meyve suyu ve meyve nektarları	50,0
Distile alkollü içkiler, elma şarabı ve elmadan üretilen veya elma suyu içeren diğer fermente içkiler	50,0
Katı haldeki elma ürünleri (elma kompostosu ve doğrudan tüketime sunulan elma püresi dahil)	25,0
Bebek ve küçük çocuklar için üretilen ve bu amaçla piyasaya arz edilen/etiketlenen elma suyu ve katı haldeki elma ürünleri (elma kompostosu ve elma püresi dahil)	10,0
Tahıl bazlı olmayan ek gıdalar	10,0
DEOKSİNİVALENOL	
İşlenmemiş tahıllar (durum buğdayı, yulaf ve mısır hariç)	1250
İşlenmemiş durum buğdayı ve yulaf	1750
İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	1750

Tahıllar, tahıl unları, kepek ve rüşeym (doğrudan insan tüketimine sunulan)	750
Makarna	750
Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar	500
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	200
500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği veya mısırdan elde edilen pelletler ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri	750
500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri	1250
ZERALENON	
İşlenmemiş tahıllar (mısır hariç)	100
İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	350
Tahıllar, tahıl unları, kepek ve rüşeym (doğrudan insan tüketimine sunulan)	75
Rafine mısır yağı	400
Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar (mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar hariç)	50
Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar	100
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	20
İşlenmiş mısır bazlı bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	20

500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği veya mısırdan elde edilen pelletler ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri	200
500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri	300
FUMONİSİN	FB1 + FB2
İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	4000
Mısır ve mısır bazlı ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan)	1000
Mısır bazlı kahvaltılık tahıllar ve mısır bazlı çerezler	800
İşlenmiş mısır bazlı bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	200
500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği veya mısırdan elde edilen pelletler ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri	1400
500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri	2000

2.7. Mikotoksinlerin Analizi

Mikotoksinler keşfedildiklerinden beri tayinleri için birçok metodoloji geliştirilmiştir. Rutin olarak kullanılan metotlar ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisidir. Son yıllarda, sıvı kromatografisi kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş ve farklı sınıftaki mikotoksinlerin

yanyana analizlerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hızlı tarama metotları olarak immunokimyasal yöntemler, herhangi bir temizleme basamağı gerektirmemeleri ve ticari olarak önemli mikotoksin çeşitleri için kullanılabilirliği yönünden avantajlıdır. Yeni gelişen yöntemlerden olan immunosensörler, uygun maliyetli olmaları yönünden immunokimyasal yöntemlerin kullanımına alternatif sunmaktadırlar.

Böylesine eser miktarda olan kontaminasyon seviyelerinin tespiti, çok duyarlı ve kesin sonuçlar veren metotların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla gıda maddelerinden mikotoksinlerin ayırımı ve teşhisi için birçok farklı metot geliştirilmiştir (Erkahveci ve Karaali 1997).

Aflatoksinlerin keşfedilmesiyle birlikte araştırmacılar çalışmalarını mikotoksin analiz yöntemleri üzerinde yoğunlaştırmışlardır. Mikotoksinlerin gıda veya tohumlarda tespit edilmesinde başlıca 3 sorundan söz edilmektedir. Bunlar;

1. Mikotoksinler kimyasal yapılarının birbirinden farklı olması nedeniyle farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduklarından her bir mikotoksin grubuna özgü metodun geliştirilmesi gerekmektedir.

2. Gıdada veya tohumda eser miktarda bulunabilecek mikotoksinin gıdadan izole edilebilmesi için çok etkili ekstrakt temizleme işlemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca her bir mikotoksin grubu için ayrı ekstrakt temizleme işlemi gerekmektedir.

3. Mikotoksinler ürünlere düzensiz bir şekilde dağılmış durumdadır. Bu nedenle analizin hassasiyetini ve kesinliğini arttırmak için çok sayıda test uygulamak gerekmektedir (Chu 1984).

2.7.1. Mikotoksin Analizlerinde Kullanılan Metotlar

2.7.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi ile yapılan mikotoksin analizlerinde analitik işlem basamakları; örnekleme, ekstraksiyon ve ekstrakt temizleme, yoğunlaştırma, kromatografik ayırım, kalitatif ve kantitatif tayin, doğrulama testleri şeklindedir.

Örnekleme: Alınacak örneklerin alındığı kitleyi temsil edebilecek durumda olması gerekmektedir (Çoksöyler 1997).

Ekstraksiyon ve Ekstrakt Temizleme İşlemi: Örneklerden aflatoksin ayırıştırılması amacıyla başlıca 3 farklı ekstraksiyon ve ekstrakt temizleme yöntemi

uygulanmaktadır. Bunlardan BF ve CB yöntemleri, AOAC (American Official Analytical Chemistry) resmi yöntemidir. BF yöntemi ayırma hunisinde, CB yöntemi ise kromatografi kolonunda temizleme işlemlerini içermektedir. Üçüncü metot ise zencefil için Stoloff ve Trucksess adlı araştırmacılar tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir ve hem ayırma hunisinde hem de kromatografi kolonunda çok aşamalı temizleme işlemlerini içermektedir (Erkahveci ve Karaali 1997).

Son yıllarda özellikle HPLC kullanımında ekstraksiyon, immunoaffinite kolonlarda yapılmaya başlanmıştır. Bu ekstraksiyon yöntemi ince tabaka kromatografisi için de önerilmiştir. Ekstraksiyondaki amaç mikotoksinin kullanılan çözücüyle karşı karşıya gelmesi ve bu maddelerin moleküler düzeyde çarpışmasının sağlanmasıdır. Kullanılan çözücü seçiminde analizi yapılacak mikotoksinin polarlık derecesi göz önünde tutulmaktadır. Ekstraksiyon işleminde dikkat edilecek diğer bir konu da, ekstraksiyonda kullanılan çözücü ile birlikte su ilave edilmesidir. Bunun nedeni, suyun gıda maddesinin içine penetre olma özelliğinden kaynaklanmaktadır. Böylece su ile birlikte çözücünün ürün içine girmesi sağlanmaktadır (Özkaya ve ark. 1999).

Aflatoksin analizlerinde kullanılan başlıca çözücü karışımları:

1. Kloroform-su
2. Metanol-su
3. Asetonitril-su

Ekstrakte üründe aflatoksinin yanı sıra protein, lipit, renk maddeleri gibi analiz sonucunu etkileyebilecek safsızlıklar da bulunmaktadır. Amaç bu kirlilik maddelerini ortamdan uzaklaştırmak, toksinin ise fazda kalmasını sağlamaktır. Son olarak da uygun polaritede bir çözücü kullanarak toksini fazdan almaktır (Özkaya ve ark. 1999).

Yoğunlaştırma: Yoğunlaştırma işlemi, rotary evaporatörde yapılmaktadır. Yoğunlaştırma işlemi sonunda aflatoksine ait olan kalıntı, aflatoksini çok iyi çözen bir çözücüyle (genellikle kloroformla) yıkanarak vialde alınır (Çoksöyler 1997).

Aflatoksini vialde almak için kullanılan çözücü azot gazı altında buharlaştırılır. Buharlaştırma sonucu vialde kalan kalıntı 200 µL benzen-asetonitril (98:2) kullanılarak çözündürülür ve kromatografi işlemine tabi tutuluncaya kadar buzdolabında bekletilir.

Ancak bu yöntemde uygulanan buharlaştırma işlemi aflatoksin kayıplarına yol açabilmektedir.

2.7.1.2. Kalitatif İnce Tabaka Kromatografisi

Aflatoksin analizlerinde sabit faz olarak silikajel, hareketli faz olarak ise değişik çözücü karışımları kullanılabilir. Sabit faz olan silikajel polar özelliktedir. Hareketli faz ise daha az polar özelliktedir. Hareketli faz sabit faz üzerinde belirli bir hızla hareket ederken polaritesi düşük olan moleküller hareketli faz ile daha hızlı sürüklenirken, polaritesi yüksek olan moleküller silikajele daha sıkı tutulduğundan yavaş sürüklenirler. Örnek ekstraktlarının ve standartların, plakaya azaltılmış ışık altında ve mümkün olduğu kadar çabuk bir şekilde tatbik edilmeleri gerekmektedir.

Plâğın Değerlendirilmesi

Plakada öncelikle referans standartının (aflatoksin B1, B2, G1, G2) 4 lekesinin oluşturduğu hat incelenir. Bu 4 leke birbirinden tam olarak ayrılmış olmalıdır. Bunlar azalan R_f değerlerine göre B1, B2, G1, G2'dirler. Aflatoksin B1 ve B2'nin mavimsi floresansına karşılık G1 ve G2'nin yeşilimsi bir renkte olduğu görülür.

İkinci olarak numuneye ait kromatogram incelenir. Numuneye ait lekeyle standarta ait leke aynı renkte ve aynı R_f değerinde bulunmalıdır. Bu durumda numuneye ait kromatogramdaki lekenin aflatoksine ait olabileceği, dolayısıyla numunede aflatoksinin bulunabileceği kabul edilerek doğrulama testlerine geçilir ve kantitatif ince tabaka kromatografisi işlemi uygulanır (Çoksöyler 1997).

Doğrulama Testleri

1. Sülfürik asit testi: Aflatoksin olduğu şüpheli lekeler üzerine % 25'lik H_2SO_4 püskürtülür.

2. Triflor asetik asit (TFA) testi: Bu test sadece aflatoksin B1 ve G1'e uygulanabilmektedir. Örnek ve standart noktalarının üzerine 1-2 μL TFA konularak yapılır (Özkaya ve ark. 1999).

2.7.1.3. Kantitatif İnce Tabaka Kromatografisi

Kalitatif ince tabaka kromatografisinde belirtilen incelemeler yapıldıktan sonra örnek ve standartlara ait aflatoksin lekelerinin floresans konsantrasyonları birbiri ile karşılaştırılır. Öncelikle numune ve standartlardaki aflatoksin B1 lekeleri incelenir.

Numunedeki aflatoksin B1 lekelerinin standarta ait hangi konsantrasyondaki lekeye eşit olduğu tespit edilir. Bu tespiti yaparken plaka UV lambasından yavaş yavaş uzaklaştırılır ve örnek lekesi ile birlikte kaybolan standart lekesi gözlenir ve miktar tayini yapılır (Çoksöyler 1997).

Aflatoksin B1 miktarı şu şekilde hesaplanır.

$$AFB1 (\mu\text{g}/\text{kg}) = S \times C \times V / W \times Y$$

S : Örnek ile çakışan standart hacim (μL)

C : Standart konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V : Örnek ekstraktının seyreltildiği son hacim (μL)

W : Alınan ekstrakt hacminin temsil ettiği örnek ağırlığı (g)

Y : Plaka üzerine uygulanan örnek hacmi

2.7.1.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), mikotoksinler ve mikotoksinler gibi düşük molekül ağırlığına sahip diğer bileşiklerin analizlerinde en çok kullanılan cihazlardan birisidir (Chu 1984).

HPLC cihazı temel olarak pompa, enjektör bloğu, kolon, detektör kısımlarından oluşmaktadır (Hışıl 1999 pp. 218).

Hareketli faz olarak kullanılan çözücüler uygulanan kromatografi şekline bağlıdır. Çözücü rezervuarının çalışma esnasında ağzının kapalı olmasına özen gösterilmelidir. Buharlaşımdan dolayı hareketli fazın kompozisyonu değişebilir. Floresans şiddeti hareketli fazın kompozisyonuna göre değişebilir. Örneğin kloroform hareketli faz çözeltilisinde aflatoksin B'ler, aflatoksin G'lerden daha az floresans göstermektedir.

HPLC cihazında kullanılan kolonlar 4,5-5 mm iç çaplı ve 10-30 cm uzunluğunda, 5-10 μm sabit faz partikülleriyle paketlenmiş durumdadırlar. Kolonlar paslanmaz çelikten yapılmıştır. Kolon dolgu maddesi seçiminde, tanecik büyüklüğü, tanecik büyüklüğünün dağılımı, gözenek hacmi ve yüzey alanı gibi özellikler rol oynar. Sabit faz olarak genellikle gözenekli maddeler kullanılmaktadır. Kullanılan dolgu maddeleri silika ve alimüna esaslıdır (Hışıl 1999 pp. 218).

HPLC için ideal bir detektör, geniş bir konsantrasyon aralığında yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine ve yüksek seçiciliğe sahip olmalı ve kromatografik rezolüsyona kötü etki yapmaksızın kolon akıntısındaki bileşiklere duyarlı olmalıdır. Aflatoksinler hem normal hem de ters faz sistemlerde UV absorpsiyon, floresans ve MS detektörü ile HPLC’de analiz edilebilmektedir.

HPLC ile yapılan mikotoksin çalışmalarında genellikle floresans detektör kullanılmaktadır. Floresans detektörde hücreden hareketli faz içerisinde çözünmüş halde bileşikler geçerken üzerine uzun dalga boyunda monokromatik ışın gönderilir. Bileşik tarafından absorbe edilen bu ışın daha sonra başka dalga boyunda geri verilir. Floresans ölçümde bu emisyon analiz için değerlendirilir (Hışıl 1999 pp. 218).

İmmunoaffinite kolonla örnek hazırlama: Ekstrakte edilen örnekten alınan 10 mL filtrat immunoaffinite kolona aktarılır. Kolonun çıkışına bir toplama kabı konulur. Kolonu yıkamak için 2 defa 10 mL destile su kolondan geçirilir. Son olarak aflatoksinleri kolondan almak için 1 mL metanol uygulanır ve aflatoksinler kolondan alınır (Şekil 2-12). Mikro enjektör vasıtasıyla örnek cihaza enjekte edilir ve örneğe ait kromatogram alınır. İkinci olarak aflatoksin standartı enjekte edilir ve standarta ait kromatogram alınır. Kromatogramlardaki alıkonma zamanlarına bakılarak kalitatif ve kantitatif tayin yapılmaktadır.

Son yıllarda mikotoksin analizlerinde çok sık kullanılan HPLC cihazının bazı dezavantajları da bulunmaktadır (Özkaya ve ark. 1999).

1. HPLC cihazının hassasiyetinin yüksek olmasından dolayı, örneklere etkili bir ekstrakt temizleme işleminin yapılması gerekir.
2. Bir kerede sadece bir örnek analiz edilebildiğinden, otomatik enjeksiyon sistemi olsa bile çok sayıda örnek kısa sürede analiz edilemez.
3. Cihaz pahalıdır ve kullanımı için iyi yetişmiş teknik elemana ihtiyaç duyulmaktadır (Chu 1984).



Şekil 2-12: Mikotoksin analizlerinde numune hazırlık aşaması

2.7.1.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi, antijen-antikor reaksiyonlarının doğrudan saptandığı bir enzim immunoassay yöntemidir. Mikotoksinler antijenik özellik göstermezler. Mikotoksinlerin antijenik özellik göstermeleri için bir protein veya polipeptit zincirine bağlanmaları gerekir. Protein olarak genellikle serum albumini, gamma globulin ve polilizin kullanılmaktadır. Okratoksin, patulin ve penisilik asit gibi reaktif gruplara sahip mikotoksinler doğrudan bağlanma reaksiyonları gösterirler. Buna karşın aflatoksin ve trikotesenleri kapsayan bir çok toksin ise reaktif gruplara sahip değildirler ve bu nedenle reaktif karboksil veya başka bir grubun öncelikle toksin molekülüne bağlanması gerekmektedir (Chu 1984). Antijenler antikorlara hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçleri gibi kovalent olmayan bağlarla geri dönüşümlü olarak bağlanırlar. Diğer aflatoksin yöntemlerinde olduğu gibi ELISA yönteminde de ilk aşama, örneğe uygulanacak olan ekstraksiyon işlemidir. ELISA yöntemi ile yapılan mikotoksin analizlerinde son yıllarda sep-pak kartuşlar kullanılmaktadır. Bu işlem 3 aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada örnek kartuşa ilave edilir. Daha sonra uygun bir çözücü kullanılarak örnekte bulunabilecek kirlilik maddeleri ortamdaki

uzaklaştırılır ve son olarak uygun bir çözücü kullanılarak toksin kartuştan alınır (Chu 1984).

Ekstrakt temizleme aşamasından sonra yapılan işlem basamakları şu şekildedir.

1. Heterojenik yarışmalı ELISA yönteminde ilk önce spesifik antikolar katı yüzeye iki ayrı set halinde bağlanır (Ünlütürk ve Turantaş 1998).

2. İki ayrı set halinde 96'lık kuyucuklara bağlanmış serbest antikolar yıkama tamponu ile yıkanılır.

3. Birinci sete belirli miktarda enzim bağlanmış mikotoksin ile aynı miktarda ekstrakt çözeltisi aynı anda inkübe edilir. İkinci sete ise sadece enzim bağlanmış mikotoksin inkübe edilir ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılır. Bu yöntemde yarışma örnekteki serbest mikotoksin ile spesifik antikora bağlanmaya çalışan mikotoksin-enzim konjugatı arasındadır (Warner ve Pestka 1987).

4. İnkübasyon sonunda 96'lık kuyucuklar tekrar yıkama tamponu ile yıkanılır.

5. Enzimle spesifik olarak reaksiyon veren substrat ortama ilave edilir ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılır. Süre sonunda asit veya alkali kullanılarak reaksiyon durdurulur.

6. Enzim- substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün konsantrasyonu 405 nm'de ELISA okuyucusunda kaydedilir ve standartla karşılaştırılarak kantitatif olarak miktar tayini yapılabilir.

Mikotoksin analizlerinde antijenlerin işaretlenmesinde genellikle peroksidaz ve alkali fosfotaz enzimleri kullanılmaktadır. Bu enzimlerle reaksiyon veren birçok substrat reaksiyon sonucunda renkli maddeler oluşturularak reaksiyon sonucunun gözle saptanmasına olanak tanılır. ELISA yönteminin değişik mikotoksin analizlerinde kullanılması, değişik mikotoksinlere karşı spesifik antikor üretimine bağlıdır. Bu nedenle antikor üretimi için daha etkili yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.7.1.6. Gaz Kromatografisi

HPLC ve ince tabaka kromatografisi mikotoksin analizlerinde kullanılan en yaygın yöntemlerden olsalar da, gaz kromatografik metotlar son yıllarda çok sayıda mikotoksinin, özellikle trikotesenlerin analizinde önemli rol oynamaktadır.

Mikotoksinlerin çoğu uçucu olmadıklarından dolayı gaz kromatografisi analizlerinde türevlendirme basamağı gereklidir. Başka hiç bir dedeksiyon tekniği gerektirmediğinden ve oldukça kararlı türevler verebilmesinden dolayı en yaygın kullanılan türevlendirme ajanı trimetilsilindir. Heptaflorobütirat türevleri ile elektron yakalama dedektörü (ECD = Electrone Capture Detector) ve kütle spektrometrisi kullanılarak çok hassas ölçümler yapılabilir. Trifloroasetil esterleri uçucu olmalarına rağmen çok kararlı yapıda değildirlir.

Mikotoksin analizlerinde alev iyonizasyon dedektörü (FID), elektron yakalama dedektörü (ECD) ve kütle dedektörü en sık kullanılan dedektör tipleridir. GC/MS (gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi) özellikle trikotesen analizlerindeki seçiciliği, hassasiyeti, zaman ve emek tasarrufu yönünden güçlü bir analitik araçtır.

2.7.1.7. Kromatografik Metotların Kütle Spektroskopisi ile Birlikte Kullanımı

HPLC-MS/MS mikotoksin ve metabolitlerinin belirlenmesinde çok sık kullanılmaktadır. Trikotesen ve zeralenon mikotoksinlerinin kantitatif analizinde GC-MS başarı ile kullanılmıştır (Tanaka ve ark. 2007). Matriks etkisi LC-MS'in başarısını kısıtlar. İyon baskılama (veya artışı) analit ile beraber gelen matriks bileşiklerinin oluşturduğu bir etkidir. Bunun önüne geçmenin yolu matriksli standartlar kullanmak veya toksin/matriks kombinasyonu ile çalışmaktır. Çoklu mikotoksin metotları sadece ekstraksiyon ve temizleme basamaklarının optimum şartlarda olmaları yönünden avantajlıdır. Böyle metotlar konvansiyonel metotlarla karşılaştırıldığında analitik işgücünde büyük bir azalış sağlar ve analitik verimde büyük bir artışa neden olurlar (Berthiller ve ark. 2005). En son jenerasyon elektrospray kullanılan LC-MS/MS cihazları, ön temizleme işlemine gerek kalmaksızın ham bitki ekstraktlarının analizine olanak verir (Spanjer ve ark. 2008).

2.7.1.8. Diğer Yöntemler

Şu ana kadar mikotoksinlerin tespiti ve analizi için kullanılan testler pahalı ve birçok ekipmana gereksinim duyulan testlerdi. Maragos adlı araştırmacı hali hazırda kullanılan ELISA için yeni antikor geliştirerek testin hızlandırılmasını sağlamıştır (Maragos 1999). Bu yeni antikor ile selektif bir şekilde aflatoksin bağlanabilmekte böylelikle dikkatli ve doğru bir şekilde toksinin tespiti yapılabilmektedir. Eğer ortamda

antikorla bağlanacak toksin bulunmuyorsa koyu portakal renk, eğer toksin varsa oldukça parlak bir renk ya da renksizlik test çözeltisinde gözlenmektedir.

Mikotoksinler için önerilen diğer bir metot kapiler elektroforez metodudur. Örnekler ince, dayanıklı kapilerlerden elektrik akımı ile geçirilmektedir. Bu proses bileşiklerin elektrik yüklerine göre ayrılmasını sağlamakta geleneksel yöntemlerde olduğu gibi herhangi bir çözücü kullanılmamaktadır (Maragos 1999). 1998'den itibaren Maragos kapiler elektroforez yöntemini diğer mikotoksinlerden deoksinivalenol için geliştirmiştir. Son yıllarda ise immunoassay metodunun başka bir tipi olan biyosensörlerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Burada da toksin seviyelerinin ölçümünde ve toksinin yakalanmasında antikorlar kullanılmaktadır.

İlk biyosensörler 1963 yılında elektrokimyasal elektrotlar kullanılarak düzenlenmiştir (Palleschi 1999).

Biyosensörler biyolojik olarak tanıyacakları sistemlere göre sınıflandırılabilirler. Biyosensörlerde kullanılan materyaller enzim/substrat, antikor/antijen ve nükleik asit/tamamlayıcı sıraları içeren çiftlerdir.

Son yıllarda bu konuyla ilgili çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Biyosensörlerin hızlı aflatoksin tayininde kullanılmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada; iki temel immunokimyasal bazlı analizden söz edilmektedir. Birincisi atılabilir DNA bazlı biyosensörlerin kullanılmasıdır. Bu analiz, yüzey bağlantılı DNA ve hedeflenen toksin veya kirleticiler arasındaki moleküler interaksyonu içermektedir. İkinci analiz ise çok yeni geliştirilmiş otomatik ve manuel biyosensörler olup aflatoksinlerin tespiti ve miktarları hakkında bilgi verebilmektedir. Bu yeni geliştirilen ekipman immunoaffinite prensiplerine sahip ve kantitatif analizde ise floresans esasına dayandığı bildirilmektedir (Prudente 2002). Bir başka çalışmada AFB1'in kesici dalga bazlı fiber optik immunosensör kullanılarak teşhisi yapılmıştır (Chris and Steven 1998). Gaag ve ark. zeralenon, AFB1 ve OTA'nın tespitlerinde biyosensör teknolojisinden yararlanmışlar ve bu amaçla BIACORE kullanmışlardır (Gaag ve ark. 1998). HPLC ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda her iki yöntem arasında önemli bir fark bulamamışlardır. Fakat, biyosensörlerle çalışmanın daha kolay ve daha az kalifiye elemana ihtiyaç duyduğunu belirtmişlerdir. Gaag ve ark., HPLC ve ELISA yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak biyosensör kullandıkları çalışmada, biyosensörlerin

tekrarlanabilirliği, üretilebilirliği gibi özelliklerinden dolayı çoklu mikotoksin aranmasının, tek bir ölçümle yapılmaya çalışıldığı ELISA ve HPLC tekniklerine göre daha iyi olduğunu bulmuşlardır (Gaag ve ark. 2000).

Mikotoksinlerin doğru ve kesin sonuç veren ölçümlerini içeren metotlar geliştirilmeye devam edilmektedir. Bu yöntemlerin, tarlada bile kullanılabilirliğinin sağlanması ölçüsünde geliştirilmeleri, toksinsiz gıda ve yemlerin insanlara ulaştırılması umudunu da gerçek kılacaktır.

2.7.2. Aflatoksin Analiz Yöntemleri

Aflatoksin analizi için çok sayıda İTK metotları geliştirilmiştir. Silika plaklar sıklıkla kullanılan İTK araçlarıdır. Bu metotların çoğunda klorlu çözücüler (diklorometan, kloroform v.b.) mobil faz, ekstraksiyon ya da temizleme çözücüsü olarak kullanılırlar.

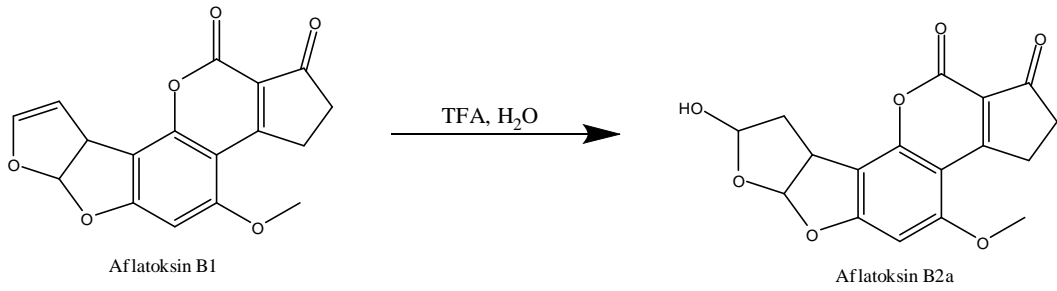
Ekstraksiyon, katı-faz ekstraksiyon (SPE) kartuşlarıyla ya da immunoafinite kolonlarla yapılır. Etkin matriks bileşenlerini kaldırmak ve çok kısa sürede daha saf ekstrakt elde etmek için MycoSep[®] SPE kolonları çok tercih edilir. Ayrıca, silika, alumina veya RP-18, konvensiyonel SPE kolonlarında kullanılan materyallerdir.

Geliştirilen kromatografik metotlar ters faz bir kolonun kullanıldığı, kolon sonrası türevlendirmenin yapıldığı, florimetrik dedektörün kullanıldığı metotlardır. Aflatoksin molekülü düzlemsel heterosiklik yapısından dolayı doğal floresans özelliğindedir. Floresans yoğunluğunun değişkenliği farklı yapısal varyasyonlarından dolayıdır. Bu varyasyonlarla birlikte aflatoksinlerin 8,9- pozisyonundaki terminal furan halkası ve çifte bağ toksisitede önemli rol aynar.

Aflatoksinler sulu çözeltilerinde sönüme uğradıkları için floresans dedektörle tayin edilmeden önce türevlendirme yapılır. Aflatoksin B1'in yüksek toksisitesi ve sulu mobil fazlar kullanılmasından dolayı sönüm etkisini azaltmak için değişik metotlar denenmiştir. Sönüm etkisini azaltmanın ise en iyi yolunun kolon öncesi yada kolon sonrası türevlendirme yaparak terminal furan halkasının ayrılmasını sağlamak olduğu görülmüştür. Sönüm etkisini azaltmanın diğer bir yolu da siklodekstrinli mobil fazlar kullanmaktır. Siklodekstrinler organik ve inorganik moleküllerin boşluklarında tutunmaya elverişli moleküllerdir. Ancak bu metot pahalı olduğundan ve diğer metotlara

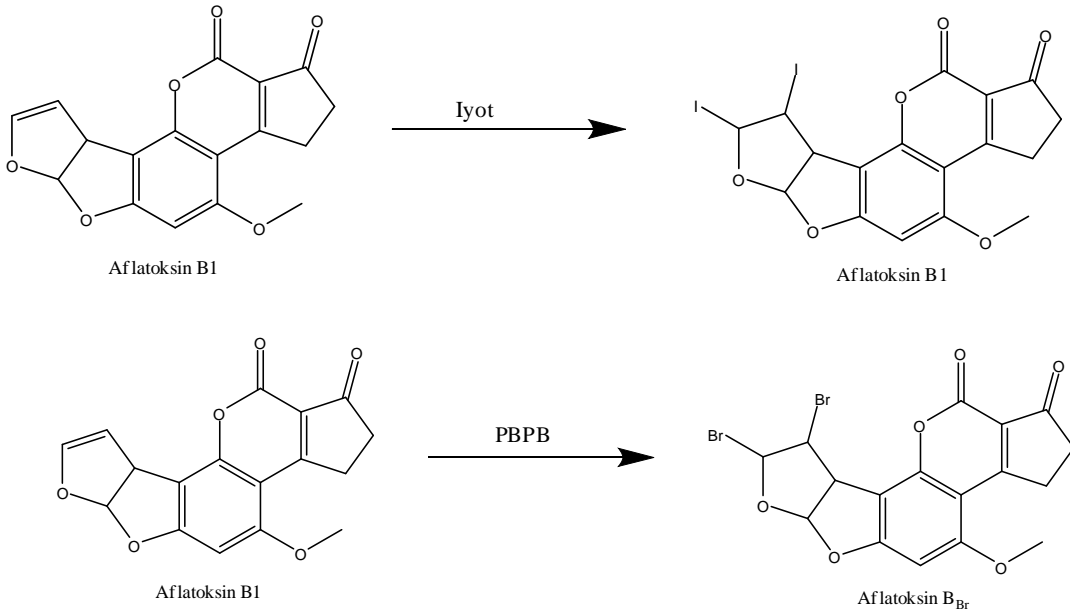
göre farklı avantajlarının olmayışından rutin analizlerde pek kullanılmaz (Hernandez 2009).

Kolon öncesi türevlendirme teknikleri, aflatoksin B1'in TFA ile hemiasetaline dönüştürülmesi temellidir (Şekil 2-13). Bu teknik diğer tekniklerden daha az zahmetli olmasına rağmen kolon sonrası türevlendirmeye karşılaştırıldığında uçurma basamağı gerektirmesi ve türevlerinin polaritesinin yüksek olması yönünden tercih edilebilirliği azdır. Ayrıca piklerin retansiyon zamanlarının çok kısa olması ve matris pikleriyle girişim yapması kolon sonrası türevlendirmeyi üstün kılmaktadır (Hernandez 2009).



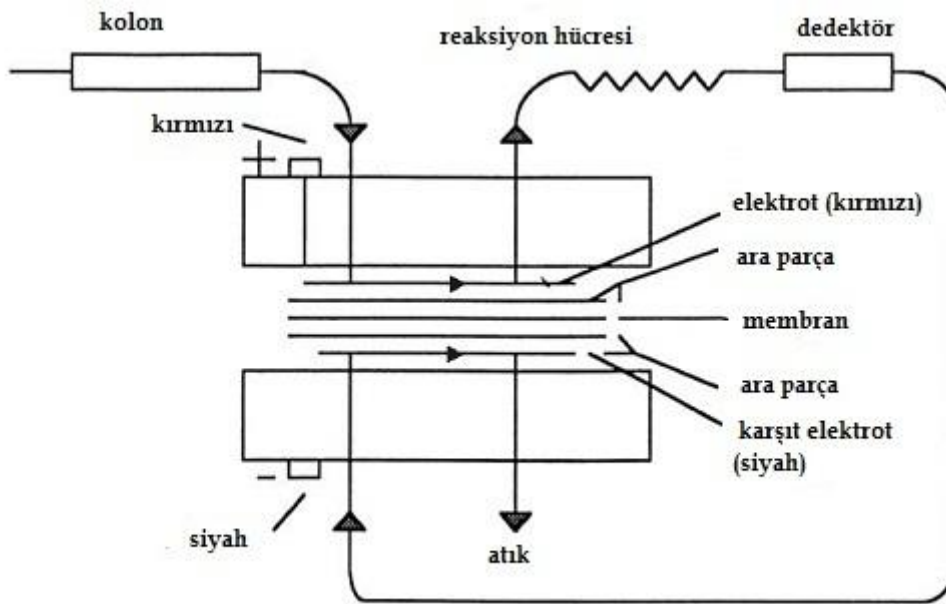
Şekil 2-13: Aflatoksin B1'in TFA ile olan reaksiyonu

Diğer bir türevlendirme şekli de iyot ve brom gibi halojenlerle yapılan türevlendirmedir. İyotla türevlendirme sıcaklık ve zamanla ilgili daha zor şartlar gerektirir (Şekil 2-14). Bromlama, piridinyum hidrobromür perbromür (PBPB) veya elektrokimyasal yolla mümkündür (Hernandez 2009).



Şekil 2-14: Aflatoksin B1'in iyot ve PBPB ile reaksiyonları

Elektrokimyasal türevlendirmede KOBRA (Kok-bromination-apparatus) adı verilen özel bir aparat kullanılır (Stroka 2000) (Şekil 2-15). Bu metotta mobil faza potasyum bromür ve nitrik asit eklenir. Mobil faz KOBRA-cell'e ulaştınca elektroliz meydana gelir ve brom serbest bırakılır. Brom aflatoksin ile reaksiyona girer ve ters faz çözücü sistemlerinde floresans türevler oluşturur.



Şekil 2-15: KOBRA-cell

2.7.3. Okratoksin A Analiz Yöntemleri

OTA analizinde tercih edilen yöntemler immunokimyasal yöntem ile ince tabaka kromatografisi ve floresans dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleridir. OTA asitlendirilmiş ortamlardan organik çözücülerle kolaylıkla ekstre edilebilmektedir. Yöntemlerin tümünde OTA analizine geçmeden önce örnekte, uygun yöntemlerle ekstraksiyon, saflaştırma ve zenginleştirme işlemlerinin yapılması gerekmektedir (Scott 2002).

Okratoksin A analizi için çeşitli mikroekstraksiyon ve temizleme basamakları, farklı immunoassay tipleri geliştirilmiştir. OTA doğal floresans gösteren bir maddedir. Bu özelliği nedeni ile herhangi bir türevlendirme işlemine gerek olmadan çok düşük OTA seviyelerini floresans dedektörle tayin etmek mümkün olabilmektedir. HPLC ile analizlerde C18 kolonlar ve asetik asitli asetonitril su karışımı mobil fazlar tercih edilmektedir. LC çalışmalarında OTA'nın analizinde mobil fazın pH'ı, sıcaklık ve akış

hızı önemlidir. Yapılan literatür çalışmalarında pH'ı asetik asit ile 2,36'ya ayarlanan 5 mM sodyum asetat, asetonitril ve metanol (40:30:30) mobil faz sisteminde, 333 nm eksitasyon, 467 nm emisyon dalga boylarında ve 24°C sıcaklıkta yüksek geri kazanımlı sonuçlar elde edildiği belirlendi (Scott 2002).

OTA'nın gıda maddeleri ve biyolojik ürünlerdeki düzeylerinin tayininde en önemli safha ekstrelerin temizlenmesidir. Yem gibi çok kompleks matrikslerde temizleme basamağından önce dilüsyon ve filtrasyon basamaklarına ihtiyaç duyulabilir. OTA'nın örneklerden su ve asetonitril/metanol karışımları veya kloroform ile ekstraksiyonunun ardından yapılacak temizleme işleminde en fazla tercih edilen yöntem, çözücü sarfiyatının düşük düzeyde olduğu katı faz ekstraksiyon tekniğidir. Çok daha hızlı ve etkili temizlemenin sağlandığı bu yöntemde katı faz olarak florisil, C18, silikajel ve diatome toprağı kullanılmaktadır. Etkin matriks bileşenlerini kaldırmak ve çok kısa sürede daha saf ekstrakt elde etmek için immunoafinite Ochra Prep® kolonları daha çok tercih edilmektedir (Scott 2002).

2.8. Mikotoksin Analizlerinde Kalite Kontrol/Kalite Güvence (QA/QC) Kriterleri

2.8.1. Örnekleme

Mikotoksinlerin belirlenmesinde kullanılan bütün analitik işlemler; örnek alma, örnek hazırlama, ekstraksiyon, temizleme, konsantrasyon, kalitatif ve kantitatif analiz ve doğrulama aşamalarından oluşmaktadır (Smith ve Moss 1985). Mikotoksin analizlerinde örnek alma ve analiz örneğinin hazırlanması en önemli aşamalardır. Bir yığın içinde mikotoksin dağılımı homojen olmadığından bir yığından alınacak örnek miktarının ve analiz için tüm yığını temsil edecek analiz örneği miktarının belirlenmesi çok önemlidir. Alınan örneğin öğütülerek mikotoksinle bulaşık parçacıkların etkili bir şekilde dağılımını sağlamak için homojen hale getirilmesi gerekmektedir (Campbell ve ark. 1986). Bu anlamda 26.04.2007 tarih ve 26504 sayılı Resmi Gazetede mikotoksinlerle ilgili örnek alma, örnek hazırlama ve analiz metodu tebliği yayınlanmıştır.

Örnek içerisinde homojen bir şekilde dağılmayan mikotoksinler gibi istenmeyen maddeler veya ürünlerin kontrolü için belli sayıda paçal numune (numune alınan partiden alınan birincil numunelerin birleştirilmesi ve homojen olarak karıştırılması ile elde edilen numune) oluşturmak üzere her bir bölümden alınan birincil numuneler

(numune alınan partinin bir noktasından alınan miktarı) birleştirilerek karıştırılır. Tahmini ve göz kararı oluşturulan her bölümden alınan paçal numune, alındığı bölüme göre kodlanır. Homojen bir numune elde edebilmek için, her bir paçal numune dikkatli ve özenli bir şekilde karıştırılır. Gerekirse paçal numune mekanik veya otomatik ayırıcı kullanılır. Laboratuvara gönderilmek üzere, eşit ve aynı özellikleri taşıyacak şekilde en az iki numune oluşturulur. Her bir numune uygun kap ya da ambalajlara ayrı ayrı konulur.

Tahıl ve tahıl ürünlerinde (*Fusarium* toksinleri, Okratoksin A, Aflatoksin B1 ve toplam aflatoksin analizleri için) birincil örnek yaklaşık 100 g olmalıdır. Paçal örnek ağırlığı ise 10 kg civarındadır. Mikotoksinlerin dağılımı homojen olmadığı için, örnekler büyük bir dikkatle homojenize edilmelidir. Laboratuvara ulaşan numunenin tamamı homojenize edilmelidir. Öğütme işlemi ile tam bir homojenizasyon sağlanmalıdır. Homojenize olan örnekten 50 g'lık analitik porsiyonlarla analiz yapılmalıdır. Daha küçük miktarlar analitik hata verir. Aflatoksinler ultraviyole ışıktan etkilendiği için, analiz sırasında mümkün olduğunca gün ışığından kaçınılmalıdır.

2.8.2. Metot Validasyonu

Kullanılan kalıntı analiz metodu, metot validasyon kriterleri ile geçerli kılınmalıdır. Bu kriterler 1) Doğruluk, 2) Uygulanabilirlik, 3) Gözlenebilme sınırı, 4) Tayin sınırı, 5) Kesinlik, 6) Geri alma, 7) Seçicilik, 8) Duyarlılık, 9) Doğrusallık, 10) Ölçüm belirsizliği, 11) Matriks etkisi olarak sıralanabilir (EuraChem Guide, 1998). Metot validasyonu kriterlerinden hepsinin kalıntı analizlerinde özel önemi vardır. Ancak araştırmacıların en fazla üzerinde durdukları, kesinlik, ölçüm belirsizliği ve matriks etkisidir. Kesinlik kriteri çok önemlidir. Tekrar değerlerinin birbirine yakınlığının ifadesidir ve rastlantısal hataların bir ölçümüdür. Bir analitik metodun çalışma koşullarında tekrar edilebilirliğinin ölçümüdür. Bu parametre 4 alt kriterde değerlendirilir. Bu değerlendirme metot, analist, ekipman ve laboratuvar kavramlarının aynı ve/veya farklı oluşlarına göre yapılır. Ancak kesinlik kriterinde belli limitler içinde olması gereken tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik kavramlarının kalıntı analizlerinde anlamı büyüktür.

a) Tekrar Edilebilirlik (Repeatability)

Bir laboratuvarında kısa aralıklarla tek bir analizcinin aynı ekipmanlarla yaptığı analizlerin mümkün olduğu kadar sabit koşullarda gerçekleştiğini gösterir. Aynı örnekte, aynı metot kullanılarak, aynı laboratuvar, aynı kişi, aynı ekipman ve farklı günlerde yapılan analizler arasındaki ilişkidir. Bu koşullarda yapılan iki analiz sonucu arasındaki mutlak farktır (genellikle % 95 olan belirli bir güven aralığında $r = 2,8 \times sr$ içinde kalması beklenir).

b) Tekrar Üretilirlik (Reproducibility)

Laboratuvarlar ya da kişiler arası yeniden yapılabilirliktir. Laboratuvarlar arasında yapılan ortaklaşa çalışmaların sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade eder. Aynı örnekte, aynı metot kullanılarak, aynı ekipman, farklı günlerde ancak farklı laboratuvarlarda farklı kişiler tarafından yapılan iki analiz sonucu arasındaki (genellikle % 95 olan belirli bir güven aralığında $R = 2,8 \times sR$ içinde kalması beklenen) mutlak farktır. Elde edilen sonuçların relatif SD (standart sapma) yüzdelerinin hesaplanması ile açıklanır. Kısaca RSD ile gösterilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Analizin Yapıldığı Yer

Bu tez çalışması Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları'nda yapıldı.

3.2. Materyal

82 adet işlenmiş tahıl ürünü analiz materyallerini oluşturdu. Örnekler tesadüfi örnekleme yöntemine göre İstanbul'daki çeşitli marketlerden temin edildi (Şubat 2013). Örnekler kendi ambalajlarında tutularak laboratuvara getirildi, aflatoksin ve okratoksin analizleri için soğuk ortamda (+4°C) ve karanlıkta muhafaza edildi.

Örnekler 11 ana ürün grubuna (ekmek, un, nişasta, irmik, pasta unları, makarna, kek, bisküvi, cips, galeta, diyabetik ürün) ayrıldı, her bir ana gruptan farklı markalar olmak üzere sınıflandırıldı. Markalar belirtilmedi. Tablo 3-1'de örneklerin ana grubu, adı ve kodu verilmektedir.

Tablo 3-1: Analiz örneklerinin sınıflandırılmaları ve kodları

			MARKA	ÖRNEK ADI	ÖRNEK KODU
EKMEK	Kalorisi azaltılmış	E1	A	Light ekmek	E1A
			B	Light tost ekmeği	E1B
			C	Light kepekli ekmek	E1C
	Beyaz	E2	A	Beyaz ekmek	E2A
			B	Beyaz tost ekmeği	E2B
	Kepekli	E3	A	Kepekli ekmek	E3A
			B	Kepekli ekmek	E3B
	Çavdarlı	E4	A	Çavdarlı ekmek	E4A

			B	Çavdarlı ekmek	E4B	
UN	Beyaz	U1	A	Beyaz Un	U1A	
			B	Beyaz Un	U1B	
			C	Beyaz Un	U1C	
	Kepekli	U2	A	Kepekli Un	U2A	
			B	Kepekli Un	U2B	
	Mısır	U3	A	Mısır Unu	U3A	
			B	Mısır Unu	U3B	
	Glutensiz	U4	A	Glutensiz Un	U4A	
	Köy Ekmek	U5	A	Köy Ekmek Unu	U5A	
			B	Köy Ekmek Unu	U5B	
	Çavdar Ekmek	U6	A	Çavdar Ekmek Unu	U6A	
			B	Çavdar Ekmek Unu	U6B	
	NİŞASTA	Pirinç	N1	A	Pirinç nişastası	N1A
				B	Pirinç nişastası	N1B
C				Sade pirinç unu	N1C	
D				Sade pirinç unu	N1D	
Buğday		N2	A	Buğday nişastası	N2A	
			B	Buğday nişastası	N2B	

	Mısır	N3	A	Mısır nişastası	N3A
			B	Mısır nişastası	N3B
	Patates	N4	A	Patates nişastası	N4A
İRMİK	Sade irmik	İ1	A	İrmik	İ1A
			B	İrmik	İ1B
	Bebek mamaları	İ2	A	Sütlü, irmikli, ballı, tahıllı	İ2A
			B	Sütlü, irmikli, meyveli	İ2B
			C	Sütlü, ballı, irmikli	İ2C
PASTA UNLARI	Sade kek karışımı	P1	A	Sade kek unu	P1A
			B	Sade kek unu	P1B
	Limon aromalı	P2	A	Limonlu kek unu	P2A
			B	Limonlu kek unu	P2B
			C	Limonlu kek unu	P2C
	Poğaç unu	P3	A	Poğaç unu	P3A
			B	Poğaç unu	P3B
MAKARNA	Sade	M1	A	Spagetti makarna	M1A
			B	Burgu makarna	M1B
			C	Fiyonk makarna	M1C
	Kepekli	M2	A	Burgu makarna	M2A

		B	Burgu makarna	M2B		
	Glutensiz	M3	A	Organik burgu	M3A	
			B	Erişte	M3B	
KEK	Pasta altı	K1	A	Sade pasta tabanı	K1A	
			B	Sade pasta tabanı	K1B	
			C	Sade pasta tabanı	K1C	
	Glutensiz	K2	A	Glutensiz kakaolu kek	K2A	
	Meyveli	K3	A	Meyveli kek	K3A	
			B	Meyveli kek	K3B	
			C	Karışık meyveli kek	K3C	
			D	Kırmızı meyveli kek	K3D	
	BİSKÜVİ	Kremalı	B1	A	Kremalı bisküvi	B1A
				B	Sandviç bisküvi	B1B
C				Çoko damlalı kremalı	B1C	
Bebe		B2	A	Bebe bisküvisi sade	B2A	
			B	Bebe bisküvisi sade	B2B	
Glutensiz		B3	A	Bebe bisküvisi	B3A	
			B	Sade bisküvi	B3B	
			C	Tuzlu kraker bisküvi	B3C	

	Light	B4	A	Yulaflı	B4A
			B	Keten tohumlu, kepekli	B4B
			C	Çörek otlu, kepekli	B4C
			D	Mısır, pirinç patlaklı	B4D
			E	Mısır pirinç çıtır	B4E
CİPS	Patates	C1	A	Tırtıklı sade	C1A
			B	Klasik aile boyu	C1B
			C	Orjinal aile boyu	C1C
	Mısır	C2	A	Küp mısır	C2A
			B	Süt mısır	C2B
GALETA	Light	G1	A	Light galeta	G1A
			B	Light galeta	G1B
			C	Light çubuk kraker	G1C
	Sade	G2	A	Sade galeta	G2A
			B	Sade galeta	G2B
			C	Sade galeta	G2C
DİYABETİK	Gofret	D	A	Diyabetik gofret	D

3.3. Kimyasal maddeler, Çözücüler, Çözeltiler

Toplam aflatoksin (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) ve okratoksin A standartları R-Biopharm firmasından temin edildi. Aflatoksin standardının 6 mL'inde 250 ng/mL B1, 250 ng/mL B2, 250 ng/mL G1, 250 ng/mL G2 bulunmaktadır. Potasyum bromür, HPLC grade asetonyitril, HPLC grade metanol, aseton, nitrik asit, sodyum bikarbonat, sodyum klorür Merck'ten, PBS (Phosphate Buffer Saline) Sigma'dan temin edildi. Aflatoksin analizinde kullanılan immunoafinite kolonlar toplam aflatoksin ve aflatoksin B1'e karşı, okratoksin analizinde kullanılan kolonlar okratoksin A'ya karşı antikör içeren kolonlardır ve ELISA test kitleriyle birlikte R-Biopharm'dan temin edildi.

3.4. Cihaz ve Gereçler

1. HPLC cihazı (Shimadzu LC-20)
 - 20A Floresans dedektör
 - LC-20AT Pompa ünitesi
 - DGU-2015 Degaze Ünitesi
 - CTO-10ASVP Kolon fırını
 - SIL-20AHT Otomatik numune örnekleyici
 - C₁₈ Analitik Kolon: Cronusil-S ODS2 5 µm 25 cm x 0,46 cm
2. Mikroplate okuyucu ELISA Reader (BioTek Power Wave XS USA)
3. Hassas terazi (Shimadzu AUW220D)
4. Vorteks (Velp Scientifica)
5. Santrifüj (Nüve NF800)
6. Ultrasonik banyo (VWR)
7. Ultra saf su cihazı (Human Power I)
8. Örnek süzme filtresi (Chromofil RC-45125 0,45 µm)
9. Otomatik pipetler (Eppendorf, 10-100 µL, 100-1000 µL)
10. KOBRA CELL (Elektrokimyasal yolla bromla türevlendirme aparatı)

3.5. Örneklerin Analize Hazırlanması

3.5.1. ELISA Tarama Testi İçin Örneklerin Hazırlanması ve Analiz Metodu

ELISA yöntemi bir ön tarama testi olarak kullanıldı. Gıda örnekleri R-Biopharm metodu esas alınıp (R-Biopharm 2002; 2006; 2007) 5'er g tartılarak blenderdan geçirildi ve homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler %70 metanol ile ekstre edildi ve Whatman No:4 filtre kağıdından süzüldü. Filtratın 1 mL'si alınıp 1 mL distile su ile seyreltikten sonra bu çözeltinin 50 µL'si Elisa taraması testi için kullanıldı. Standartlar ve reaktifler kullanılmadan 1 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığında bekletildi ve birkaç defa çalkalandı.

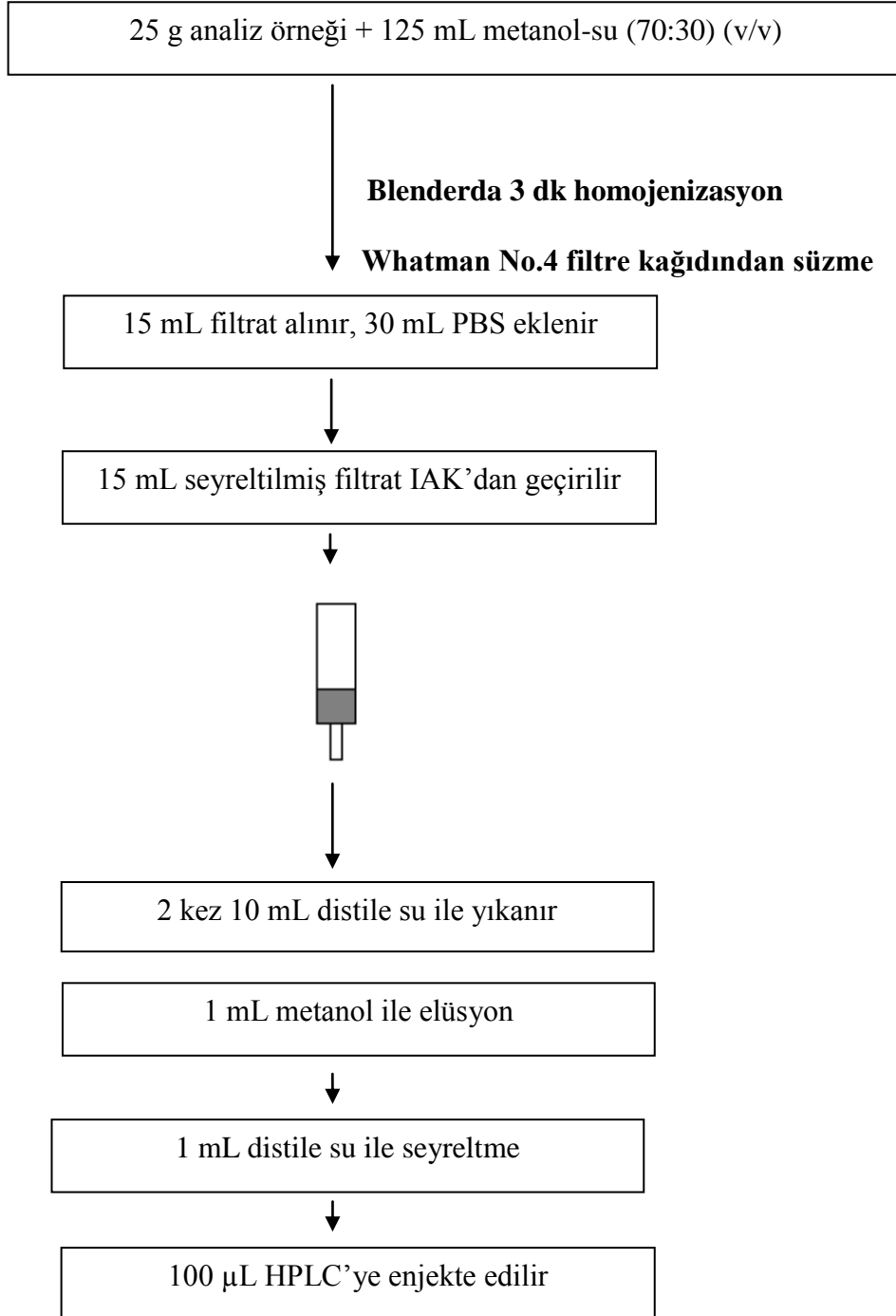
Standart ve örneklerden 50'şer µL Elisa kitlerinin (Şekil 3-1) ilk striplerinin 8 kuyucuğuna ve ikinci stripin 8 kuyucuğuna koyuldu ve plate hafif vurularak karışmaları sağlandı (Şekil 3-1). Konjugat ve antikor 50'şer µL standart ve örneklerin üzerine eklendi. Antikor eklemesi hızlı bir şekilde yapıldı. Her eklemeden sonra plate vurularak, eklenen kimyasalların karışması sağlandı. Plate'in üzeri siyah bir kapak ile kapatılarak karanlık bir ortamda toplam aflatoksin ve okratoksin A için 15 dakika, aflatoksin B1 için yarım saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate boşaltılıp distile su ile 3 kez yıkama yapıldı (Aflatoksin B1 için yıkama işlemi PBS ile yapıldı). Son olarak her bir çukura reaksiyonu durdurmak için 100 µL durdurucu reaktif (%10'luk sülfürik asit) eklendi. Durdurucu reaktif ilavesinden sonra ELISA Reader ile 450 nm'de okuma yapıldı. Sonuçlar RidaWin programı ile değerlendirildi.



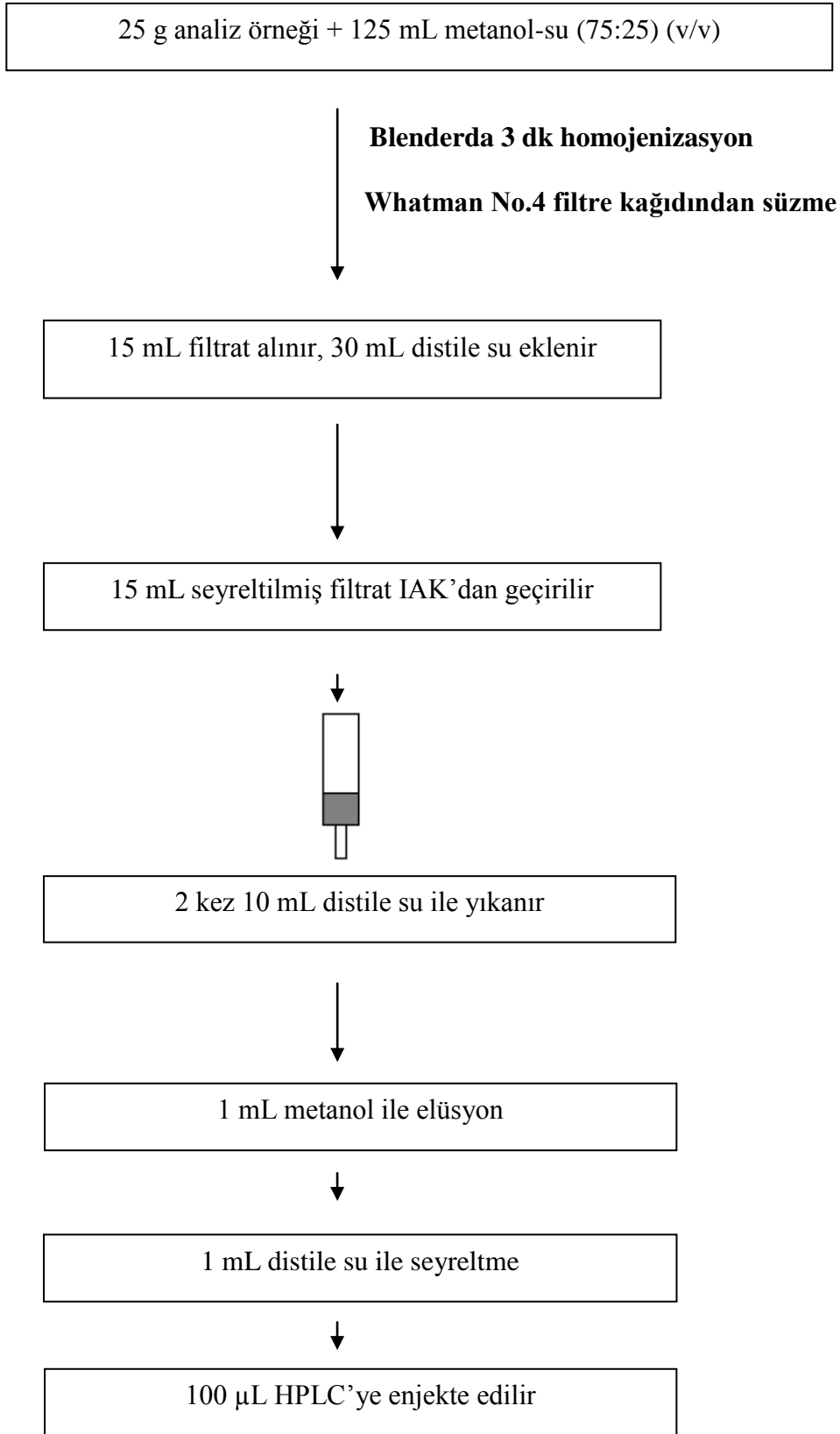
Şekil 3-1: Mikotoksin ELISA test kitleri

3.5.2. HPLC Çalışması için Örneklerin Hazırlanması

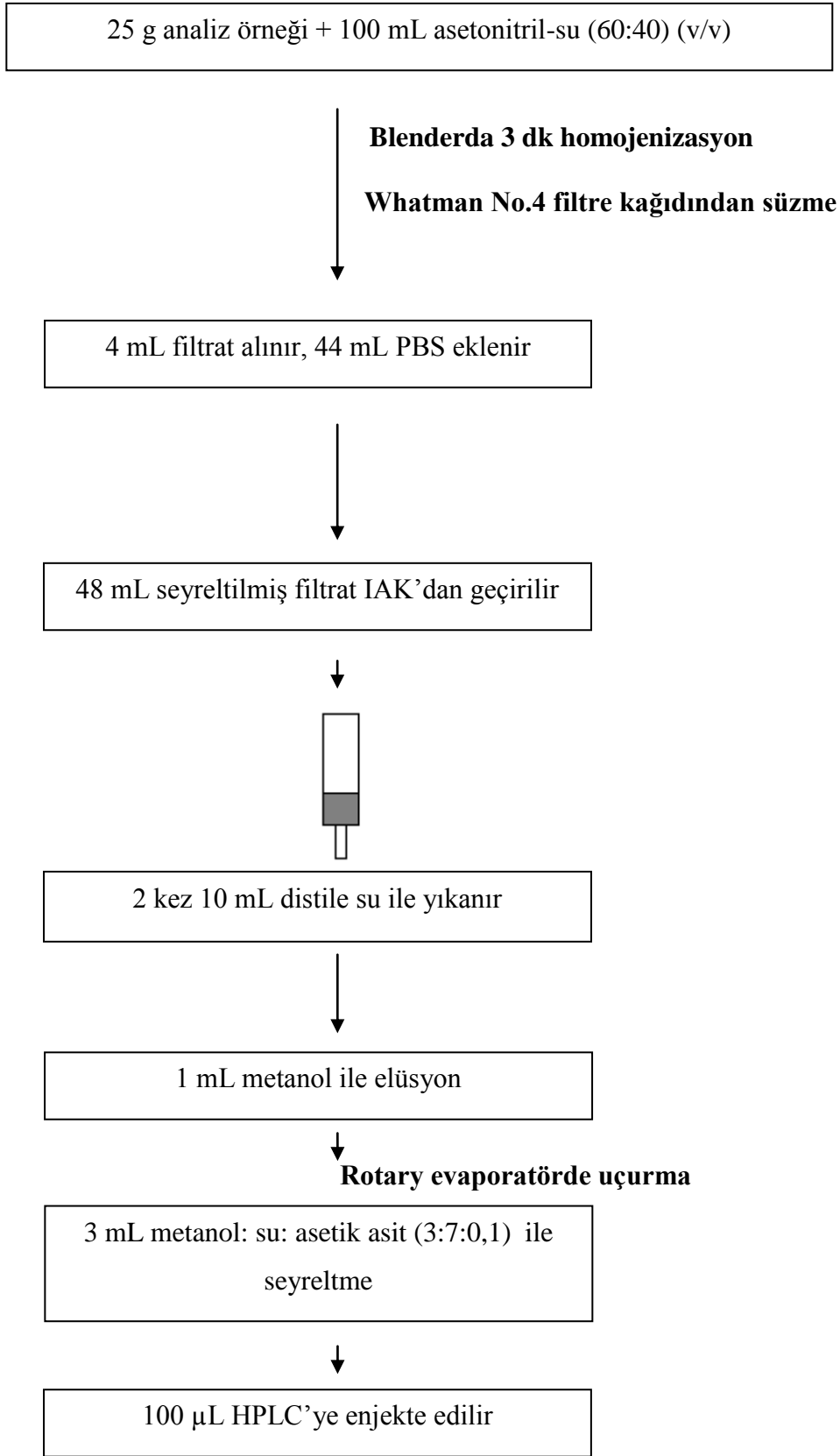
Analiz örneği, homojen hale getirmek için blenderda 3 dk süre ile öğütüldü. Homojen haldeki örneğin 25 g'ı analizler için kullanıldı (Şekil 3-2, 3-3, 3-4, 3-5) (AOAC 991:31; 2000:03).



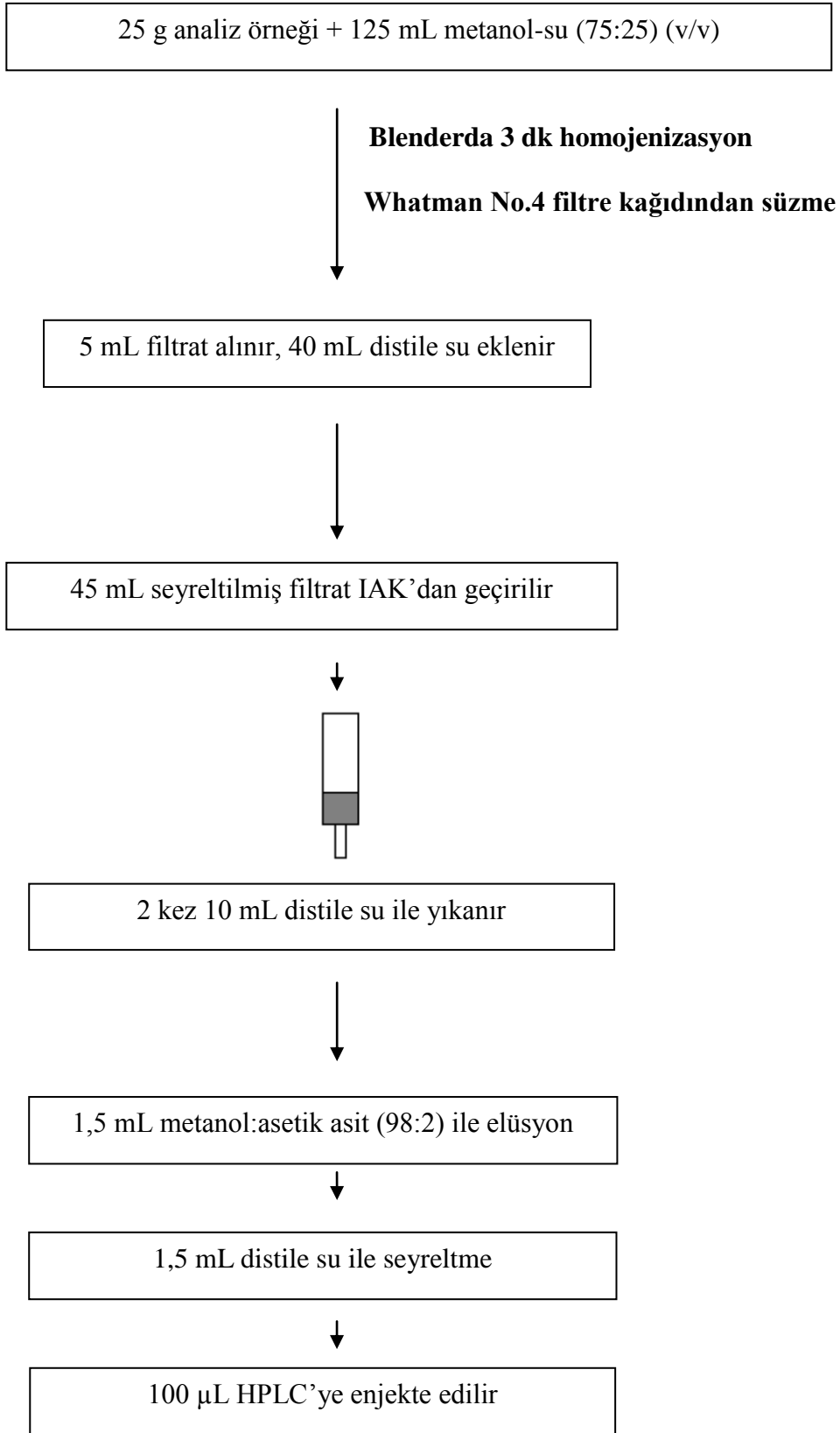
Şekil 3-2: Aflatoksin analiz örneğinin hazırlanması (temel metot)



Şekil 3-3: Aflatoksin analiz örneğinin hazırlanması (modifiye metot)



şekil 3-4: Okratoksin A analiz örneğinin hazırlanması (temel metot)



Şekil 3-5: Okratoksin A analiz örneğinin hazırlanması (modifiye metot)

3.6. Metot Performans Parametrelerinin Belirlenmesi

LOD (Limit of Detection) ve LOQ (Limit of Quantification) değerleri aflatoksin ve okratoksin A metotları için EURACHEM GUIDE (EuraChem Guide 1998) esas alınarak Microsoft Excel® programı kullanılarak hesaplandı. Kesinlik parametreleri RSD_r, RSD_R ve Horwitz değerleri IUPAC/AOAC Harmonization Protocol (Horwitz 1995) kaynağına dayanarak Microsoft Excel®'le hesaplandı. Tüm analizler iki tekrarlı yapıldı.

3.7. HPLC'de Aflatoksin Analizi Parametreleri

a) Temel metot

Analitik Kolon: Cronusil-S ODS2 5 µm 25 cm x 0.46 cm

Mobil faz: 6/3/2 Su: Metanol: Asetonitril + 0,132 g KBr + 300 µL Nitrik asit (1 L için)

Akış hızı: 1 mL/dk

Floresans dedektör: Eksitasyon: 365 nm, Emisyon: 435 nm

Kolon sıcaklığı: 40°C

Enjeksiyon hacmi: 100 µL

Elution Order: Aflatoksin G2, Aflatoksin G1, Aflatoksin B2, Aflatoksin B1

Türevlendirme: Kobra Cell, 100 µA

Analiz süresi: 10 dk

b) Modifiye metot

Analitik Kolon: Cronusil-S ODS2 5 µm 25 cm x 0,46 cm

Mobil faz: 8/54/38 Asetonitril: Su: Metanol + 0,2 g KBr + 360 µL Nitrik asit (1 L için)

Akış hızı: 1 mL/dk

Floresans dedektör: Eksitasyon: 365 nm, Emisyon: 435 nm

Kolon sıcaklığı: 45°C

Enjeksiyon hacmi: 100 µL

Elution Order: Aflatoksin G2, Aflatoksin G1, Aflatoksin B2, Aflatoksin B1

Türevlendirme: Kobra Cell, 100 µA

Analiz süresi: 12 dk

3.8. HPLC’de Okratoksin A Analizi Parametreleri

a) Temel metot

Analitik Kolon: Cronusil-S ODS2 5 µm 25 cm x 0,46 cm

Mobil faz: 51/47/2 Asetonitril: Su: Asetik asit

Akış hızı: 1 mL/dk

Floresans dedektör: Eksitasyon: 333 nm, Emisyon: 460 nm

Kolon sıcaklığı: 35°C

Enjeksiyon hacmi: 100 µL

Analiz süresi: 9 dk

b) Modifiye metot

Analitik Kolon: Cronusil-S ODS2 5 µm 25 cm x 0.46 cm

Mobil faz: 68,5/ 29/ 2,5 Metanol: Su: Asetik asit

Akış hızı: 1 mL/dk

Floresans dedektör: Eksitasyon: 333 nm, Emisyon: 460 nm

Kolon sıcaklığı: 45°C

Enjeksiyon hacmi: 100 µL

Analiz süresi: 7,5 dk

3.9. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

3.9.1. Aflatoksin Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Kalibrasyon çalışması için standartlar 8 farklı konsantrasyonda (0,08, 0,14, 0,5, 1,25, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 ng/mL) hazırlandı, ardından 3'er tekrarlı olarak cihaza enjekte edilerek eğim hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4'de verildi.

3.9.2. Okratoksin A Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Kalibrasyon çalışması için standartlar 8 farklı konsantrasyonda (0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,5, 5,0, 10,0 ng/mL) hazırlandı, ardından 3'er tekrarlı olarak cihaza enjekte edilerek eğim hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4'de verildi.

3.10. Aflatoksin ve Okratoksin A Analiz Yöntemlerinin Validasyonu

Validasyon çalışmalarında aflatoksin analizi için yulaf ezmesi örneği, okratoksin A analizi için buğday unu örneği seçildi. Aflatoksin ve okratoksin A analizleri, ekstraksiyon aşaması ve elüsyon aşaması olmak üzere iki aşamada yapıldı. Uygun

çözücüyle (metanol) ekstre edilen gıda örnekleri filtre kağıdından süzüldü. Süzüntüden belirli miktarlarda alınıp su ile seyreltme yapıldı. Seyreltilmiş filtrat immunoafinite kolondan geçirildi. Filtratın tamamı geçtikten sonra kolon su ile 2 kez yıkandı. Aflatoksinler kolondan metanolle elüe edildi. Okratoksinler ise kolondan asetik asit: metanol ile elüe edildi. Elüatlar HPLC'ye enjekte edildi. Aflatoksinlerin daha yüksek duyarlılıkla tayin edilebilmeleri için bromla kolon sonrası türevlendirme yapıldı. Modifiye edilip validasyonu yapılan metotların ekstraksiyon ve elüsyon aşamalarına ait semalar Şekil 3-2, 3-3, 3-4 ve 3-5'de gösterilmektedir.

Yöntemlerin validasyonu için EURACHEM GUIDE'da belirlenen parametreler incelendi.

3.10.1. Gözlenebilme (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüllerle hesaplandı. Tayin limiti için kör örnekler standart ile zenginleştirildi. Zenginleştirilmiş kör ile 2 analist tarafından 10 defa bağımsız çalışma yapılarak ölçümlerin ortalaması ve standart sapması hesaplandı.

$$\text{Gözlenebilme limiti (LOD)} = C + 3SD$$

$$\text{Tayin limiti (LOQ)} = C + 10 SD$$

$$C = \text{Konsantrasyon} \quad SD = \text{Standart sapma}$$

Hesaplanan değerler Bölüm 4'de verildi.

3.10.2. Doğruluk

Doğruluk için gerçeklik çalışması yapıldı. İki analist tarafından standart katılmış örneklerle bağımsız çalışmalar yapıldı. Sonuçlar ve hesaplanan % bağıl hatalar aflatoksin ve okratoksin A için ayrı ayrı Bölüm 4'te verildi.

3.10.3. Kesinlik

3.10.3.1. Tekrar edilebilirlik

Tekrar edilebilirlik için 2 analist tarafından standart katılmış numune ile 6 bağımsız çalışma yapıldı. Sonuçlar ve hesaplanan RSD'ler Bölüm 4'de verildi.

3.10.3.2. Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik için standart katılmış örneklerle 6 defa çalışılarak analistler arası sonuçlar aynı laboratuvar ve aynı ekipman kullanılarak karşılaştırıldı (Bölüm 4).

3.10.3.3. Tekrar üretilebilirlik limiti

Tekrarlanabilirlik limiti aynı laboratuvarında her iki analist tarafından aşağıdaki eşitlikle hesaplandı:

$$R = 2,83 \times sR$$

3.10.4. Geri kazanım

İki analist tarafından numunelere iki seviye olmak üzere standart katılarak yapıldı. 5 gün boyunca sabah akşam ikişer enjeksiyon olarak çalışıldı. Sonuçlar ve hesaplanan % geri kazanım, RSD değerleri Bölüm 4’de verildi.

3.10.5. Uygunluk testi

Uygunluk testi için önemli parametreler retansiyon zamanı (t_R), kapasite faktörü (k'), kuyruklanma faktörü (T) ve teorik plato sayısı (N) değerlendirildi. Sonuçlar Tablo 4-45’te verildi.

3.11. Modifiye Edilen Yöntemle Aflatoksin Miktar Tayini

Kalibrasyon çözeltileri ile çizilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak örneklerdeki aflatoksin miktarı (A), pik alanlarından yararlanarak $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak bulundu, seyreltme faktörü ile çarpılarak sonuç verildi.

$$\text{Sonuç } (\mu\text{g}/\text{kg}) = A \times SF$$

A: Numunenin kalibrasyon eğrisine göre miktarı ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

SF: Seyreltme faktörü = 2

3.12. Modifiye Edilen Yöntemle Okratoksin A Miktar Tayini

Kalibrasyon çözeltileri ile çizilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak örneklerdeki okratoksin A miktarı (A), pik alanlarından yararlanarak $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak bulundu, seyreltme faktörü ile çarpılarak sonuç verildi.

$$\text{Sonuç } (\mu\text{g}/\text{kg}) = A \times SF$$

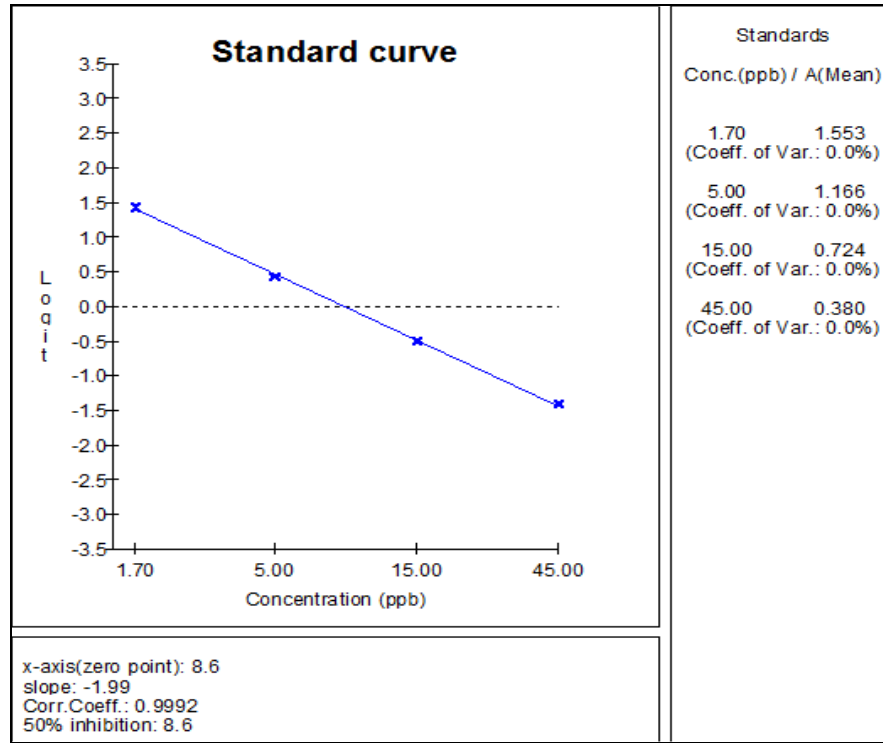
A: Numunenin kalibrasyon eğrisine göre miktarı ($\mu\text{g}/\text{kg}$),

SF: Seyreltme faktörü = 3

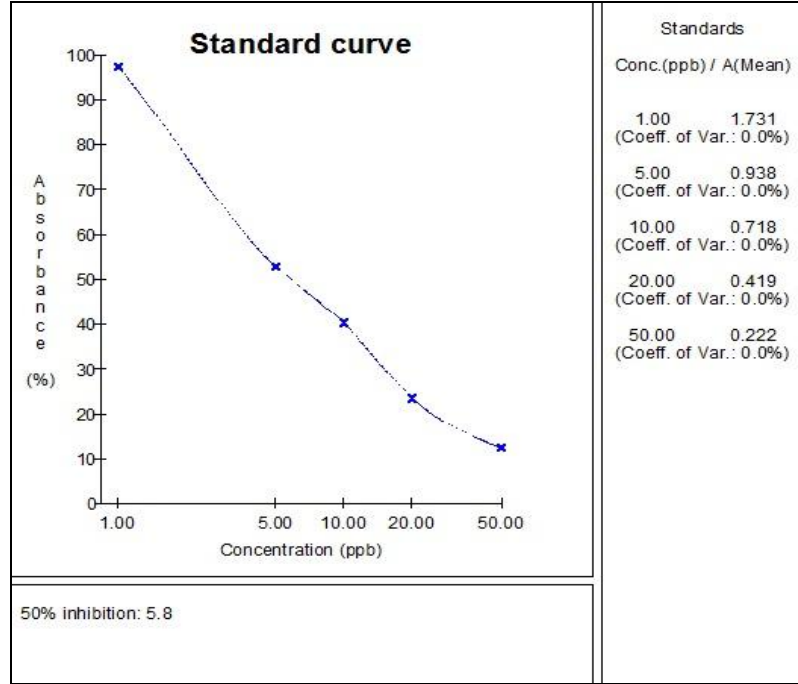
4. BULGULAR

4.1. ELISA Testi Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

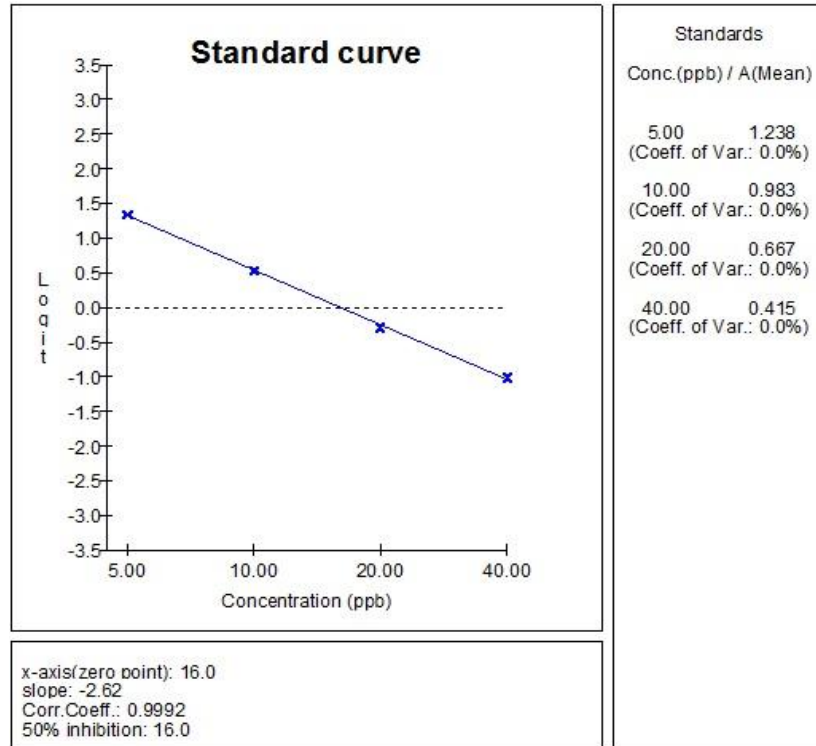
ELISA test kitlerinin yanında bulunan kullanıma hazır değişik konsantrasyonlardaki standartlar 450 nm absorbansta ELISA reader cihazında okutuldu. Sonuçlar RIDAWin bilgisayar programında değerlendirilerek kalibrasyon eğrileri çizdirildi. Toplam Aflatoksin, Aflatoksin B1, ve okratoksin A ölçümlerine ait kalibrasyon eğrileri Şekil 4-1, 4-2, 4-3'de verildi.



Şekil 4-1: ELISA yöntemi toplam aflatoksin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-2: ELISA yöntemi aflatoxin B1 kalibrasyon eğrisi



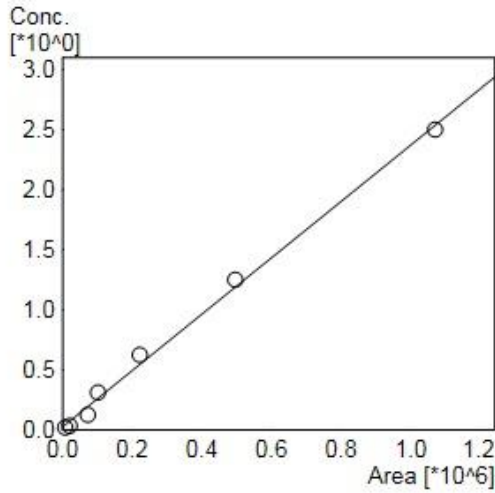
Şekil 4-3: ELISA yöntemi okratoksin A kalibrasyon eğrisi

4.2. Aflatoksin Tayininde Kullanılan Temel Metodun Validasyonu

4.2.1. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Farklı konsantrasyonlarda aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 içeren standart çözeltiler hazırlanarak kolon sonrası türevlendirme ile ve floresans dedektör ile tayin edilmesi neticesinde aflatoksin bileşenlerine ait pik alan değerleri Şekil 4-4, 4-5 4-6, 4-7'de verildi.

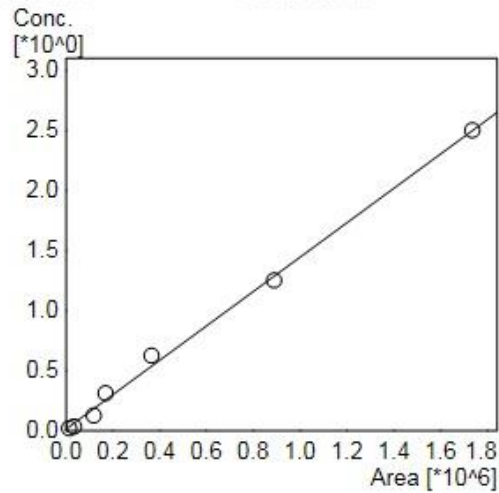
Name : Aflatoksin B1
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=2.35e-006*x+0.0270917$
 Rr1=0.9979232 Rr2=0.9958507
 MeanRF:2.40332e-006 RFSD:5.27199e-007 RFRSD:21.9363
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.020	7493.7	7494
		7584.2	7584
		7709.0	7709
2	0.035	20590.1	20590
		20888.1	20888
		20903.7	20904
3	0.125	73504.7	73505
		72463.2	72463
		71925.4	71925
4	0.313	101803.2	101803
		100789.4	100789
		103291.7	103292
5	0.625	221389.3	221389
		221728.1	221728
		221989.8	221990
6	1.250	488825.2	488825
		489277.4	489277
		510753.3	510753
8	2.500	1069608.7	1069609

Şekil 4-4: Aflatoksin B1 kalibrasyon eğrisi

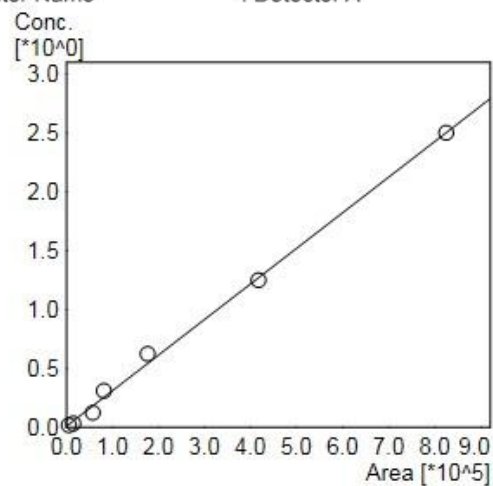
Name : Aflatoksin B2
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=1.4323e-006*x+0.0149947$
 Rr1=0.9983039 Rr2=0.9966106
 MeanRF:1.41993e-006 RFSD:3.12715e-007 RFRSD:22.0233
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.020	13439.4	13439
		13080.0	13080
		13729.2	13729
2	0.035	34425.4	34425
		34914.4	34914
		35288.5	35289
3	0.125	120153.8	120154
		119895.4	119895
		117028.9	117029
4	0.313	169019.3	169019
		167374.1	167374
		169863.5	169863
5	0.625	365726.5	365727
		365910.5	365910
		365757.0	365757
6	1.250	881388.1	881388
		882033.8	882034
		902876.9	902877
8	2.500	1734452.6	1734453

Şekil 4-5: Aflatoksin B2 kalibrasyon eğrisi

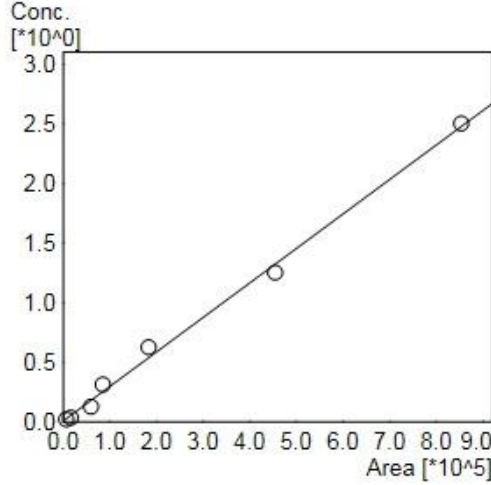
Name : Aflatoksin G1
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=3.02035e-006*x+0.0140822$
 Rr1=0.9985689 Rr2=0.9971399
 MeanRF:3.04001e-006 RFSD:6.2724e-007 RFRSD:20.6329
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.020	5616.7	5617
		5787.7	5788
		6130.3	6130
2	0.035	15416.2	15416
		15071.4	15071
		15331.6	15332
3	0.125	57678.9	57679
		58181.6	58182
		57428.3	57428
4	0.313	81830.3	81830
		81177.9	81178
		82085.4	82085
5	0.625	176849.9	176850
		176522.1	176522
		176374.2	176374
6	1.250	415083.5	415084
		416269.8	416270
		420395.3	420395
8	2.500	824520.6	824521

Şekil 4-6: Aflatoksin G1 kalibrasyon eğrisi

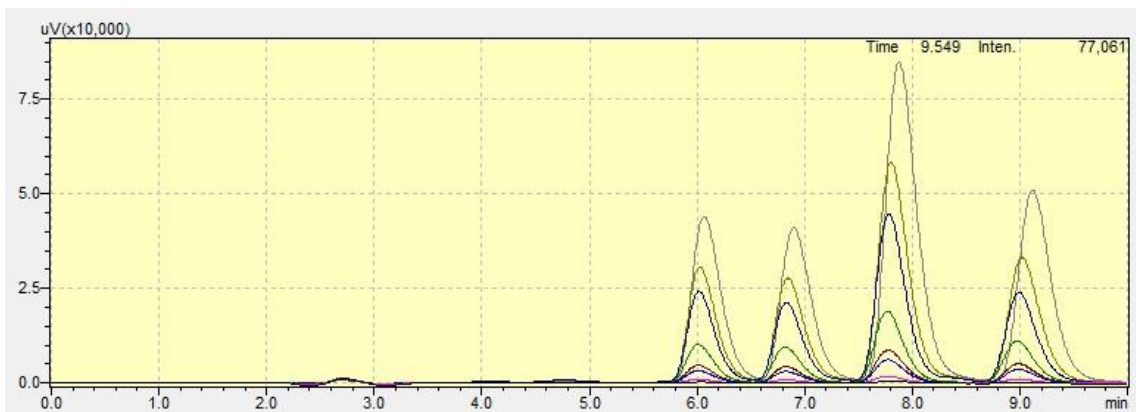
Name : Aflatoksin G2
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=2.89395e-006*x+0.0090314$
 Rr1=0.9979070 Rr2=0.9958184
 MeanRF:2.84351e-006 RFSD:6.03755e-007 RFRSD:21.2327
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.020	6702.3	6702
		6484.9	6485
		6731.6	6732
2	0.035	16737.8	16738
		16441.9	16442
		16705.6	16706
3	0.125	59740.0	59740
		60448.5	60449
		60135.4	60135
4	0.313	85054.6	85055
		84982.7	84983
		84955.6	84956
5	0.625	183559.4	183559
		183290.7	183291
		182996.2	182996
6	1.250	453333.7	453334
		455795.1	455795
		455307.0	455307
8	2.500	853641.2	853641

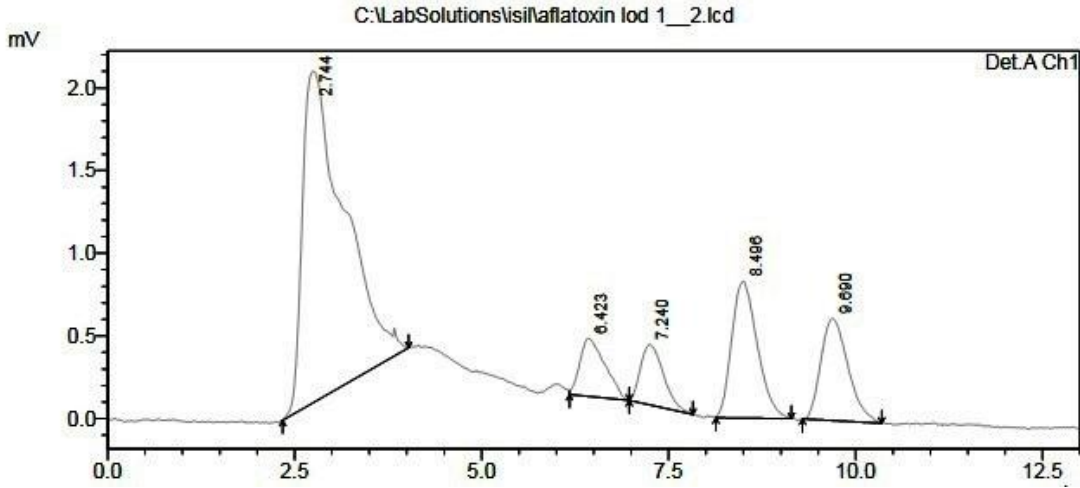
Şekil 4-7: Aflatoksin G2 kalibrasyon eğrisi

Şekil 4-4, 4-5, 4-6, 4-7’de verilen kalibrasyon grafikleri değerlendirildiğinde, çalışılan konsantrasyon aralıklarında lineer kalibrasyon eşitlikleri elde edildiği görülmektedir. Elde edilen eşitliklerin korelasyon katsayısı değerleri de bunu doğrulamaktadır. En düşük konsantrasyonlardaki ve en yüksek standart karışımı için alınan kromatogram Şekil 4-8’de verildi.



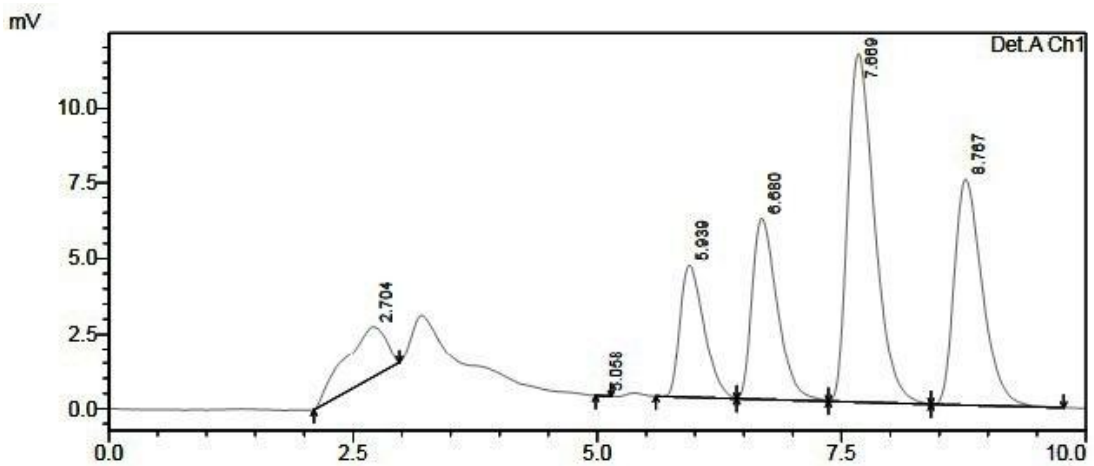
Şekil 4-8: Temel Aflatoksin metodu kalibrasyon verilerine ait kromatogram

Metodun tayin limiti ve gözlenebilme sınırının hesaplanabilmesi için içerisinde aflatoksin içermeyen kör örneğe S/N (sinyal/gürültü)'in en düşük olduğu konsantrasyona kadar standart katılarak yapıldı ve Bölüm 3'de anlatıldığı gibi hesaplama yapılarak LOD değeri bulundu.



Şekil 4-9: Temel toplam Aflatoksin metodu LOD kromatogramı

Temiz (kör) un numunesine standart katılarak geri kazanım değerleri % olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmasına ait kromatogram Şekil 4-10'da gösterilmektedir.



Şekil 4-10: Temel toplam Aflatoksin geri kazanım kromatogramı

Tablo 4-1: Temel toplam Aflatoksin metodu LOD ve LOQ değerleri

1. Analist	Aflatoksin B1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Toplam Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Numune sayısı	1.çalışma	2. çalışma	ortalama	1.çalışma	2. çalışma	ortalama
1		0,11600	0,12600	0,12100	0,33400	0,36600	0,35000
2		0,10800	0,11600	0,11200	0,30900	0,34400	0,32650
3		0,11600	0,10600	0,11100	0,28600	0,27100	0,27850
4		0,11900	0,11300	0,11600	0,31100	0,32200	0,31650
5		0,11300	0,10500	0,10900	0,32000	0,33200	0,32600
ortalama				0,114			0,320
s sapma				0,005			0,026
%RSDr				4,187			8,149
LOD (ort +3 x SD)				0,128			0,398
LOQ (ort + 10 x SD)				0,161			0,580

2. Analist	Aflatoksin B1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Toplam Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Numune sayısı	1.çalışma	2. çalışma	ortalama	1.çalışma	2. çalışma	ortalama
1		0,10600	0,10400	0,10500	0,30400	0,27100	0,28750
2		0,12200	0,11800	0,12000	0,34700	0,33600	0,34150
3		0,12200	0,12200	0,12200	0,35100	0,34200	0,34650
4		0,12700	0,11900	0,12300	0,35300	0,31900	0,33600
5		0,10800	0,10600	0,10700	0,27400	0,27200	0,27300
ortalama				0,115			0,317
s sapma				0,009			0,034
%RSDr				7,520			10,745
LOD (ort +3 x SD)				0,141			0,419
LOQ (ort + 10 x SD)				0,202			0,657

Tablo 4-2: Temel Aflatoksin B1metodu geri kazanım çalışması

Aflatoksin B1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)						
1. analist			2. analist			
1. seviye	1.çalışma	2. çalışma	ortalama	1. çalışma	2. çalışma	ortalama
1.GÜN SABAH	1,532	1,538	1,535	1,501	1,305	1,403
1.GÜN AKŞAM	1,304	1,407	1,356	1,516	1,343	1,430
2.GÜN SABAH	1,504	1,362	1,433	1,252	1,367	1,310
2. GÜN AKŞAM	1,559	1,547	1,553	1,529	1,636	1,583
3. GÜN SABAH	1,661	1,626	1,644	1,652	1,630	1,641
3.GÜN AKŞAM	1,448	1,471	1,460	1,549	1,450	1,500
ortalama						1,487
s sapma						0,107
%RSDr						7,225
hedef ppb						2
Geri kazanım%						74
2. seviye						
4. GÜN SABAH	0,737	0,723	0,730	0,709	0,705	0,707
4. GÜN AKŞAM	0,761	0,729	0,745	0,742	0,743	0,743
5.GÜN SABAH	0,720	0,759	0,740	0,750	0,753	0,752
5.GÜN AKŞAM	0,762	0,748	0,755	0,751	0,753	0,752
ortalama						0,740
s sapma						0,016
%RSDr						2,118
hedef ppb						1
Geri kazanım%						74

Tablo 4-3: Temel Aflatoksin B2 metodu geri kazanım çalışması

Aflatoksin B2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)						
1. analist			2. analist			
1. seviye	1.çalışma	2. çalışma	ortalama	1. çalışma	2. çalışma	ortalama
1.GÜN SABAH	1,099	1,182	1,141	1,228	1,148	1,188
1.GÜN AKŞAM	1,327	1,337	1,332	1,316	1,173	1,245
2.GÜN SABAH	1,417	1,415	1,416	1,399	1,502	1,451
2. GÜN AKŞAM	1,321	1,274	1,298	1,180	1,253	1,217
3. GÜN SABAH	1,618	1,574	1,596	1,589	1,597	1,593
3.GÜN AKŞAM	1,595	1,623	1,609	1,683	1,593	1,638
ortalama						1,393
s sapma						0,182
%RSDr						13,046
hedef ppb						2
Geri kazanım%						69,60
2. seviye						
4. GÜN SABAH	0,642	0,643	0,643	0,653	0,667	0,660
4. GÜN AKŞAM	0,647	0,651	0,649	0,656	0,663	0,660
5.GÜN SABAH	0,633	0,666	0,650	0,672	0,683	0,678
5.GÜN AKŞAM	0,674	0,676	0,675	0,672	0,680	0,676
ortalama						0,668
s sapma						0,014
p%RSDr						2,051
hedef ppb						1
Geri kazanım%						67

Tablo 4-4: Temel Aflatoksin G1 metodu geri kazanım çalışması

Aflatoksin G1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)						
	1. analist			2. analist		
	1.çalışma	2. çalışma	ortalama	1. çalışma	2. çalışma	ortalama
1.GÜN SABAH	1,085	1,168	1,127	1,231	1,160	1,196
1.GÜN AKŞAM	1,331	1,353	1,342	1,352	1,204	1,278
2.GÜN SABAH	1,376	1,317	1,347	1,212	1,265	1,239
2. GÜN AKŞAM	1,344	1,285	1,315	1,284	1,554	1,419
3. GÜN SABAH	1,452	1,392	1,422	1,400	1,439	1,420
3.GÜN AKŞAM	1,296	1,344	1,320	1,511	1,277	1,394
ortalama						1,318
s sapma						0,094
%RSDr						7,165
hedef ppb						2
Geri kazanım%						66
2. seviye						
4. GÜN SABAH	0,670	0,651	0,661	0,679	0,698	0,689
4. GÜN AKŞAM	0,628	0,641	0,635	0,658	0,685	0,672
5.GÜN SABAH	0,640	0,683	0,662	0,700	0,702	0,701
5.GÜN AKŞAM	0,688	0,712	0,700	0,698	0,544	0,621
ortalama						0,667
s sapma						0,029
%RSDr						4,377
hedef ppb						1
Geri kazanım%						67

Tablo 4-5: Temel Aflatoksin G2 metodu geri kazanım çalışması

Aflatoksin G2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)						
	1. analist			2. analist		
	1. çalışma	2. çalışma	ortalama	1. çalışma	2. çalışma	ortalama
1.GÜN SABAH	0,888	0,960	0,924	1,083	1,037	1,060
1.GÜN AKŞAM	1,097	1,116	1,107	1,117	1,017	1,067
2.GÜN SABAH	1,135	1,138	1,137	1,038	1,100	1,069
2. GÜN AKŞAM	1,157	1,122	1,140	1,120	1,307	1,214
3. GÜN SABAH	1,322	1,260	1,291	1,274	1,304	1,289
3.GÜN AKŞAM	1,265	1,295	1,280	1,427	1,242	1,335
ortalama						1,159
s sapma						0,124
%RSDr						10,660
hedef ppb						2,000
Geri kazanım%						57,500
2. seviye						
4. GÜN SABAH	0,482	0,468	0,475	0,499	0,503	0,501
4. GÜN AKŞAM	0,442	0,477	0,460	0,455	0,465	0,460
5.GÜN SABAH	0,432	0,456	0,444	0,480	0,500	0,490
5.GÜN AKŞAM	0,468	0,472	0,470	0,474	0,576	0,525
ortalama						0,478
s sapma						0,026
%RSDr						5,465
hedef ppb						1
Geri kazanım%						48

Tablo 4-6: Temel Aflatoksin B1 metodu doğruluk çalışması

Analist	Aflatoksin B1 Gerçek Değer (µg/kg)	Ortalama Değer (µg/kg)	Sistemik Hata	Bağlı Hata	% Bağlı Hata
1	2	1,497	-0,503	-0,252	-25,150
2	2	1,478	-0,522	-0,261	-26,100

Tablo 4-7: Temel Toplam Aflatoksin Metodu Doğruluk Çalışması

Analist	Toplam Aflatoksin Gerçek Değer (µg/kg)	Ortalama Değer (µg/kg)	Sistemik Hata	Bağlı Hata	% Bağlı Hata
1	8	5,353	-2,647	-0,331	-33,088
2	8	5,362	-2,638	-0,330	-32,975

Tablo 4-8: Temel Aflatoksin B1 Metodu Tekrarlanabilirlik Çalışması (1. Analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	I1.A-2.AI	I1.A-2.AI ²	I1.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	1,532	1,538	1,535	0,006	0,000	UYGUN
2	1,304	1,407	1,356	0,103	0,011	UYGUN
3	1,504	1,362	1,433	0,142	0,020	UYGUN
4	1,559	1,547	1,553	0,012	0,000	UYGUN
5	1,661	1,626	1,644	0,035	0,001	UYGUN
6	1,448	1,471	1,460	0,023	0,001	UYGUN
Ortalama	1,50					
Standart Sapma	0,10					
RSDr	0,07					
%RSDr	6,96					
r : 2,83 × s_r	0,29					
Min.	1,30					
Max.	1,66					
G-low	1,30		Değerlendirme			UYGUN
G-high	1,66		Değerlendirme			UYGUN
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R (Horwitz)	28,11		Değerlendirme			UYGUN
Horrat	0,25					

Tablo 4-9: Temel Aflatoksin B1 metodu tekrarlanabilirlik çalışması (2. Analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2. Analiz (µg/kg)	Ortalama	II.A-2.AI	II.A-2.AI ²	II.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	1,501	1,305	1,403	0,196	0,038	UYGUN
2	1,516	1,343	1,430	0,173	0,030	UYGUN
3	1,252	1,367	1,310	0,115	0,013	UYGUN
4	1,529	1,636	1,583	0,107	0,011	UYGUN
5	1,652	1,630	1,641	0,022	0,000	UYGUN
6	1,549	1,450	1,500	0,099	0,010	UYGUN
Ortalama	1,48					
Standart Sapma	0,13					
RSDr	0,09					
%RSDr	9,13					
r :2,83 × s_r	0,38					
Min.	1,25					
Max.	1,65					
G-low	1,25		Değerlendirme			UYGUN
G-high	1,65		Değerlendirme			UYGUN
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R (Horwitz)	28,16		Değerlendirme			UYGUN
Horrat	0,32					

Tablo 4-10: Temel Toplam Aflatoksin metodu tekrarlanabilirlik çalışması (1. Analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	II.A-2.AI	II.A-2.AI ²	II.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	4,604	4,848	4,726	0,244	0,060	UYGUN
2	5,059	5,213	5,136	0,154	0,024	UYGUN
3	5,432	5,232	5,332	0,200	0,040	UYGUN
4	5,381	5,228	5,305	0,153	0,023	UYGUN
5	6,053	5,852	5,953	0,201	0,040	UYGUN
6	5,604	5,733	5,669	0,129	0,017	UYGUN
Ortalama	5,35					
Standart Sapma	0,42					
RSDr	0,08					
%RSDr	7,78					
r :2,83 × s_r	1,18					
Min.	4,60					
Max.	6,05					
G-low	4,60		Değerlendirme			UYGUN
G-high	6,05		Değerlendirme			UYGUN
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R (Horwitz)	23,20		Değerlendirme			UYGUN
Horrat	0,34					

Tablo 4-11: Temel Toplam Aflatoksin metodu tekrarlanabilirlik çalışması (2. Analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	II.A-2.AI	II.A-2.AI ²	II.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	5,043	4,650	4,847	0,393	0,154	UYGUN
2	5,301	4,737	5,019	0,564	0,318	UYGUN
3	4,901	5,234	5,068	0,333	0,111	UYGUN
4	5,113	5,750	5,432	0,637	0,406	UYGUN
5	5,915	5,970	5,943	0,055	0,003	UYGUN
6	6,170	5,562	5,866	0,608	0,370	UYGUN
Ortalama	5,36					
Standart Sapma	0,51					
RSDr	0,09					
%RSDr	9,43					
r :2,83 × s_r	1,43					
Min.	4,65					
Max.	6,17					
G-low	4,65		Değerlendirme			UYGUN
G-high	6,17		Değerlendirme			UYGUN
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R(Horwitz)	23,20		Değerlendirme			UYGUN
Horrat	0,41					

Tablo 4-12: Temel Aflatoksin B1metodu tekrar üretilebilirlik çalışması

Tekrar Sayısı	1.Analist:X1	2.Analist:X2	(X1-X2 / Xi) ²
1	1,535	1,403	0,00048400
2	1,356	1,430	0,00015211
3	1,433	1,310	0,00042367
4	1,553	1,583	0,00002417
5	1,644	1,641	0,00000017
6	1,460	1,500	0,00004444
Toplam			0,00112858
RSD_R=√∑ [(X1-X2)/Xi]² /2n			0,00969784

Tablo 4-13: Temel toplam Aflatoksin metodu tekrar üretilebilirlik çalışması

Tekrar Sayısı	1.Analist:X1	2.Analist:X2	$(X1-X2 / Xi)^2$
1	4,726	4,847	0,00040334
2	5,136	5,019	0,00038025
3	5,332	5,068	0,00194334
4	5,305	5,432	0,00044803
5	5,953	5,943	0,00000278
6	5,669	5,866	0,00108351
Toplam			0,00426124
RSD_R=$\sqrt{\sum [(X1-X2)/Xi]^2}$ /2n			0,01884419

Tablo 4-14: Temel Aflatoksin B1metodu tekrar üretilebilirlik limiti çalışması

Tekrar Sayısı	1.Analist:X1	2.Analist:X2	X1- X2	$ X1-X2 \leq R$	Değerlendirme
1	1,53500	1,40300	0,13200	0,13200	olumlu
2	1,35550	1,42950	-0,07400	0,07400	olumlu
3	1,43300	1,30950	0,12350	0,12350	olumlu
4	1,55300	1,58250	-0,02950	0,02950	olumlu
5	1,64350	1,64100	0,00250	0,00250	olumlu
6	1,45950	1,49950	-0,04000	0,04000	olumlu
Standart sapma	0,107440355				
R :2,83 × sR	0,304056205				

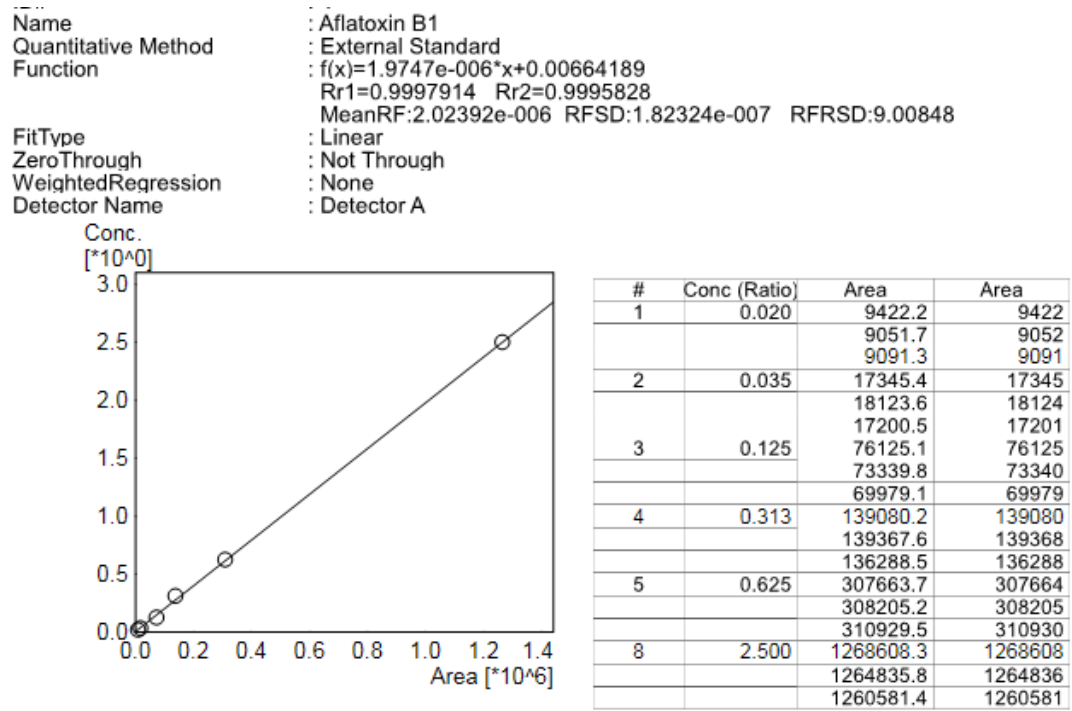
Tablo 4-15: Temel Toplam Aflatoksin metodu tekrar üretilebilirlik limiti çalışması

Tekrar Sayısı	1.Analist:X1	2.Analist:X2	X1- X2	$ X1-X2 \leq R$	Değerlendirme
1	4,72600	4,84650	-0,12050	0,12050	olumlu
2	5,13600	5,01900	0,11700	0,11700	olumlu
3	5,33200	5,06750	0,26450	0,26450	olumlu
4	5,30450	5,43150	-0,12700	0,12700	olumlu
5	5,95250	5,94250	0,01000	0,01000	olumlu
6	5,66850	5,86600	-0,19750	0,19750	olumlu
Standart sapma	0,422991052				
R :2,83 × sR	1,197064677				

4.3. Aflatoksin Tayini İçin Modifiye Edilen Metodun Validasyonu

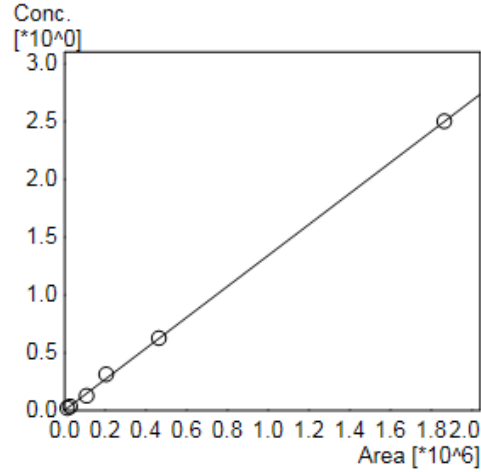
Aflatoksin tayinlerinde hassasiyeti arttırmak, pikleri birbirinden daha iyi ayırmak, daha kısa zamanda ve daha az maliyetli analizler yapabilmek için metod modifiye edildi. Bu amaçla örnek ön hazırlama aşamasında ekstraksiyon çözücüsünde, filtrat seyreltmede kullanılan çözücüde, mobil faz bileşiminde, kolon sıcaklığında değişiklikler yapıldı.

Aflatoksin B1, B2, G1, G2 tayini için çeşitli parametrelerin değiştirilmesi ile belirlenen modifiye metodun kalibrasyon eğrileri Şekil 4-11, 4-12, 4-13, 4-14'de verildi.



Şekil 4-11: Modifiye Aflatoksin B1 metodu kalibrasyon eğrisi

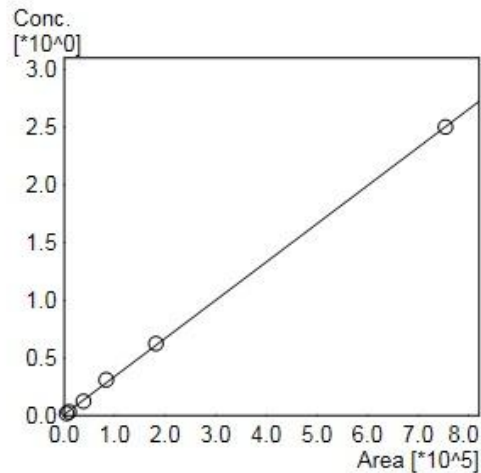
Name : Aflatoxin B2
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=1.33944e-006*x+0.00393259$
 Rr1=0.9997987 Rr2=0.9995975
 MeanRF:1.34228e-006 RFSD:1.16419e-007 RFRSD:8.67327
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.020	14292.1	14292
		14570.6	14571
		14388.4	14388
2	0.035	27047.5	27047
		27129.3	27129
		27043.4	27043
3	0.125	112980.2	112980
		108742.9	108743
		103182.6	103183
4	0.313	205845.4	205845
		204996.1	204996
		201956.0	201956
5	0.625	460613.5	460614
		461614.0	461614
		469391.8	469392
8	2.500	1870374.6	1870375
		1865231.5	1865231
		1860043.8	1860044

Şekil 4-12: Modifiye Aflatoxin B2 metodu kalibrasyon eğrisi

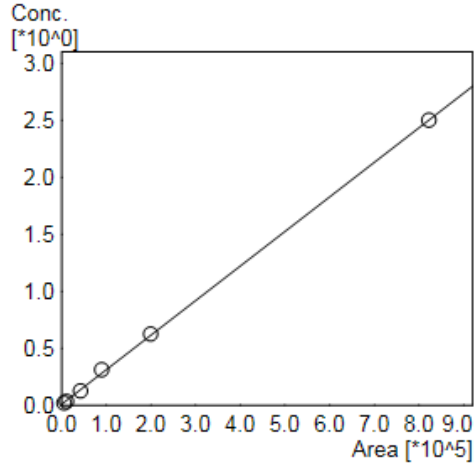
Name : Aflatoxin G1
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=3.30819e-006*x+0.0117839$
 Rr1=0.9998708 Rr2=0.9997416
 MeanRF:3.51104e-006 RFSD:2.29673e-007 RFRSD:6.54143
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.020	5041.6	5042
		5143.6	5144
		5477.5	5477
2	0.035	10536.7	10537
		9862.0	9862
		9986.4	9986
3	0.125	38732.4	38732
		38469.0	38469
		37756.6	37757
4	0.313	84257.1	84257
		83146.3	83146
		82876.2	82876
5	0.625	179449.9	179450
		179591.8	179592
		185080.7	185081
8	2.500	754996.0	754996
		753934.9	753935
		752036.6	752037

Şekil 4-13: Modifiye Aflatoxin G1 metodu kalibrasyon eğrisi

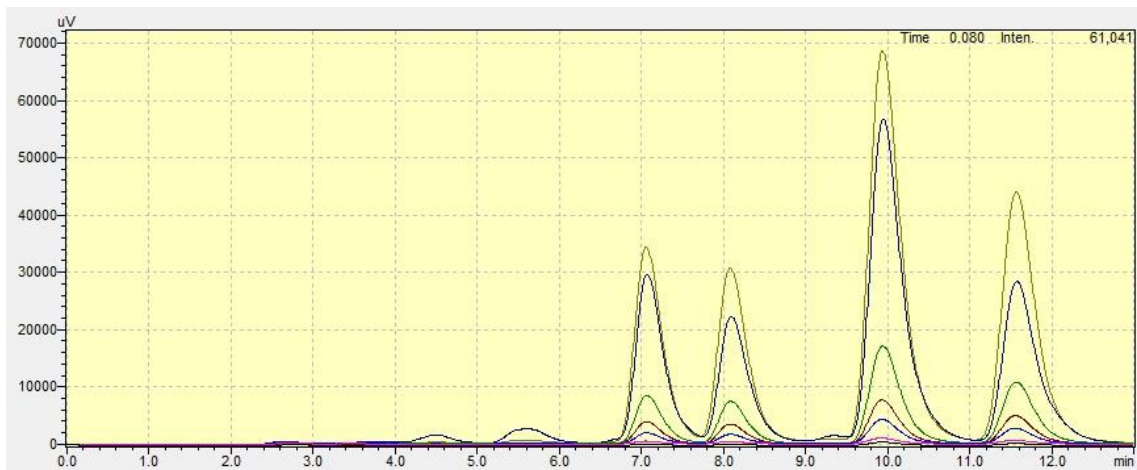
Name : Aflatoxin G2
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=3.0326e-006*x+0.0107589$
 Rr1=0.9998546 Rr2=0.9997093
 MeanRF:3.17342e-006 RFSD:1.98458e-007 RFRSD:6.25376
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.020	5809.1	5809
		5943.3	5943
		6186.9	6187
2	0.035	11808.3	11808
		10809.4	10809
		11199.1	11199
3	0.125	43686.8	43687
		42539.6	42540
		41422.1	41422
4	0.313	91352.3	91352
		89413.5	89414
		89294.1	89294
5	0.625	199040.4	199040
		198990.1	198990
		200381.0	200381
8	2.500	824175.4	824175
		822445.6	822446
		820256.9	820257

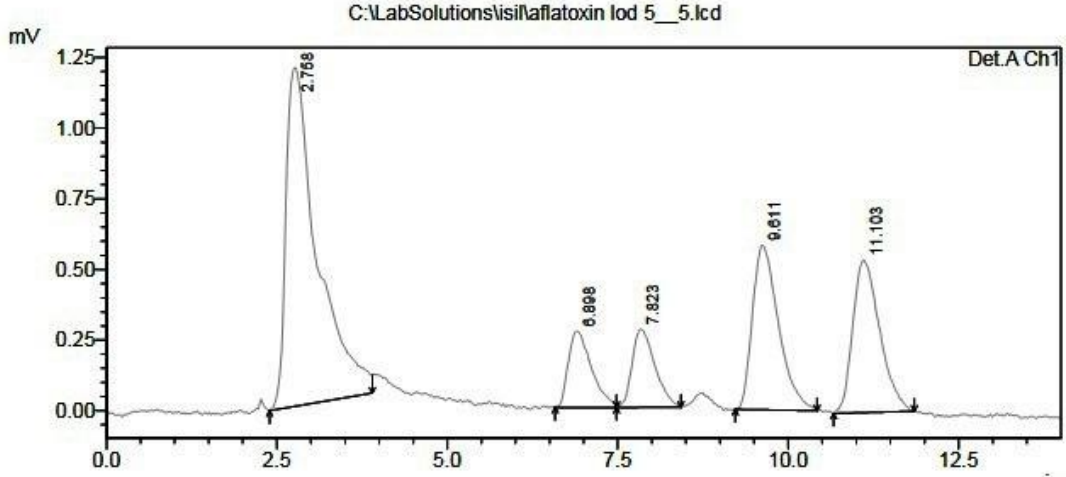
Şekil 4-14: Modifiye Aflatoxin G2 metodu kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon grafikleri dikkate alındığında, çalışılan konsantrasyon aralıklarında lineer kalibrasyon eşitlikleri elde edildiği görülmektedir. Elde edilen eşitliklerin korelasyon katsayısı değerleri de bunu doğrulamaktadır. Sunulan verilerden en düşük konsantrasyonlardaki ve en yüksek standart karışımı için alınan kromatogram Şekil 4-15’de verildi.



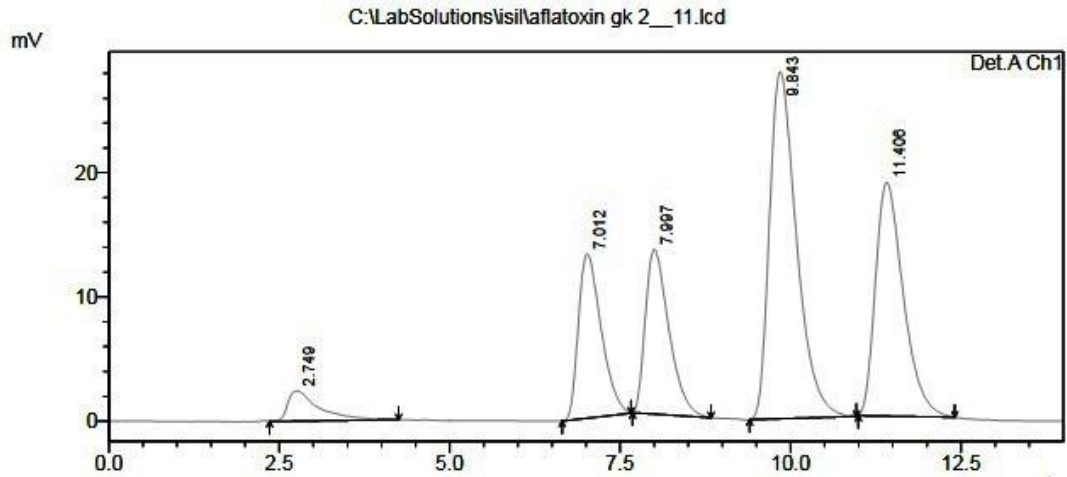
Şekil 4-15: Modifiye Aflatoxin metodu kalibrasyon verilerine ait kromatogram

Metodun tayin limiti ve gözlenebilme sınırının hesaplanabilmesi için içerisinde aflatoksin içermeyen temiz (kör) un örneğine S/N (sinyal/gürültü)'nin en düşük olduğu konsantrasyona kadar standart katılarak yapıldı ve Bölüm 3’de anlatıldığı gibi hesaplanarak LOD değeri bulundu.



Şekil 4-16: Modifiye Aflatoksin metodu LOD kromatogramı

Temiz (kör) un numunesine standart katılarak geri kazanım değerleri % olarak hesaplandı. Geri kazanım çalışmasına ait kromatogram Şekil 4-17’de verildi.



Şekil 4-17: Modifiye Aflatoksin metodu geri kazanım çalışması kromatogramı

Tablo 4-16: Modifiye toplam Aflatoksin metodu LOD ve LOQ değerleri

1. Analist	Aflatoksin B1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Toplam Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	1.çalışma	2. Çalışma	ortalama	1.çalışma	2. Çalışma	ortalama
1	0,070	0,07800	0,07800	0,24900	0,27200	0,26050
2	0,07800	0,07900	0,07850	0,28200	0,28500	0,28350
3	0,08300	0,08100	0,08200	0,28800	0,28200	0,28500
4	0,08100	0,07300	0,07700	0,28800	0,26400	0,27600
5	0,07200	0,07500	0,07350	0,26000	0,26800	0,26400
Ortalama			0,078			0,274
s sapma			0,003			0,011
%RSDr			3,925			4,072
LOD (ort +3 x SD)			0,087			0,307
LOQ (ort + 10 x SD)			0,108			0,385

2. Analist	Aflatoksin B1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Toplam Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	1.çalışma	2. Çalışma	ortalama	1.çalışma	2. Çalışma	ortalama
1	0,06700	0,06700	0,06700	0,25100	0,24300	0,24700
2	0,07200	0,07800	0,07500	0,26700	0,28200	0,27450
3	0,08300	0,07700	0,08000	0,28700	0,27000	0,27850
4	0,07600	0,08300	0,07950	0,27200	0,29200	0,28200
5	0,07700	0,07200	0,07450	0,27900	0,261	0,27900
Ortalama			0,075			0,272
s sapma			0,005			0,014
%RSDr			6,951			5,267
LOD (ort +3 x SD)			0,091			0,315
LOQ (ort + 10 x SD)			0,127			0,416

Tablo 4-17: Modifiye metot Aflatoksin B1 geri kazanım çalışması

Aflatoksin B1 (µg/kg)						
1. analist			2. analist			
1. seviye	1.çalışma	2. çalışma	ortalama	1. çalışma	2. çalışma	ortalama
1.GÜN SABAH	2,215	2,182	2,199	2,200	2,193	2,197
1.GÜN AKŞAM	2,203	2,127	2,165	2,178	2,198	2,188
2.GÜN SABAH	2,190	2,114	2,152	2,169	2,199	2,184
2. GÜN AKŞAM	2,194	2,202	2,198	2,217	2,187	2,202
3. GÜN SABAH	2,202	2,196	2,199	2,180	2,196	2,188
3.GÜN AKŞAM	2,220	2,238	2,229	2,266	2,201	2,234
ortalama						2,194
s sapma						0,023
%RSDr						1,037
hedef ppb						2
Geri kazanım%						109
2. seviye						
4. GÜN SABAH	1,287	1,107	1,197	1,257	1,258	1,258
4. GÜN AKŞAM	1,388	1,413	1,401	1,450	1,436	1,443
5.GÜN SABAH	1,332	1,330	1,331	1,312	1,326	1,319
5.GÜN AKŞAM	1,279	1,271	1,275	1,280	1,274	1,277
ortalama						1,313
s sapma						0,079
%RSDr						6,054
hedef ppb						1,25
Geri kazanım%						105

Tablo 4-18: Modifiye metot Aflatoksin B2 geri kazanım çalışması

Aflatoksin B2 (µg/kg)						
1. analist			2. analist			
1. seviye	1.çalışma	2. çalışma	ortalama	1. çalışma	2. çalışma	ortalama
1.GÜN SABAH	1,923	1,891	1,907	1,897	1,894	1,896
1.GÜN AKŞAM	1,905	1,836	1,871	1,880	1,899	1,890
2.GÜN SABAH	1,924	1,908	1,916	2,010	2,183	2,097
2. GÜN AKŞAM	1,901	1,900	1,901	1,915	1,894	1,905
3. GÜN SABAH	2,016	2,013	2,015	1,991	2,021	2,006
3.GÜN AKŞAM	2,002	2,072	2,037	2,097	2,031	2,064
ortalama						1,958
s sapma						0,079
%RSDr						4,042
hedef ppb						2
Geri kazanım%						98,00
2. seviye						
4. GÜN SABAH	0,928	1,047	0,988	1,057	1,048	1,053
4. GÜN AKŞAM	1,225	1,180	1,203	1,212	1,248	1,230
5.GÜN SABAH	1,117	1,126	1,122	1,098	1,110	1,104
5.GÜN AKŞAM	1,104	1,100	1,102	1,106	1,093	1,100
ortalama						1,112
s sapma						0,077
%RSDr						6,927
hedef ppb						1,25
Geri kazanım %						89,70

Tablo 4-19: Modifiye metot Aflatoksin G1 geri kazanım çalışması

Aflatoksin G1 (µg/kg)						
	1. analist			2. analist		
	1.çalışma	2. çalışma	ortalama	1. çalışma	2. çalışma	ortalama
1.GÜN SABAH	2,341	2,315	2,328	2,299	2,297	2,298
1.GÜN AKŞAM	2,344	2,234	2,289	2,269	2,279	2,274
2.GÜN SABAH	2,336	2,287	2,312	2,269	2,332	2,301
2. GÜN AKŞAM	2,340	2,289	2,315	2,355	2,254	2,305
3. GÜN SABAH	2,304	2,365	2,335	2,270	2,363	2,317
3.GÜN AKŞAM	2,318	2,408	2,363	2,435	2,377	2,406
ortalama						2,320
s sapma						0,035
%RSDr						1,528
hedef ppb						2
Geri kazanım%						116
2. seviye						
4. GÜN SABAH	1,323	1,201	1,262	1,329	1,291	1,310
4. GÜN AKŞAM	1,449	1,496	1,473	1,525	1,529	1,527
5.GÜN SABAH	1,425	1,412	1,419	1,395	1,389	1,392
5.GÜN AKŞAM	1,376	1,361	1,369	1,354	1,339	1,347
ortalama						1,387
s sapma						0,086
%RSDr						6,181
hedef ppb						1,25
Geri kazanım%						111,00

Tablo 4-20: Modifiye metot Aflatoksin G2 geri kazanım çalışması

Aflatoksin G2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)						
1. analist			2. analist			
	1.çalışma	2. çalışma	ortalama	1. çalışma	2. çalışma	ortalama
1.GÜN SABAH	1,534	1,509	1,522	1,566	1,510	1,538
1.GÜN AKŞAM	1,525	1,527	1,526	1,493	1,509	1,501
2.GÜN SABAH	1,530	1,576	1,553	1,853	1,875	1,864
2. GÜN AKŞAM	1,519	1,512	1,516	1,528	1,505	1,517
3. GÜN SABAH	1,769	1,753	1,761	1,721	1,773	1,747
3.GÜN AKŞAM	1,727	1,769	1,748	1,932	1,911	1,922
ortalama						1,643
s sapma						0,154
%RSDr						9,4
hedef ppb						2,0
Geri kazanım%						82,0
2. seviye						
4. GÜN SABAH	0,867	0,788	0,828	0,875	0,911	0,893
4. GÜN AKŞAM	1,011	0,971	0,991	0,998	1,044	1,021
5.GÜN SABAH	0,919	0,925	0,922	0,903	0,921	0,912
5.GÜN AKŞAM	0,905	0,902	0,904	0,910	0,918	0,914
ortalama						0,923
s sapma						0,060
%RSDr						6,453
hedef ppb						1,250
Geri kazanım %						74,0

Tablo 4-21: Modifiye Aflatoksin B1 metodu doğruluk çalışmaları

Analist	Aflatoksin B1 Gerçek Değer (ppm)	Ortalama Değer (ppm)	Sistemik Hata	Bağlı Hata	% Bağlı Hata
1	2	2,190	0,190	0,095	9,500
2	2	2,199	0,199	0,099	9,950

Tablo 4-22: Modifiye toplam Aflatoksin metodu doğruluk çalışmaları

Analist	Toplam Aflatoksin Gerçek Değer (ppm)	Ortalama Değer (ppm)	Sistemik Hata	Bağlı Hata	% Bağlı Hata
1	8	8,058	0,058	0,007	0,725
2	8	8,172	0,172	0,022	2,150

Tablo 4-23: Modifiye Aflatoksin B1 metodu tekrarlanabilirlik çalışması (1. Analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	11.A-2.AI	11.A-2.AI ²	11.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	2,215	2,182	2,199	0,033	0,001	UYGUN
2	2,203	2,127	2,165	0,076	0,006	UYGUN
3	2,19	2,114	2,152	0,076	0,006	UYGUN
4	2,194	2,202	2,198	0,008	0,000	UYGUN
5	2,202	2,196	2,199	0,006	0,000	UYGUN
6	2,22	2,238	2,229	0,018	0,000	UYGUN
Ortalama	2,19					
Standart Sapma	0,04					
RSDr	0,02					
%RSDr	1,64					
r : 2,83 × s_r	0,10					
Min.	2,11					
Max.	2,24					
G-low	2,11		Değerlendirme	UYGUN		
G-high	2,24		Değerlendirme	UYGUN		
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R(Horwitz)	26,54		Değerlendirme	UYGUN		
Horrat	0,06					

Tablo 4-24: Modifiye Aflatoksin B1 metodu tekrarlanabilirlik çalışması (2. Analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	I1.A-2.AI	I1.A-2.AI ²	I1.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	2,200	2,193	2,197	0,007	0,000	UYGUN
2	2,178	2,198	2,188	0,020	0,000	UYGUN
3	2,169	2,199	2,184	0,030	0,001	UYGUN
4	2,217	2,187	2,202	0,030	0,001	UYGUN
5	2,180	2,196	2,188	0,016	0,000	UYGUN
6	2,266	2,201	2,234	0,065	0,004	UYGUN
Ortalama	2,20					
Standart Sapma	0,02					
RSDr	0,01					
%RSDr	1,12					
r :2,83 × sr	0,07					
Min.	2,17					
Max.	2,27					
G-low	2,17		Değerlendirme			UYGUN
G-high	2,27		Değerlendirme			UYGUN
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R(Horwitz)	26,53		Değerlendirme			UYGUN
Horrat	0,04					

Tablo 4-25: Modifiye toplam Aflatoksin metodu tekrarlanabilirlik çalışması (1. Analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	I1.A-2.AI	I1.A-2.AI ²	I1.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	8,013	7,897	7,955	0,116	0,013	UYGUN
2	7,977	7,724	7,851	0,253	0,064	UYGUN
3	7,98	7,885	7,933	0,095	0,009	UYGUN
4	7,954	7,903	7,929	0,051	0,003	UYGUN
5	8,291	8,327	8,309	0,036	0,001	UYGUN
6	8,267	8,487	8,377	0,220	0,048	UYGUN
Ortalama	8,06					
Standart Sapma	0,23					
RSDr	0,03					
%RSDr	2,83					
r :2,83 × sr	0,64					
Min.	7,72					
Max.	8,49					
G-low	7,72		Değerlendirme			UYGUN
G-high	8,49		Değerlendirme			UYGUN
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R(Horwitz)	21,82		Değerlendirme			UYGUN
Horrat	0,13					

Tablo 4-26: Modifiye toplam Aflatoksin metodu tekrarlanabilirlik çalışması (2. Analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	II.A-2.AI	II.A-2.AI ²	II.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	7,962	7,894	7,928	0,068	0,005	UYGUN
2	7,82	7,885	7,853	0,065	0,004	UYGUN
3	8,301	8,589	8,445	0,288	0,083	UYGUN
4	8,015	7,84	7,928	0,175	0,031	UYGUN
5	8,162	8,353	8,258	0,191	0,036	UYGUN
6	8,73	8,52	8,625	0,210	0,044	UYGUN
Ortalama	8,17					
Standart Sapma	0,32					
RSDr	0,04					
%RSDr	3,90					
r :2,83 × sr	0,90					
Min.	7,82					
Max.	8,73					
G-low	7,82		Değerlendirme	UYGUN		
G-high	8,73		Değerlendirme	UYGUN		
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R(Horwitz)	21,77		Değerlendirme	UYGUN		
Horrat	0,18					

Tablo 4-27: Modifiye Aflatoksin B1metodu tekrar üretilebilirlik çalışması

Tekrar Sayısı	1.Analizi:X1	2.Analizi:X2	(X1-X2 / Xi) ²
1	2,19900	2,19300	0,00000100
2	2,16500	2,19800	0,00003025
3	2,15200	2,19900	0,00006136
4	2,19800	2,18700	0,00000336
5	2,19900	2,19600	0,00000025
6	2,22900	2,20100	0,00002178
Toplam			0,00011800
RSD_R=√Σ [(X1-X2)/Xi]² /2n			0,00313581

Tablo 4-28: Modifiye toplam Aflatoksin metodu tekrar üretilebilirlik çalışması

Tekrar Sayısı	1.Analist:X1	2.Analist:X2	$(X1-X2 / Xi)^2$
1	7,95500	7,92800	0,00000729
2	7,85050	7,85250	0,00000004
3	7,93250	8,44500	0,00262656
4	7,92850	7,92750	0,00000001
5	8,30900	8,25750	0,00002652
6	8,37700	8,62500	0,00061504
Toplam			0,00327547
$RSD_R = \sqrt{\sum [(X1-X2)/Xi]^2 / 2n}$			0,01652136

Tablo 4-29: Modifiye Aflatoksin B1 metodu tekrar üretilebilirlik limiti çalışması

Tekrar Sayısı	1.Analist:X1	2.Analist:X2	X1- X2	$ X1-X2 \leq R$	Değerlendirme
1	2,19900	2,19300	0,00600	0,00600	olumlu
2	2,16500	2,19800	-0,03300	0,03300	olumlu
3	2,15200	2,19900	-0,04700	0,04700	olumlu
4	2,19800	2,18700	0,01100	0,01100	olumlu
5	2,19900	2,19600	0,00300	0,00300	olumlu
6	2,22900	2,20100	0,02800	0,02800	olumlu
Standart sapma	0,019135878				
R :2,83 × sR	0,054154534				

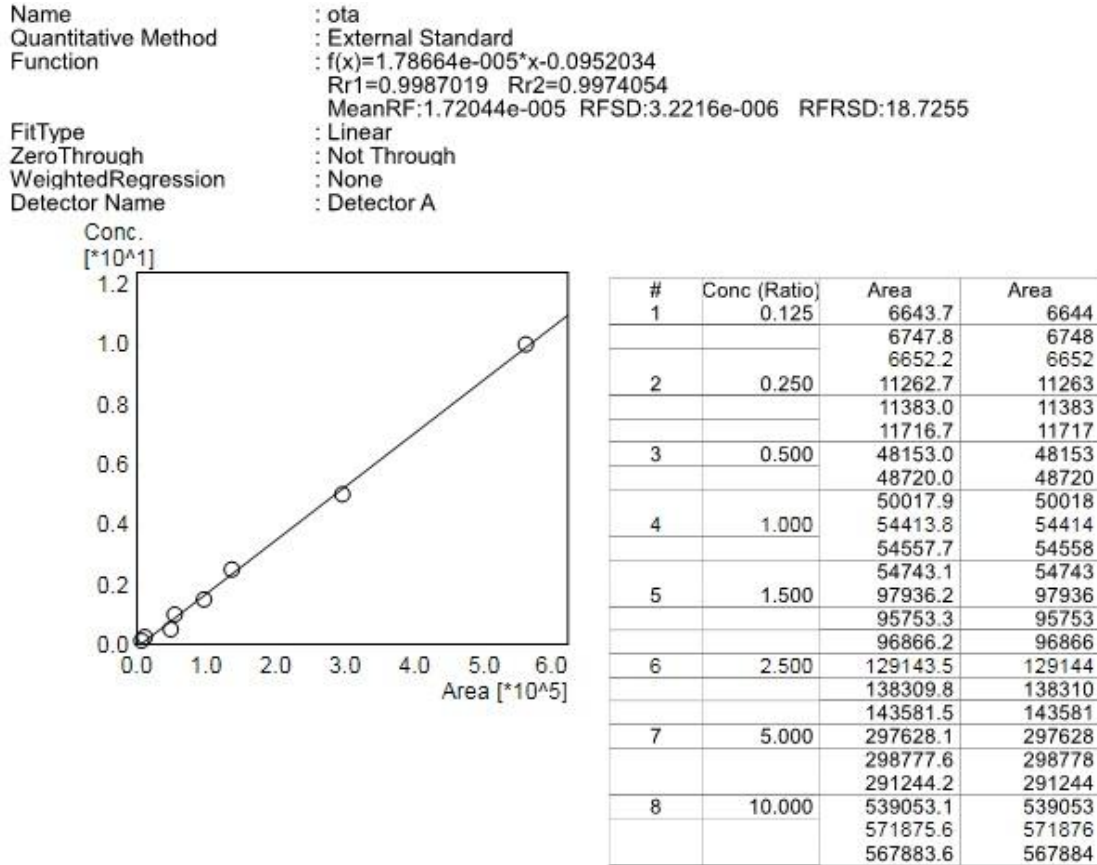
Tablo 4-30: Modifiye toplam Aflatoksin metodu tekrar üretilebilirlik limiti çalışması

Tekrar Sayısı	1.Analist:X1	2.Analist:X2	X1- X2	$ X1-X2 \leq R$	Değerlendirme
1	7,95500	7,92800	0,02700	0,02700	olumlu
2	7,85050	7,85250	-0,00200	0,00200	olumlu
3	7,93250	8,44500	-0,51250	0,51250	olumlu
4	7,92850	7,92750	0,00100	0,00100	olumlu
5	8,30900	8,25750	0,05150	0,05150	olumlu
6	8,37700	8,62500	-0,24800	0,24800	olumlu
Standart sapma	0,269386705				
R :2,83 × sR	0,762364376				

4.4. Okratoksin A Tayini İçin Kullanılan Temel Metodun Validasyonu

4.4.1. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Farklı konsantrasyonlarda okratoksin A içeren standart çözeltiler hazırlanarak cihazda görülen pik alan değerleri Şekil 4-18'de verildi.



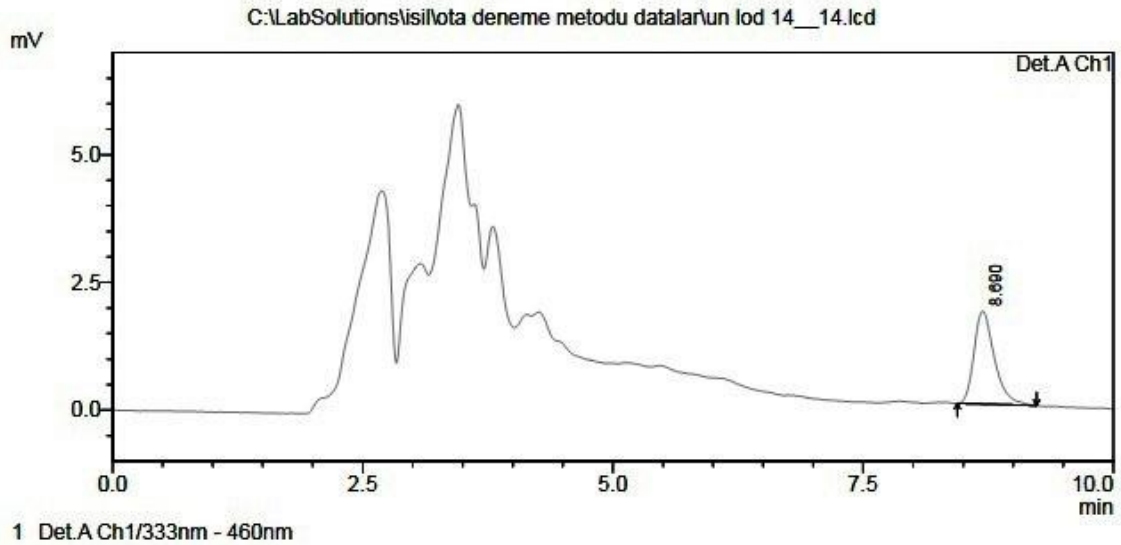
Şekil 4-18: Okratoksin A kalibrasyon eğrisi

Şekil 4-18'de verilen kalibrasyon grafiği dikkate alındığında, çalışılan konsantrasyon aralıklarında lineer kalibrasyon eşitliği elde edildiği görülmektedir. Elde edilen eşitliğin korelasyon katsayısı değeri de bunu doğrulamaktadır. Şekil 4-18'de sunulan verilerden en düşük konsantrasyonlardaki ve en yüksek standart karışımı için alınan kromatogram Şekil 4-19'da verildi.



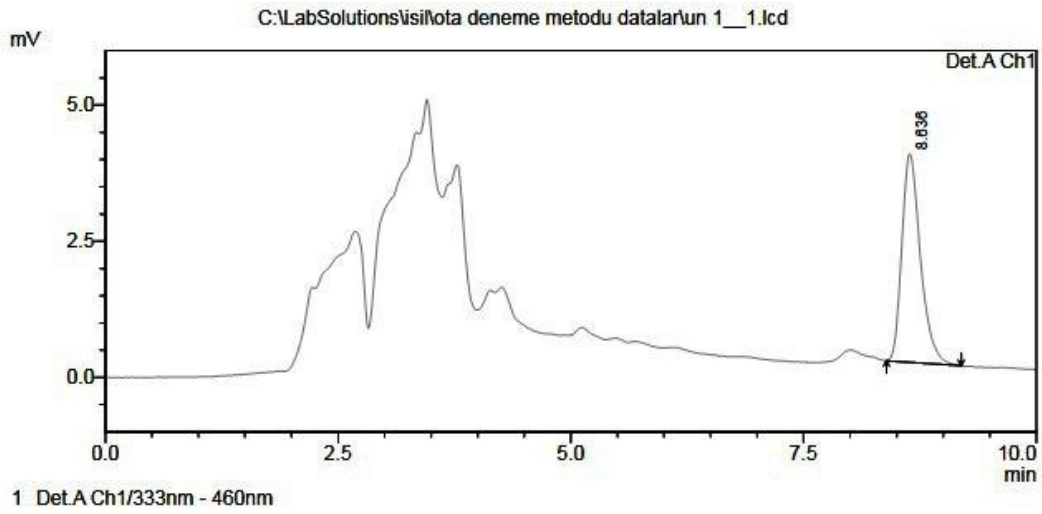
Şekil 4-19: Temel Okratoksin A metodu kalibrasyon verilerine ait kromatogram

Metodun tayin limiti ve gözlenebilirme sınırının hesaplanabilmesi için içerisinde okratoksin A içermeyen temiz (kör) örneğe S/N (sinyal/gürültü)'nin en düşük olduğu konsantrasyona kadar standart katılarak yapıldı ve Bölüm 3'de anlatıldığı gibi hesaplanarak LOD değeri bulundu.



Şekil 4-20: Temel Okratoksin A metodu LOD çalışması kromatogramı

Temiz (kör) un numunesine okratoksin A standardı katılarak geri kazanım değerleri % olarak hesaplandı. Geri kazanım çalışmasına ait kromatogram Şekil 4-21'de verildi.



Şekil 4-21: Temel Okratoksin A metodu geri kazanım çalışması kromatogramı

Tablo 4-31: Temel Okratoksin A metodu LOD ve LOQ sonuçları ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Tekrar sayısı	1. analist	2. analist
1	0,999	0,934
2	0,969	0,907
3	0,856	1,124
4	0,921	1,079
5	0,862	0,979
6	0,806	0,969
7	0,742	0,957
8	0,838	0,951
9	0,890	0,953
10	0,816	0,891
Ortalama	0,92215	
SD	0,090767067	
LOD(Ort.+ 3SD)	1,194451202	
LOQ(Ort.+ 10SD)	1,829820674	

Tablo 4-32: Temel Okratoksin A metodu geri kazanım çalışması sonuçları (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

1.seviye(8 $\mu\text{g}/\text{kg}$)		
Tekrar sayısı	1. analist	2. analist
1	6,03900	6,15000
2	6,03200	6,10100
3	6,14200	6,15100
4	6,14400	6,15200
5	6,57200	6,74000

2. seviye (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)		
Tekrar Sayısı	1. analist	2. analist
1	2,585	2,631
2	2,566	2,572
3	2,546	2,591
4	2,590	2,566
5	2,463	2,614

6	7,69900	6,93100
7	7,55000	5,87400
8	6,21100	5,76900
9	5,67800	5,73900
10	5,72900	5,72600
11	8,79900	5,734
12	8,55100	5,75900
Ortalama	6,762	6,069
SD	1,098	0,402
%RSD	16,232	6,624
Gerçek değer	8,000	8,000
%Gerikazanım	84,527	75,860

6	2,607	2,586
7	2,045	2,048
8	2,040	2,045
Ortalama	2,43025	2,45663
SD	0,243	0,254
%RSD	10,011	10,340
Gerçek değer	3,0	3,0
%Gerikazanım	81,0	81,9

Tablo 4-33: Temel Okratoksin A metodu doğruluk çalışması sonuçları

Analist	Gerçek Değer (ppm)	Ortalama Değer (ppm)	Sistemik Hata	Bağlı Hata	% Bağlı Hata
1	8	6,762	-1,238	-0,155	-15,473
2	8	6,069	-1,931	-0,241	-24,140

Tablo 4-34: Temel Okratoksin A metodu tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları (1. analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	I1.A-2.AI	I1.A-2.AI ²	I1.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	6,039	6,032	6,036	0,007	0,000	UYGUN
2	6,142	6,144	6,143	0,002	0,000	UYGUN
3	6,572	7,699	7,136	1,127	1,270	UYGUN
4	7,550	6,211	6,881	1,339	1,793	UYGUN
5	5,678	5,729	5,704	0,051	0,003	UYGUN
6	8,799	8,551	8,675	0,248	0,062	UYGUN
Ortalama	6,76					
Standart Sapma	1,10					
RSDr	0,16					
%RSDr	16,23					
r :2,83 × s_r	3,11					
Min.	5,68					
Max.	8,80					
G-low	5,68		Değerlendirme	UYGUN		
G-high	8,80		Değerlendirme	UYGUN DEĞİL		
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R (Horwitz)	22,40		Değerlendirme	UYGUN		
Horrat	0,72					

Tablo 4-35: Temel Okratoksin A metodu tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları (2. analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	I1.A-2.AI	I1.A-2.AI ²	I1.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	6,150	6,101	6,126	0,049	0,002	UYGUN
2	6,151	6,162	6,157	0,011	0,000	UYGUN
3	6,740	6,931	6,836	0,191	0,036	UYGUN
4	5,874	5,769	5,822	0,105	0,011	UYGUN
5	5,739	5,726	5,733	0,013	0,000	UYGUN
6	5,734	5,759	5,747	0,025	0,001	UYGUN
Ortalama	6,07					
Standart Sapma	0,40					
RSDr	0,07					
%RSDr	6,63					
r :2,83 × s_r	1,14					
Min.	5,73					
Max.	6,93					
G-low	5,73		Değerlendirme			UYGUN
G-high	6,93		Değerlendirme			UYGUN
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R(Horwitz)	22,77		Değerlendirme			UYGUN
Horrat	0,29					

Tablo 4-36: Temel Okratoksin A metodu tekrar üretilebilirlik çalışması sonuçları

Tekrar sayısı	1.Analist (X1)	2.Analist (X2)	Ortalama	$((X1-X2)/Ort.)^2$
1	6,039	6,150	6,0945	0,0003
2	6,032	6,101	6,0665	0,0001
3	6,142	6,151	6,1465	0,0000
4	6,144	6,152	6,1480	0,0000
5	6,572	6,740	6,6560	0,0006
6	7,699	6,931	7,3150	0,0110
7	7,550	5,874	6,7120	0,0624
8	6,211	5,769	5,9900	0,0054
9	5,678	5,739	5,7085	0,0001
10	5,729	5,726	5,7275	0,0000
11	8,799	5,734	7,2665	0,1779
12	8,551	5,759	7,1550	0,1523
$\sum((X1-X2)/Ort.)^2$				0,0800
$\sum((X1-X2)/Ort.)^2/2n$				0,0040
$RSD_R = \sqrt{\sum((X1-X2)/Ort.)^2/2n}$				0,0633
%RSD_R				6,3260

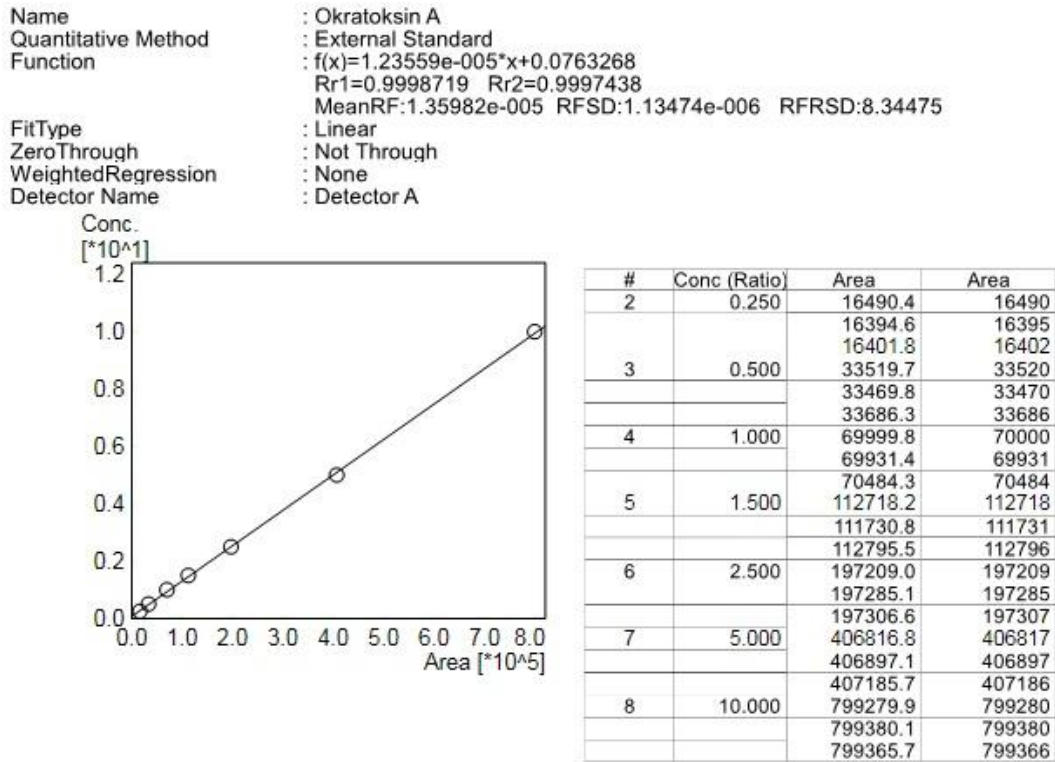
Tablo 4-37: Temel Okratoksin A metodu tekrar üretilebilirlik limiti çalışması sonuçları

Tekrar sayısı	1.Analist(X1)	2.Analist(X2)	X1-X2	Değerlendirme
1	6,039	6,150	0,111	Uygun
2	6,032	6,101	0,069	Uygun
3	6,142	6,151	0,009	Uygun
4	6,144	6,152	0,008	Uygun
5	6,572	6,740	0,168	Uygun
6	7,699	6,931	0,768	Uygun
7	7,550	5,874	1,676	Uygun
8	6,211	5,769	0,442	Uygun
9	5,678	5,739	0,061	Uygun
10	5,729	5,726	0,003	Uygun
11	8,799	5,734	3,065	Uygun
12	8,551	5,759	2,792	Uygun
S_R	0,88254203			
$R : 2,83 \times s_R$	2,497593945			

4.5. Okratoksin A Tayini İçin Modifiye Edilen Metodun Validasyonu

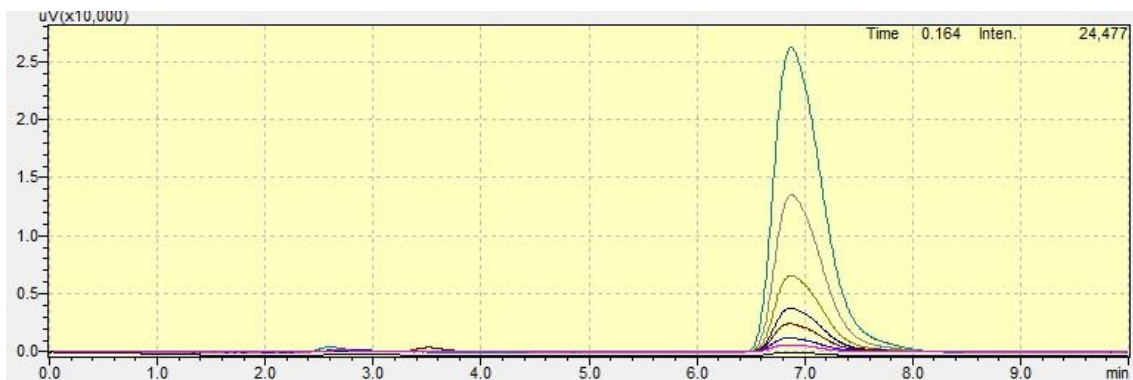
Okratoksin A tayinlerinde hassasiyeti arttırmak, matriks kaynaklı pikleri en aza indirmek, daha kısa zamanda ve daha az maliyetli analizler yapabilmek amacıyla metod modifiye edildi. Bu amaçla örnek ön hazırlama aşamasında ekstraksiyon çözücüsünde, filtrat seyreltmede kullanılan çözücüde, mobil faz bileşiminde, kolon sıcaklığında değişiklikler yapıldı.

Kullanılacak metoda ait bütün parametreler çok çeşitli denemelerden sonra belirlenerek kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 4-22).



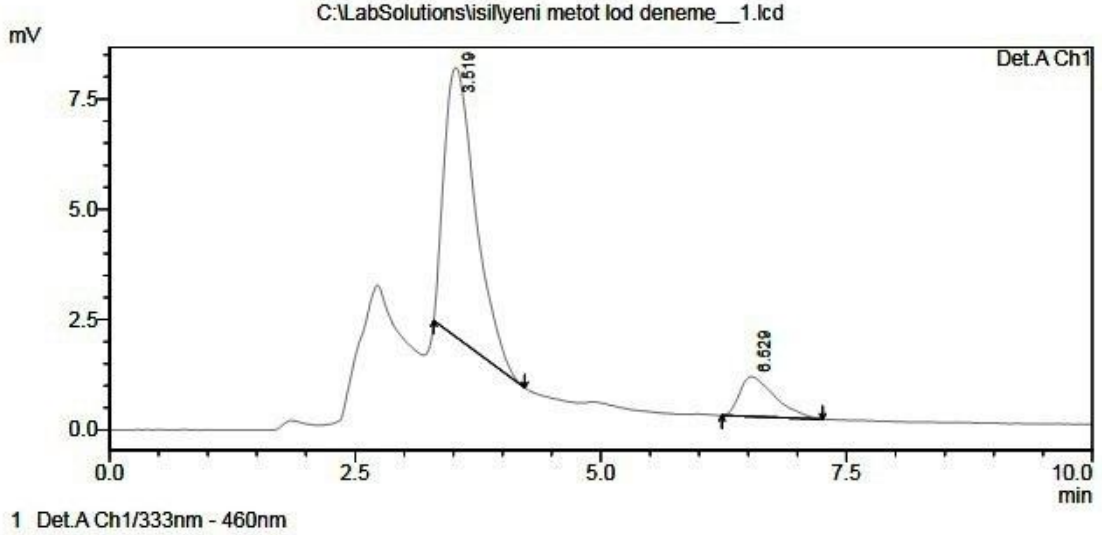
Şekil 4-22: Modifiye Okratoksin A metodu kalibrasyon eğrisi

Şekil 4-22’de verilen kalibrasyon grafiği dikkate alındığında, çalışılan konsantrasyon aralıklarında lineer kalibrasyon eşitlikleri elde edildiği görülmektedir. Elde edilen eşitliklerin korelasyon katsayısı değerleri de bunu doğrulamaktadır. Sunulan verilerden en düşük konsantrasyonlardaki ve en yüksek standart karışımı için alınan kromatogram Şekil 4-23’de verildi.



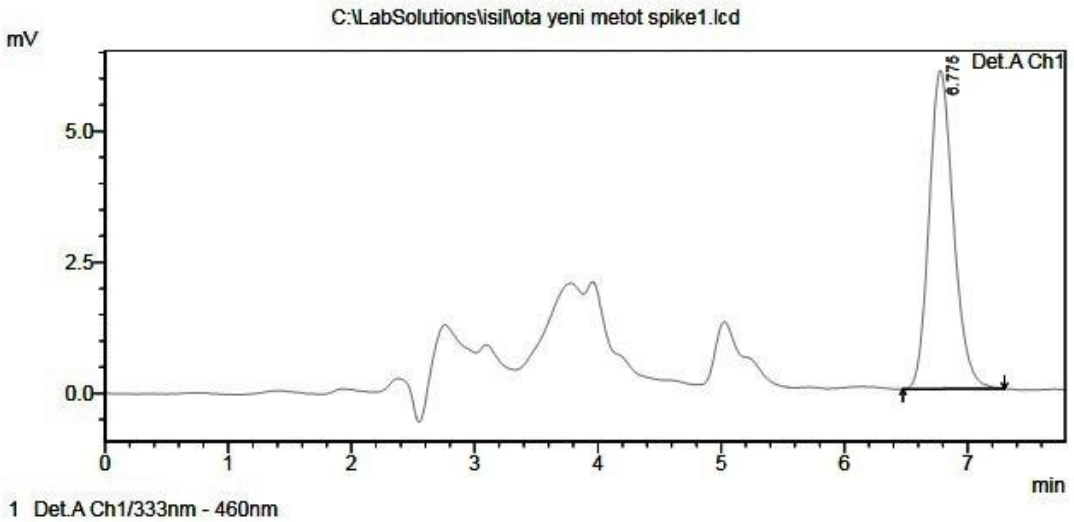
Şekil 4-23: Modifiye Okratoksin A metodu kalibrasyon verilerine ait kromatogram

Metodun tayin limiti ve gözlenebilirlik sınırının hesaplanabilmesi için içerisinde okratoksin A içermeyen temiz (kör) örneğe S/N (sinyal/gürültü)'nin en düşük olduğu konsantrasyona kadar standart katılarak yapıldı ve Bölüm 3'de anlatıldığı gibi hesaplanarak LOD değeri bulundu.



Şekil 4-24: Modifiye Okratoksin A metodu LOD çalışması kromatogramı

Temiz (kör) un numunesine okratoksin A standardı katılarak geri kazanım değerleri % olarak hesaplandı. Geri kazanım çalışmasına ait kromatogram Şekil 4-25'de gösterildi.



Şekil 4-25: Modifiye Okratoksin A metodu geri kazanım çalışması kromatogramı

Tablo 4-38: Modifiye Okratoksin A metodu LOD ve LOQ sonuçları

Tekrar sayısı	1. analist	2. analist
1	0,985	1,100
2	0,970	1,089
3	1,049	1,094
4	1,089	1,049
5	1,075	1,023
6	1,014	1,090
7	0,993	1,096
8	1,091	1,085
9	1,087	1,079
10	1,088	1,083
Ortalama	1,06145	
SD	0,041515343	
LOD(Ort.+ 3SD)	1,085996028	
LOQ(Ort.+ 10SD)	1,476603428	

Tablo 4-39: Modifiye Okratoksin A metodu geri kazanım sonuçları (8 µg/kg ve 3 µg/kg)

1.seviye(8 µg/kg)			2. seviye (3 µg/kg)		
Tekrar sayısı	1. analist	2. analist	Tekrar Sayısı	1. analist	2. analist
1	7,10500	7,53500	1	3,14200	2,77700
2	7,25100	7,44700	2	2,96400	2,79300
3	6,36900	6,29100	3	3,52100	3,32900
4	6,22000	6,17600	4	3,50300	3,57800
5	5,08400	5,18900	5	2,74200	3,25300
6	5,69600	5,23700	6	3,70600	2,57300
7	6,01200	6,18900	7	2,29800	3,41800
8	6,10700	6,30300	8	3,45800	3,03600
9	6,73600	6,72900	Ortalama	3,16675	3,09463
10	6,71400	6,72100	SD	0,477	0,356
11	5,41800	5,864	%RSD	15,055	11,494
12	5,44800	5,33200	Gerçek değer	3,000	3,000
Ortalama	6,180	6,251	%Gerikazanım	105,558	103,154
SD	0,689	0,780			
%RSD	11,147	12,478			
Gerçek değer	8,000	8,000			
%Gerikazanım	77,250	78,139			

Tablo 4-40: Modifiye Okratoksin A metodu doğruluk çalışması sonuçları

Analist	Gerçek Değer (ppb)	Ortalama Değer (ppb)	Sistemik Hata	Bağıl Hata	% Bağıl Hata
1	8	6,180	-1,820	-0,228	-22,750
2	8	6,251	-1,749	-0,219	-21,863

Tablo 4-41: Modifiye Okratoksin A metodu tekrarlanabilirlik sonuçları (1. analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	II.A-2.AI	II.A-2.AI ²	II.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	7,10500	7,25100	7,178	0,146	0,021	UYGUN
2	6,36900	6,22000	6,295	0,149	0,022	UYGUN
3	5,08400	5,69600	5,390	0,612	0,375	UYGUN
4	6,01200	6,10700	6,060	0,095	0,009	UYGUN
5	6,73600	6,71400	6,725	0,022	0,000	UYGUN
6	5,41800	5,44800	5,433	0,030	0,001	UYGUN
Ortalama	6,18					
Standart Sapma	0,69					
RSDr	0,11					
%RSDr	11,15					
r :2,83 × s_r	1,95					
Min.	5,08					
Max.	7,25					
G-low	5,08		Değerlendirme			UYGUN
G-high	7,25		Değerlendirme			UYGUN
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R (Horwitz)	22,71		Değerlendirme			UYGUN
Horrat	0,49					

Tablo 4-42: Modifiye Okratoksin A metodu tekrarlanabilirlik sonuçları (2. analist)

Tekrar Sayısı	1.Analiz (µg/kg)	2.Analiz (µg/kg)	Ortalama	II.A-2.AI	II.A-2.AI ²	II.A-2.AI < r
						Değerlendirme
1	7,535	7,447	7,491	0,088	0,008	UYGUN
2	6,291	6,176	6,234	0,115	0,013	UYGUN
3	5,189	5,237	5,213	0,048	0,002	UYGUN
4	6,189	6,303	6,246	0,114	0,013	UYGUN
5	6,729	6,721	6,725	0,008	0,000	UYGUN
6	5,864	5,332	5,598	0,532	0,283	UYGUN
Ortalama	6,25					
Standart Sapma	0,78					
RSDr	0,12					
%RSDr	12,48					
r :2,83 × s_r	2,21					
Min.	5,19					
Max.	7,54					
G-low	5,19		Değerlendirme			UYGUN
G-high	7,54		Değerlendirme			UYGUN
Grubbs Ölçütü	1,82					
RSD_R(Horwitz)	22,67		Değerlendirme			UYGUN
Horrat	0,55					

Tablo 4-43: Modifiye Okratoksin A metodu tekrar üretilebilirlik sonuçları

Tekrar sayısı	1.Analist (X1)	2.Analist (X2)	Ortalama	$((X1-X2)/Ort.)^2$
1	7,10500	7,53500	7,3200	0,0035
2	7,25100	7,44700	7,3490	0,0007
3	6,36900	6,29100	6,3300	0,0002
4	6,22000	6,17600	6,1980	0,0001
5	5,08400	5,18900	5,1365	0,0004
6	5,69600	5,23700	5,4665	0,0071
7	6,01200	6,18900	6,1005	0,0008
8	6,10700	6,30300	6,2050	0,0010
9	6,73600	6,72900	6,7325	0,0000
10	6,71400	6,72100	6,7175	0,0000
11	5,41800	5,864	5,6410	0,0063
12	5,44800	5,33200	5,3900	0,0005
$\sum((X1-X2)/Ort.)^2$				0,0137
$\sum((X1-X2)/Ort.)^2/2n$				0,0007
$RSD_R = \sqrt{\sum((X1-X2)/Ort.)^2/2n}$				0,0261
%RSD _R				2,6148

Tablo 4-44: Modifiye Okratoksin A metodu tekrar üretilebilirlik limiti sonuçları

Tekrar sayısı	1.Analist(X1)	2.Analist(X2)	X1-X2	Dğerlendirme
1	7,10500	7,53500	0,430	Uygun
2	7,25100	7,44700	0,196	Uygun
3	6,36900	6,29100	0,078	Uygun
4	6,22000	6,17600	0,044	Uygun
5	5,08400	5,18900	0,105	Uygun
6	5,69600	5,23700	0,459	Uygun
7	6,01200	6,18900	0,177	Uygun
8	6,10700	6,30300	0,196	Uygun
9	6,73600	6,72900	0,007	Uygun
10	6,71400	6,72100	0,007	Uygun
11	5,41800	5,864	0,446	Uygun
12	5,44800	5,33200	0,116	Uygun
SR	0,720588164			
R :2,83 × s_R	2,039264505			

4.6. Modifiye Toplam Aflatoksin ve Okratoksin A Metotları Uygunluk parametreleri

Uygunluk parametreleri sonuçları Tablo 4-45’de verildi.

Tablo 4-45: Modifiye Toplam Aflatoksin ve Okratoksin A Metotları Uygunluk Parametreleri

	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	OTA
Retansiyon zamanı (t_R) (dk)	11,84	10,26	8,31	7,30	6,77
Kuyruklanma Faktörü	1,383	1,380	1,384	1,402	1,244
Rezolüsyon (R_s)	2,077	2,854	1,624	3,024	6,916
Alıkonma faktörü (k')	3,095	2,549	1,875	1,527	0,794
Teorik plato sayısı (N)	3578	3161	2750	2333	4558
Yarı yükseklikte pik genişliği (W_h)	0,274	0,257	0,239	0,227	0,230
HETP	25,256	30,543	35,444	42,658	32,909

4.7. Örneklerde Aflatoksin ve Okratoksin A Miktar Tayin Sonuçları

ELISA ön tarama testi ile aflatoksin ve okratoksin A analizleri yapılan örneklerin yalnız birinde (U3B) 4,502 $\mu\text{g}/\text{kg}$ seviyesinde toplam aflatoksine rastlandı. (toplam aflatoksin LOD < 1,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aflatoksin B1 LOD=1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, OTA LOD=5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ’dır).

HPLC ile modifiye edilen aflatoksin ve okratoksin A metotları 82 adet gıda numunesine uygulandı. Bu örneklerden C2A’da 0,137 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1 tespit edildi. U3A ve U3B’de sırasıyla 0,999 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 3,250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1, 1,127 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 3,606 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bulundu. Örneklerden yalnızca G2C’de dedeksiyon limitinin üstünde OTA tespit edildi (1,157 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Sonuçlar her bir mikotoksin için geri kazanım değerleriyle doğrulandı. Bu örneklere ait sonuçlar Tablo 4-46’da, kromatogramlar ham veriler bölümünde verildi.

Tablo 4-46: HPLC ve ELISA ile örneklerde tespit edilen Aflatoksin ve Okratoksin A düzeyleri

Örnek Kodu	ELISA			HPLC		
	AFL	AFB1	OTA	AFL	AFB1	OTA
C2A	-	-	-	-	0,137 \pm 0,001	-
U3A	-	-	-	1,127 \pm 0,004	0,999 \pm 0,003	-
U3B	4,502 \pm 0,05	-	-	3,606 \pm 0,073	3,250 \pm 0,004	-
G2C	-	-	-	-	-	1,157 \pm 0,001*

* > LOD

5. TARTIŞMA

İşlenmiş tahıl ürünlerinin mikotoksinlerle bulaşma risklerinin çok yüksek olması daha hassas metotların geliştirilmesini gündeme getirmiştir. Bu çalışmada, modifiye edilen metotlar temel metotlardan daha hızlı, tayin ve teşhis limitleri daha düşük ve daha ekonomik metotlardır. Bu doktora tez çalışmasında, 82 adet işlenmiş tahıl örneğinde HPLC ile toplam aflatoksin (G1, G2, B1, B2) ve okratoksin A'nın metot validasyonu ve miktar tayini yapıldı.

HPLC ile toplam aflatoksin (G1, G2, B1, B2) ve okratoksin A tayini için kullanılan temel metotlar valide edilirken seçicilik, doğrusallık, kesinlik (gün içi ve günler arası, farklı analistler), LOD, LOQ parametreleri göz önünde bulunduruldu. Bu amaçla her iki mikotoksin analizinde kör un örneklerine belirli konsantrasyonlarda toplam aflatoksin ve okratoksin A standartları ayrı ayrı standart katılarak yapıldı. Seçicilik, içerisinde yalnızca aflatoksin (G1, G2, B1, B2) ve okratoksin A'ya duyarlı antikolar bulunduran immunoafinite kolonlar kullanılarak sağlandı. Kalibrasyon eğrileri hazırlanırken enjeksiyonlar üçer tekrarlı sekiz seviye olarak yapıldı. Kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları $r^2 > 0,9995$ olarak bulundu. Analizler iki tekrar olarak gerçekleştirildi. Lineer kalibrasyon eğrisi eğimi istatistiksel olarak % 95 güven aralığında 0'dan farklı bulundu. Geri kazanım çalışmaları iki seviyede yapıldı. Bu seviyeler kalibrasyon eğrilerinin orta ve yüksek noktalarından seçildi (toplam aflatoksin için 8 µg/kg ve 5 µg/kg, OTA için 8 µg/kg ve 3 µg/kg,). Doğruluk değerleri % bağıl hata ve sistematik hata hesaplanarak bulundu. Tekrar üretilebilirlik çalışmaları sonuçları % RSD'ler (relatif standart sapma) ile verildi. Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonuçları değerlendirilirken Horwitz eşitliği kullanıldı. Ortalama ve standart sapma dataları uç noktaları arasında farklar Grubbs kritik değerler tablosu kullanılarak Grubbs testi ile hesaplanarak verildi. Tayin limiti (LOD) ve teşhis limiti (LOQ) sonuçları, kör un örneklerine, S/N değerinin en az 10 olduğu noktaya kadar, en düşük seviyede toplam aflatoksin ve okratoksin A standartları katılarak bulundu. Örneklere standart katıldıktan sonra optimum bekleme süresinin 30 dk olduğu belirlendi, 30 dk'dan daha az beklemeden sonra ekstre edilerek çalışılan örneklerde geri kazanımın % 70'ten düşük olduğu belirlendi.

İşlenmiş tahıl ürünlerinde toplam aflatoksin tayininde asetonitril:su:metanol içeren izokratik mobil fazın, okratoksin A tayininde ise metanol: su: asetik asit içeren izokratik mobil fazın, piklerin ayrılmasında en yüksek performans gösterdikleri belirlendi. Aflatoksin tayin metodunda mobil faz belirlenirken organik çözücülerin farklı oranları denendi. En iyi mobil faz bileşiminin asetonitril:su:metanol 8:54:38 olduğu saptandı. Mobil fazda organik çözücü miktarı arttıkça toplam aflatoksin geri kazanımının azaldığı tespit edildi. En yüksek geri kazanım metanol:asetonitril oranının 4,75 olduğu mobil fazda belirlendi. Bu oran, piklerin retansiyon zamanlarında artışa sebep olsa da, piklerde en iyi ayrılmanın bu oranla mümkün olduğu saptandı. Su miktarı arttıkça piklerde yayvanlaşma tespit edildi. Toplam aflatoksin tayininde aflatoksin G2 piklerinin floresans dedektörle tayin edilebilmesi için türevlendirme yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada türevlendirme için KOBRA-cell kullanılarak bromla türevlendirme yapıldı. Mobil faza belirli miktarda KBr katılarak aflatoksin G2'lerin yüksek hassasiyette tayin edilebilmeleri sağlandı. Kullanılan KBr'in oranı arttıkça, piklerin şiddetlerinin arttığı en iyi piklerin 0,2 g/L'de elde edildiği belirlendi. Daha yüksek miktarlarda piklerde omuz tespit edildi. Daha düşük miktarlarda ise aflatoksin G2 pikinin şiddetinde azalma olduğu saptandı.

Okratoksin A gibi asidik ortam seven maddelerin tayininde, mobil fazın pH'ı analiz için önemli bir etkidir. pH arttırıldığında okratoksin A pikinin şiddetinde azalma olduğu saptandı. Farklı pH'lar denendiğinde, retansiyon zamanlarının da pH'tan etkilendiği belirlendi ve okratoksin A tayini için optimum pH 3,74, mobil faz bileşimi metanol:su:asetik asit 68,5: 29: 2,5 olarak belirlendi.

Bu mobil fazlar kullanılarak akış hızları değiştirildi. 0,8, 0,9, 1,0, 1,5 mL/dk akış hızları denendi. Yüksek hızlarda aflatoksin pikleri üstüste çakıştı. Düşük akış hızlarında toplam aflatoksin ve okratoksin A analizlerinin her ikisinde de analiz sürelerinin uzadığı ve piklerin genişlediği görüldü. Bu sebeple optimum akış hızı 1 mL/dk olarak belirlendi.

Aflatoksin ve okratoksin A analizleri için 45°C, optimum sıcaklık olarak belirlendi. HPLC analizlerinin süresini etkileyen bir diğer faktör kolon sıcaklığıdır. Yukarıdaki şartlarda, kısa analiz süresi, düşük kolon hacmiyle ya da yüksek kolon sıcaklığıyla mümkün olabilir. Yüksek kolon sıcaklığı mobil fazın vizkozitesini düşürür ve rezolüsyonda azalmaya neden olmadan analiz süresini kısaltır, kullanılan mobil faz

hacmi düştükçe, atıkta oluşan toksik çözelti hacimlerinin azalması modifiye edilen metotların bir başka avantajıdır.

Örneklerin ekstraksiyon aşamalarında metanol, su, asetonitril, aseton gibi çözücüler kullanıldı ve en yüksek geri kazanımın metanol:su ile olduğu tespit edildi. Mobil fazdaki en yüksek oranlı çözücünün metanol olması ve ekstraksiyonun bu çözücü ile yapılması keskin piklerin elde edilmesinde önemli bir etkidir. Ayrıca metanolün asetonitrile oranla daha ucuz olması kullanımı açısından bir avantaj oluşturdu. Okratoksin A analizinde ekstraksiyon aşamasında su kullanıldığında pik dedekte edilemedi. Aflatoksin analizinde ise yayvan ve düzgün olmayan pikler gözlenirken aflatoksin G1 ve G2 gözlemlenmedi.

Modifiye toplam aflatoksin ve okratoksin A metotlarında analiz örneklerinin ekstraksiyon aşamaları tamamen aynıdır, bu da tahıl bazlı bir gıda örneğinden tek bir ekstre hazırlanarak hem toplam aflatoksin hem de okratoksin A tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Modifiye toplam aflatoksin ve okratoksin A metotlarının daha hassas olmaları, çok düşük seviyelerdeki kontaminasyonların bile tespit edilebilmelerini sağladı (toplam aflatoksin LOQ=0,4 µg/kg, aflatoksin B1 LOQ=0,117 µg/kg, okratoksin A LOQ=1,477 µg/kg).

Modifiye toplam aflatoksin ve okratoksin A tayin metotları, işlenmiş tahıl örneklerine başarıyla uygulandı ve 4 örnekte (C2A, U3A, U3B, G2C) kontaminasyona rastlandı. ELISA ön tarama testinden elde edilen sonuçlarla, HPLC analizlerinden elde edilen sonuçların birbirine yakın olduğu görüldü.

Sonuç olarak işlenmiş tahıl bazlı gıda örneklerinin bazılarında belli oranlarda aflatoksin ve okratoksin A tespit edilmiş olması, örneklerin tarladan sofraya kadar uygun koşullarda bulundurulmasının, gerek satış yerlerinde gerekse üretim ve depolama tesislerindeki şartların uygun olmasının ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. 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 kontaminasyonlara yönelik olarak sürekli kontrol edilmelidir. Gıda ürünleri her aşamada aflatoksin ve okratoksin A kontaminasyonu yönünden analiz edilmeli ve limitleri aşan ürünlerin tüketimine izin verilmemelidir.

KAYNAKLAR

- AOAC Official Method (2000). Ochratoxin A in Barley Immunoaffinity by Column HPLC First Action.
- AOAC Official Method (2002). Official Method Aflatoxins in Corn ,Raw Peanuts And Peanut Butter Immunoaffinity Column (Afla test) Method First Action 1991, AOAC-IUPAC Method.
- Arrus, K., Blank, G., Abramson, D., Clear, R. ve Holley, R.A. (2005). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Product Research*, **41**, 513-527.
- Banu, N. ve Muthumary, J. (2010). Taxol as chemical detoxificant of aflatoxin produced by *Aspergillus flavus* isolated from sunflower seed. *Health*, **2**, 789-795.
- Bennett, J.W. ve Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, **16**, 497-516.
- Bensassi, F., Zaied, C., Abid, S., Hajlaoui, M.R. ve Bacha H. (2009). Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. *Food Control*, **21**, 281-285.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G. ve Krska, R. (2005). Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1062**, 209-216.
- Bhat, R., Rai, R.V. ve Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **9**, 57-81.
- Boermans, H.J. ve Leung, M.C.K. (2007). Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, **98**, 3309-3316.
- Bonjar G.H.S. (2004). Incidence of aflatoxin producing fungi in early split pistachio nuts of Kerman, Iran. *Journal of Biological Sciences*, **4**, 199-202.
- Bove, F.J. (1970). The story of ergot, S. Karger (Ed), Basel.
- Campbell, A.D., Whitaker, T.B., Pohland, A.E., Dickens, J.W. ve Park, D.L. (1986). Sampling, sample preparation, and sampling plans for foodstuffs for mycotoxin analysis. *Pure and Applied Chemistry*, **58**, 305-314.

- Chris, M., Steven, M. 1998. Detection of Aflatoxin B₁ with an evanescent wave-based
- Chu, F.S. (1984). Immunoassays for analysis of Mycotoxins. *Journal of Food Protection*, **47**, 562-569.
- Coran, M.H., Watanabe, E. ve Craig, A. (2002). Townsend Initial characterization of a type I fatty acid synthase and polyketide synthase multienzyme complex in the biosynthesis of aflatoxin B₁. *Chemistry & Biology*, **9**, 981-988.
- Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, **127**, 19-28.
- Çoksöyler, N. (1997). Ekstraksiyon ve ekstrakt temizleme. Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Seminer Notları, Mersin, 41.
- Erkahveci, A. ve Karaali, A. (1997). Kırmızı toz biberde kullanılabilir üç farklı analiz metodunun karşılaştırılması. *Gıda Mühendisliği III. Ulusal Sempozyumu*, 22-23 Eylül. ODTÜ Kampüsü. Ankara.
- Eurachem Guide (1998). The Fitness for Purpose of Analytical Methods. *A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 1st edition, Eurachem.
- Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2002). *WHO Technical Report Series 906*.
- fiber optic immunosensor. <http://www.nal.usda.gov>
- Freeman, G.G. ve Morrison, R.I. (1948). Trichothecins: an antifungal metabolic product of *Trichothecium roseum*. *Nature*, **162**, 30.
- Frenettea, C., Paugha, R., Tozlovanub, M., Juziob, M., Leszkowiczb, A.P. ve Manderville, R.A. (2008). Structure–activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites, *Analytica Chimica Acta*, **617(2)**, 153-161.
- Fukal, L. (1990). A survey of cereals, cereal products, feedstuffs and porcine kidneys for ochratoxin A by RIA. *Food Additives and Contaminants*, **7**, 253-258.
- Gaag, B., Edwin, S., Pohl, S. (2000). Multi analyte biosensor for the detection of mycotoxins. TNO, BIACORE.
- Gaag, B., Stigter, E., Duijn, G., Blecker, H., Hofstra, H. ve Wahlstram, L. (1998). Application development on BIACORE for the detection of mycotoxins in food and feed. TNO, BIACORE.

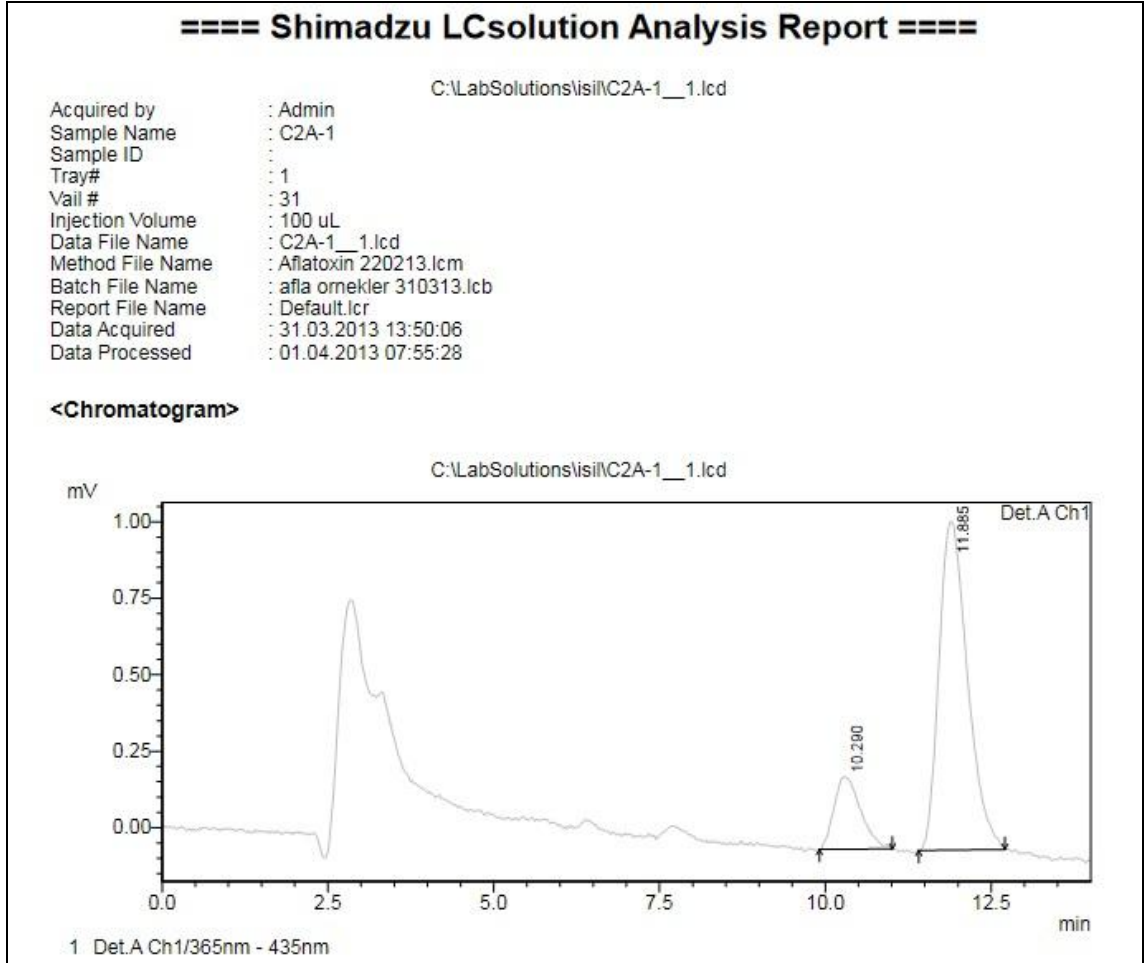
- Gamanya, R. ve Sibanda, L. (2001). Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 145-149.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A. ve Magan, N. (2008). Effect of aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International of Food Microbiology*, **122**, 109-113.
- Gökmen, V. ve Acar, J. (1998). Indidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey, *Journal of Chromagraphy A*, **815**, 99-102.
- Hernandez I. A. (2009). Doctorate thesis. Development and validation of analytical methods for mycotoxins in food, medicinal herbs and feed, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultat der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Hışıl, Y. (1999). *Enstrümental Gıda Analizleri (I)*. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 218.
- Horwitz, W. (1995). Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure and Applied Chemistry*. **67**, 331-343.
- Huff, W., Hamilton, P.B. (1979). Mycotoxins their biosynthesis in fungi ochratoxins metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*, **42**, 815-820.
- Hussein, H.S. ve Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, **167**, 101-134.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993). Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *Monographson the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, **56**.
- İnan, F., Pala, M. ve Doymaz, I. (2007). Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper. *Journal of Stored Product Research*, **43**, 425-429.
- Janotová, L., Cizkova, H., Pivonka, J., Voldrich, M. (2011). Effect of processing of apple puree on patulin content. *Food Control*, **22**, 977-981.
- Josephs, R.D., Krska, R., Mac Donald, S., Wilson, P. ve Pettersson, H. (2004). Production of a calibrant certified reference material for determination of the estrogenic mycotoxin zearalenone. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **378**, 1182-1189.

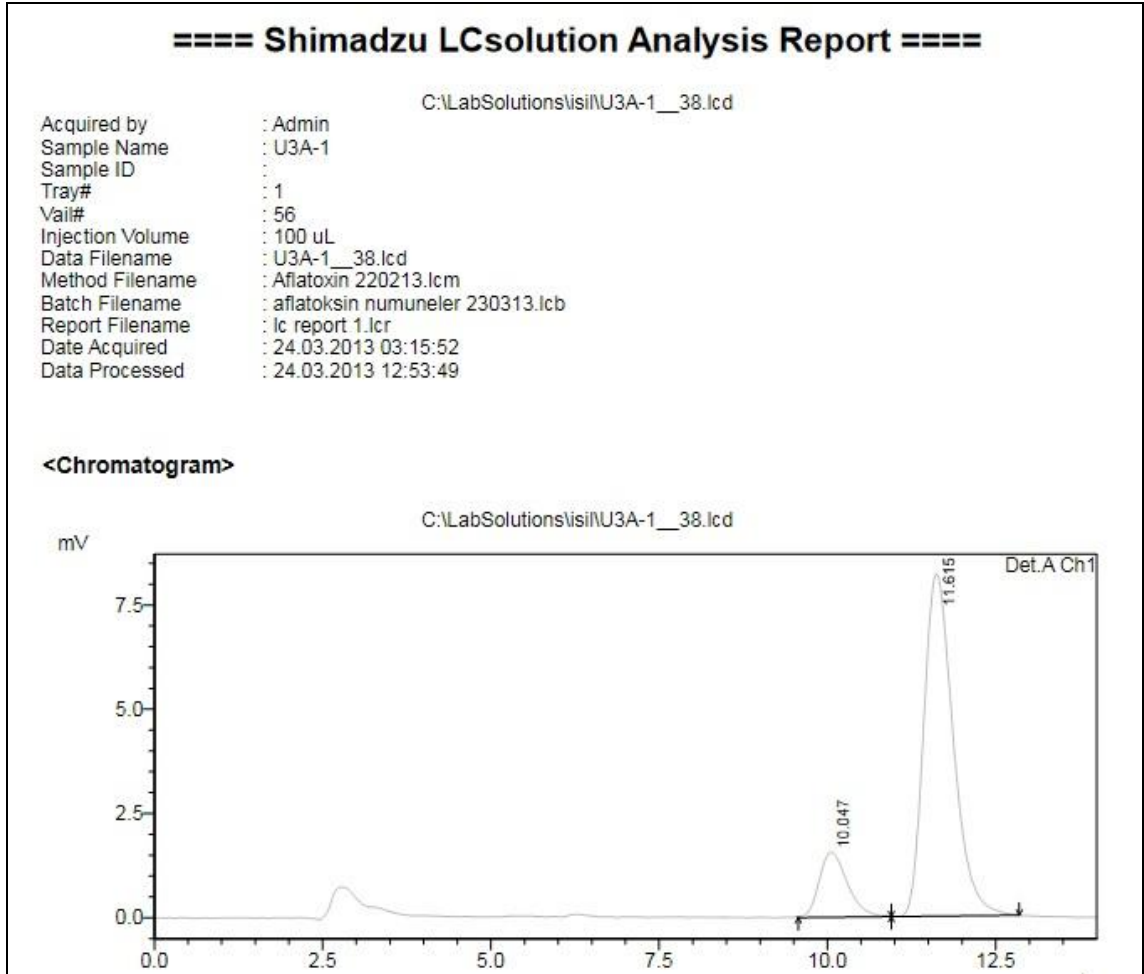
- Kabak, B., Dobson, A.D.W. ve Vara, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**, 593-619.
- Krogh, P. (1992). Role of ochratoxin A in disease causation. *Food and Chemical Toxicology*, **3**, 213-224.
- Leibetseder, J. (2006). *Decontamination and detoxification of mycotoxins*. İçinde. Mosenthin R, Zentek, J., Zebrowska, T., (Eds.) *Biology of Nutrition in Growing Animals*. Elsevier Limited, 439-465.
- Lorenz, K. (1979). Ergot on cereal grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **11**, 311-354.
- Magan, M. ve Olsen, M. (2004). *Mycotoxins in food: detection and control*, Woodhead Publishing and CRC Press LLC, Florida.
- Maragos, C. (1999). New ways to monitor toxins. *Agricultural Research*, February By Linda McGraw, ARS.
- Massart, F. ve Saggese, G. (2010). Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *International Journal of Andrology*, **33**, 369–376.
- Minto, R.E., Townsend, C.A. (1997). Enzymology and Molecular Biology of Aflatoxin Biosynthesis. *Chemical Reviews*, **97**, 2537-2555.
- Molina, M. ve Giannuzzi, L. (2002). Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research International*, **35**, 585-594.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C. ve Anaissie, E.J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of fusarium species. *Clinical Microbiology Reviews*, **7**, 479-504.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*, Pennsylvania State University Press, 193.
- Ominsk, K., Marquardi, R.R., Sinha, R.N. ve Abramson, D. (1994). *Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi*. İçinde J.D. Miler and H.L. Trenholm. St. Paul Minnesota, *Mycotoxins in grains: Compounds other than aflatoxins*. Eagan Press, USA;287-314.
- Özkaya, B. (2000). *Gıda*, **25**, 219-225.
- Özkaya, Ş., Taydaş, E.E., Başaran, A., Avcı, B. ve Hızlı, S. (1999). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı, *Aflatoksin Analiz Kurs Notları*, Ankara.

- Palleschi, G. (1999). Introduction to biosensors. Lecture given by author. University Of Rome, Tor Vergata.
- Papa, K.E. (1984). Genetics of *Aspergillus flavus*: linkage of aflatoxin. *Canadian Journal of Microbiology*, **30**, 68-73.
- Park, D.L., Ayala, C.E., Guzman-Perez, S.E., Garcia, R.L. ve Trujillo, S. (2000). Microbial Toxins in Foods: Algal, Fungal, and Bacterial. İçinde *Food Toxicology*, CRC Press.
- Prudente, A.D. (2002). Use of biosensors for rapid screening of aflatoxin. LSU Food R-Biopharm, GmbH. 2002. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin. Art. No. R 5202. Darmstadt, Germany.
- R-Biopharm, GmbH. 2006. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin B1. Art. No. R 1211. Darmstadt, Germany
- R-Biopharm, GmbH. 2007. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A. Art. No. R 5402. Darmstadt, Germany.
- Rustom, I.Y.S. (1997). Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, **59**, 57-67.
- Safara, M., Zaini, F., Hashemi, S.J., Mahmoudi, M., Khosravi, A.R. ve Shojai-Aliabadi, F. (2010). Aflatoxin detoxification in rice using citric acid. *Iranian Journal of Public Health*, **39**, 24-29.
- Science Graduate Seminar. March 22. Louisiana State University.
- Scott, P.M. (1991). *Analysis of oil seeds, fats and fatty foods*. J.B Rossell ve J.L.R. Pritchard, (Eds.) Elsevier Applied Science, London.
- Scott, P.M. (2002). Methods of analysis for ochratoxin A. *Advance in Experimental Medicine & Biology*. **504**, 117-134.
- Scott, P.M. (1993). Fumonisin, *International Journal of Food Microbiology*, **18**, 257-270.
- Smith, J.E. ve Moss, M.O. (1985). *Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*, John Wiley & Sons, New York.
- Spanjer, M.C., Rensen, P.M. ve Scholten, J.M. (2008). LC/MS/MS multi method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives and Contaminants*, **4**, 472-489.

- Steyn, P.S. (1984). *Ochratoxins and related dihydroisocoumarins: Mycotoxins, production, isolation, separation and purification*. V. Betina (Ed), *Elsevier Science*, 183-216.
- Stroka, J. (2000). Doctorate thesis. Determination of aflatoxins in food and feed with sample and optimised methods. University of Wuppertal, Germany
- Sweeney, M.J. ve Dobson, A.D.W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, **43**, 141-158.
- Tanaka, H., Takino, M., Sugita-Konishi, Y. ve Tanaka, T. (2007). Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20**, 1422-1428.
- Tanaka, T., Hasegawa, A., Matsuki, Y., Lee, U.-S. and Uneo, Y. (1985) Rapid and sensitive determination of zearalenone in cereals by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **328**, 271-278.
- Thanaboripat, D., Kraipeerapun, K., Pattanaphongsak, C., Srisanan, S. ve Nanasombat, S. (1997). Detoxification of aflatoxin by *Streptococcus lactis* and lactic acid bacteria in commercial yoghurt. *Kasetsart Journal: Natural Science*, **31**, 117-123.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S. ve Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, **26**; 632, 168-180.
- Türk Gıda Kodeksi Tebliğ. (2008). Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, **26**.
- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. (1998). *Gıda Mikrobiyolojisi*. Mengi Tan Basımevi, Çınarlı, 605, İzmir.
- Van der Merwe, K.J, Steyn, P.S, Fourie, L., Scott, D.B ve Theron, J.J. (1965). Ochratoxin A, atoxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Wild Nature*, **205**, 1112-1113.
- Van Egmond, H.P. (1991). *Worldwide regulations for Ochratoxin-A, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I. N. Chernozemsky, H. Bartsch Lyon (Eds), *International Agency for Research on Cancer*, 331-336.

- Veseinder, R., Peterson, R, Plattner, R. ve Weisleder, D. (1990). Fumonisin B₁: Isolation from corn culture and purification by high performance liquid chromatography. *Mycotoxin Research*, **6**, 85-88.
- Warner, R.L. ve Pestka, J.T. (1987). ELISA survey of retail grain –bated food products for zearalenone and aflatoxin B₁. *Journal of Food Protection*, **50**, 502-503.
- Weidenbörner, M. (2001). Foods and fumonisins. *European Food Research and Technology*, **212**, 262-273.
- Yentür, G. ve Er, B. (2012). Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, **69**, 41-52.

HAM VERİLER**C2A örneğinin HPLC kromatogramı**

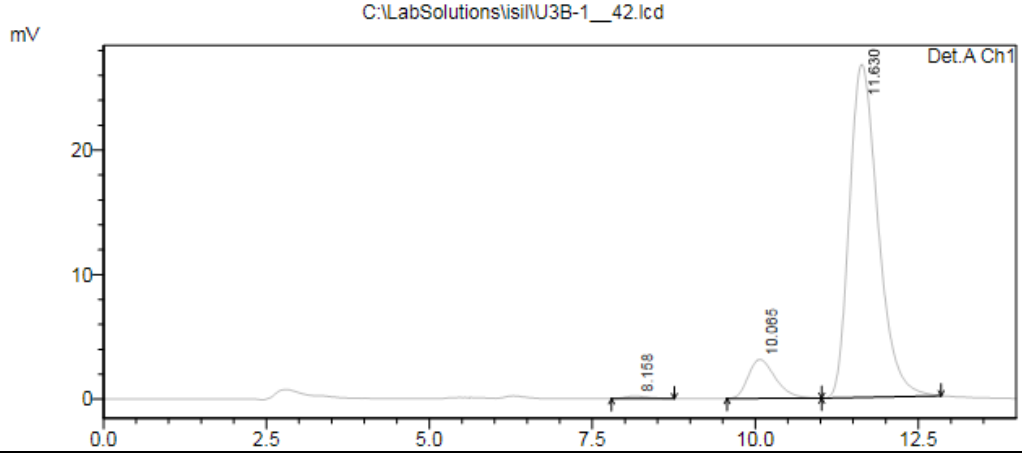


U3A örneğinin HPLC kromatogramı

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\isil\U3B-1__42.lcd

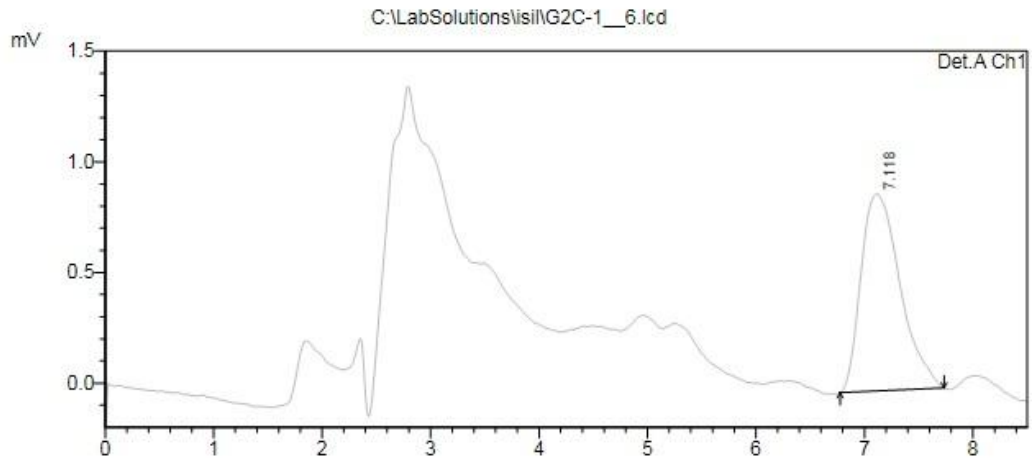
Acquired by : Admin
Sample Name : U3B-1
Sample ID :
Tray# : 1
Vial# : 60
Injection Volume : 100 uL
Data Filename : U3B-1__42.lcd
Method Filename : Aflatoxin 220213.lcm
Batch Filename : aflatoksin numuneler 230313.lcb
Report Filename : lc report 1.lcr
Date Acquired : 24.03.2013 04:14:10
Data Processed : 24.03.2013 12:54:23

<Chromatogram>**U3B örneğinin HPLC kromatogramı**

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\lisi\G2C-1__6.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: G2C-1
Sample ID	:
Tray#	: 1
Vial#	: 35
Injection Volume	: 100 uL
Data Filename	: G2C-1__6.lcd
Method Filename	: ota yeni metot.lcm
Batch Filename	: ochratoxin a numuneler.lcb
Report Filename	: lc report 1.lcr
Date Acquired	: 18.03.2013 18:15:01
Data Processed	: 19.03.2013 08:44:00

<Chromatogram>**G2C örneğinin HPLC kromatogramı**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Işıl	Soyadı	Hacıbekiroğlu
Doğ.Yeri	Fatih	Doğ.Tar.	25.01.1985
Uyruğu	Türk	TC Kim No	47977296563
Email	isilhacibekiroglu@gmail.com	Tel	05449744187

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	-
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2009
Lisans	Trakya Üniversitesi	2007
Lise	Cibali Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2011-
2.	Uzman Analist, Kimyasal Analiz Sorumlusu	Redo Analyzer Gıda Kontrol ve Analiz Laboratuvarı	2009-2011

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	72	
Almanca	Orta	Orta	Orta		C1 seviyesi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	85,654	88,856	82,342

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office (Excel, Word, Power Point)	İyi
Lab Solutions	İyi
Chem Station	İyi
Chem Draw	İyi

Yayımları

U. Kolak, **I. Hacıbekiroğlu**, M. Öztürk, F. Özgökçe, G. Topçu, A. Ulubelen
Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*
Turkish Journal of Chemistry 33, 813-823 (2009)

I. Hacıbekiroğlu, U. Kolak

Antioxidant and anticholinesterase constituents from the petroleum ether and chloroform extracts of *Iris suaveolens*, *Phytotherapy Research*, 25, 522-529 (2011)

M. Boğa, **I. Hacıbekiroğlu**, U. Kolak

Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven plants
Pharmaceutical Biology, 49:3, 209-5 (2011)

U. Kolak, **I. Hacıbekiroğlu**, M. Boğa, F. Özgökçe, M. Ünal, M. Iqbal Choudhary and A. Ulubelen
Phytochemical Investigation of *Leontice leontopetalum* L. subsp. *ewersmannii* with Antioxidant and Anticholinesterase Activities
Rec. Nat. Prod. 5:4, 309-313 (2011)

I. Hacıbekiroğlu, U. Kolak

Screening Antioxidant and Anticholinesterase Potential of *Iris albicans* Extracts.
Arabian Journal of Chemistry, DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.04.051, (2012).

I. Hacıbekiroğlu, U. Kolak

Detection of Total Aflatoxin and Aflatoxin B1 Levels by ELISA in Foods from Istanbul, Turkey, *Food Additives and Contaminants Part: B*, DOI:10.1080/19393210.2013.813080, (2013).

Bildirileri

U. Kolak, **I. Hacibekiroğlu**, F. Özgökçe, G.Topçu, A. Ulubelen

Salvia pocolata bitkisinden elde edilen bileşiklerin yapı tayini

XI. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 23-26 Haziran 2009, Ankara (Poster bildiri)

I. Hacibekiroğlu, U. Kolak

Iris suaveolens'ten elde edilen bileşiklerin yapı tayini ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi

XI. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 23-26 Haziran 2009, Ankara (Sözlü bildiri)

M. Öztürk, M. Boğa, F. Bahadori, S.D. Hatipoğlu, **I. Hacibekiroğlu**, G. Yapar, U. Kolak, G. Topçu

Bazı *Salvia* türlerinden elde edilen antioksidan bileşikler

23. Ulusal Kimya Kongresi, 16-20 Haziran 2009, Sivas (Poster bildiri)

U. Kolak, M.Boğa, **I. Hacibekiroğlu**

On Bir Bitkinin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin Tayini

5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Erzurum (Poster bildiri)

M. Boğa, U. Kolak, A. Ertaş, **I. Hacibekiroğlu**, C. Toplu

Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) Kahvesinin Antioksidan Etkisinin Tayini

5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Erzurum (Poster bildiri)

I. Hacibekiroğlu, M. Boğa, N. Haşimi, A. Ertaş, U. Kolak

Antioxidant and Anti-Alzheimer Activities of Bloom Extracts of Bilberry (*Vaccinium myrtillus*)

New Challenges in Natural Products Chemistry, *Conference in honour of Prof. Dr. Ayhan Ulubelen*, 11-12 Eylül 2011, İstanbul (Poster Bildiri)

I. Hacibekiroğlu, U. Kolak

Antioxidant and Anticholinesterase Activities of Compounds Isolated from *Iris suaveolens*

New Challenges in Natural Products Chemistry, *Conference in honour of Prof. Dr. Ayhan Ulubelen*, 11-12 Eylül 2011, İstanbul (Poster Bildiri)

U. Kolak, **I. Hacibekiroglu**, M. Boğa, F. Özgökçe, M. Ünal, M. Iqbal Choudhary and A. Ulubelen
 Phytochemical Investigation of *Leontice leontopetalum* L. subsp. *ewersmannii* with Antioxidant and Anticholinesterase Activities
 International Symposium on Sekondary Metabolites: Chemical, Biological and Biotechnological Properties, 12-15 Eylül 2011, Denizli (Poster Bildiri)

I. Hacibekiroğlu, U. Kolak

Iris albicans L. Bitkisinden Hazırlanan Ekstrelerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin Araştırılması
 6. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Hatay (Poster bildiri)

P. Köseoğlu, **I. Hacibekiroğlu**, U. Kolak

Türk Kahvesinin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi
 6. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Hatay (Poster bildiri)

I. Hacibekiroğlu, U. Kolak

Determination of Total Aflatoxin and Aflatoxin B₁ Using CD-ELISA Method in 63 Food Samples from Turkey
 7th conference of The World Mycotoxin Forum and XIIIth IUPAC International Symposium on Mycotoxins and and Phycotoxins, 05-09 November 2012, Rotterdam, the Netherlands (Poster bildiri)

I. Hacibekiroğlu, U. Kolak

Determination of Ochratoxin A in foods from Turkey
 IUPAC 2013 44th World Chemistry Congress, 11-16 August 2013, Istanbul, Turkey (Poster bildiri)

I. Hacibekiroğlu, P. Koseoğlu, U. Kolak

Antioxidant and Anticholinesterase Activities of Pistacia terebinthus and P. khinjuk with Mycotoxin Levels

IUPAC 2013 44th World Chemistry Congress, 11-16 August 2013, Istanbul, Turkey (Poster bildiri)

Sertifikaları

Shimadzu LC-20 HPLC/UPLC cihazı eğitimi

ANT TEKNİK - 03.2013

BIOTEK Synergy ELISA reader cihaz eğitimi

Pera Medikal - 07.2012

Deney Hayvanları Kullanım Kursu

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Merkezi - 06.2012

NUMUNE HAZIRLAMA TEKNİKLERİ VE UYGULAMALARI

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi - 05.2012

KROMATOGRAFİK METOT GELİŐTİRME VE VALİDASYON

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi - 01.2012

ISO 17025 Deney Laboratuvarlarının Akreditasyonu

Tübitak Marmara Araştırma Merkezi - 12.2011

Pesitisit Analizi

İstanbul İl Tarım Müdürlüğü Kalıntı Laboratuvarı - 05.2011

Mikotoksin analizleri yeterlilik sertifikası

Sincer Dış Ticaret - 08.2010

Agilent 1200 HPLC cihazı eğitimi

SEM Laboratuvar Cihazları - 07.2010

Deney Laboratuvarlarında Doğrulama ve Kalibrasyon

Gıda Hijyen Akademisi - 09.01.2010

OHSAS 18001 İŞ SAĞLIĞI VE İŞ GÜVENLİĞİ YÖNETİM SİSTEMİ

Türkiye Kimyagerler Derneği - 24.08.2008

HACCP ISO 22000:2005 GIDA GÜVENLİĞİ YÖNETİM SİSTEMİ

SERTİFİKASI, TÜRKİYE KİMYAGERLER DERNEĞİ - 27.04.2008

ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi

Türkiye Kimyagerler Derneği - 21.04.2007

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Seyahat etmek, Fotoğraf çekmek, Tiyatro, Parasailing