

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

**TÜRKİYE PİYASASINDA SATILAN BİRALARDA STERİGMATOSİSTİN  
KALINTISININ ARAŞTIRILMASI**

**Meryem YILDIZ ÖCAL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**2013**

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

**TÜRKİYE PİYASASINDA SATILAN BİRALARDA STERİGMATOSİSTİN  
KALINTISININ ARAŞTIRILMASI**

**Meryem YILDIZ ÖCAL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 2011.02.0121.033 proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi Bilimsel  
Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.**

**2013**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



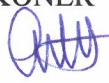
TÜRKİYE PİYASASINDA SATILAN BİRALARDA STERİGMATOSİSTİN  
KALINTISININ ARAŞTIRILMASI

Meryem YILDIZ ÖCAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 25/6/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Muharrem CERTEL  
Prof.Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER  
Yrd.Doç.Dr. Bülent ŞİK

## ÖZET

### TÜRKİYE PİYASASINDA SATILAN BİRALARDA STERİGMATOSİSTİN KALINTISININ ARAŞTIRILMASI

**Meryem YILDIZ ÖCAL**

**Yüksek lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı  
Danışman: Prof.Dr. Muharrem CERTEL  
Haziran 2013, 46 Sayfa**

Bu çalışmada, Türkiye piyasasından satın alınan 30 farklı bira örneği analiz edilinceye kadar 5 °C de muhafaza edilmiş ve bu örneklerdeki sterigmatosistin kalıntısı ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UHPLC) ile tespit edilmiştir. Sterigmatosistin kalıntısının tespiti için kullanılan analitik yöntemin validasyonu doğrusalılık, tekrarlanabilirlik, seçicilik, geri kazanım, tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) parametreleri belirlenerek yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı olan  $r^2$  0.9999 olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, 1.48 µg/l ve 4.9 µg/l olarak belirlenmiştir. Ortalama geri kazanım oranı %93.69 olarak elde edilmiştir. Analizler 5 tekerrürlü ve 2 paralelli olacak şekilde yapılmış ve örneklerin hiçbirinde sterigmatosistine rastlanmamıştır. Sonuç olarak, Türkiye piyasasında satılan biraların üretiminde kullanılan arpa, malt, pirinç ve buğdayın sterigmatosistin açısından temiz olduğu belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Bira, Sterigmatosistin, UHPLC

**JÜRİ:** Prof. Dr. Muharrem CERTEL  
Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER  
Yrd. Doç. Dr. Bülent ŞİK

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF STERIGMATOCYSTIN RESIDUE IN BEER SOLD IN TURKISH MARKET**

**Meryem YILDIZ ÖCAL**

**M.Sc. in Food Engineering  
Adviser: Prof.Dr. Muharrem CERTEL  
Haziran 2013, 46 Pages**

In this study, 30 different beer samples purchased from Turkish markets, were stored at 5 °C until analysis and the sterigmatocystin residue of these samples was detected by ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC). The validation of the analytical method used for detection of sterigmatocystin residue was made according to the linearity, repeatability, selectivity-specificity, recovery, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) parameters. The correlation coefficient of calibration curve ( $r^2$ ) was found as 0.9999. LOD and LOQ values were determined as 1.48 µg/l and 4.9 µg/l, respectively. Mean recovery was obtained as 93.69%. Analysis were replicated five times by using duplicate samples, and sterigmatocystin was detected in any of the samples. As a result, it was determined that barley, malt, rice and wheat which are used in the production of beer sold in Turkish markets, are clean in terms of sterigmatocystin residue.

**KEY WORDS:** Beer, Sterigmatocystin, UHPLC

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Advisor)  
Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER  
Asst. Prof. Dr. Bülent ŞIK

## ÖNSÖZ

Yapılan çalışmalarda sterigmatosistin akut toksik, mutajenik, sitotoksik ve karsinojenik etkileri araştırılmış, sonuç olarak hepatotoksik, kanserojen ve teratojen olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, Türkiye piyasasında satılan biralarda sterigmatosistin kalıntısı araştırılmıştır. Biranın hammaddesi olan hububattaki sterigmatosistin kontaminasyonu göz önünde bulundurulduğunda, bu toksinin biralarda da bulunabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada Türkiye piyasasındaki biraların sterigmatosistin içeriği yönünden mevcut durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Muharrem CERTEL'e, katkılarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent ŞIK'a, çalışmam sırasında desteği ile yanımda olan Yüksek Lisans öğrencisi Sayın Nisa DURAK'a ve Sayın Gıda Yüksek Mühendisi Gülçin ALTINDAĞ'a, yardımlarını esirgemeyen Sayın Kimyager Taner ERKAYMAZ ve Sayın Kimyager Timur TONGUR'a, beni yönlendiren ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim Sayın Araş. Gör. Fundagül EREM ve Sayın Araş. Gör. Ülgen İlknur KONAK'a, Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki tüm öğretim elemanları ve arkadaşlarıma, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili eşim Kılıçaslan ÖCAL ve kızım Nil Melis ÖCAL'a, aileme ve araştırmamı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve laboratuvarlarını kullanma imkanı veren Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'ne teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ÖZET.....  | i    |
| ABSTRACT.....  | ii   |
| ÖNSÖZ.....   | iii  |
| İÇİNDEKİLER.....   | iv   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....                                    | v    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | vii  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....   | viii |
| 1. GİRİŞ.....  | 1    |
| 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....                         | 3    |
| 2.1. Mikotoksinler.....  | 3    |
| 2.2. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....                     | 5    |
| 2.2.1. Bağlı nemin veya su aktivitesinin etkisi.....                   | 5    |
| 2.2.2. Sıcaklığın etkisi.....  | 6    |
| 2.2.3. Diğer faktörlerin etkisi.....                                   | 6    |
| 2.3. Sterigmatosistin.....   | 7    |
| 2.3.1. Sterigmatosistin kimyasal yapısı.....                           | 7    |
| 2.3.2. Sterigmatosistin toksisitesi.....                               | 9    |
| 2.3.3. Sterigmatosistin üreten küfler ve gelişme şartları.....         | 10   |
| 2.3.4. Gıdalarda bulunması.....  | 11   |
| 2.3.5. Sterigmatosistin tespitinde kullanılan yöntemler.....           | 14   |
| 2.3.6. Yasal düzenlemeler.....   | 20   |
| 2.4. Validasyon.....   | 20   |
| 2.4.1. Metot validasyonu.....  | 20   |
| 2.4.2. Metot validasyonu işleminin amaçları.....                       | 20   |
| 2.4.3. Metot validasyonu ne zaman uygulanmalıdır.....                  | 20   |
| 2.4.4. Validasyon parametrelerinin belirlenmesi.....                   | 20   |
| 2.4.5. Metot validasyon parametreleri.....                             | 21   |
| 3. MATERYAL ve METOT.....  | 25   |
| 3.1. Materyal.....   | 25   |
| 3.2. Metot.....  | 25   |
| 3.3. Bira Örneklerinin Analize Hazırlanması.....                       | 27   |
| 3.4. UHPLC Analizi.....  | 27   |
| 3.5. Stok Solüsyonun Hazırlanması.....                                 | 28   |
| 4. BULGULAR.....   | 29   |
| 4.1. Doğrusallık Çalışmaları (Linearity Studies).....                  | 29   |
| 4.2. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları (Repeatability Studies).....       | 30   |
| 4.3. Seçicilik Çalışmaları ( Selectivity-Specificity Studies).....     | 31   |
| 4.4. Geri Kazanım Çalışmaları (Recovery Studies).....                  | 32   |
| 4.5. Tespit Limiti Çalışmaları (Limit of Detection-LOD Studies).....   | 33   |
| 4.6. Ölçüm Limiti Çalışmaları (Limit of Quantitation-LOQ Studies)..... | 33   |
| 4.7. Bira Örneklerinin Analizi.....                                    | 33   |
| 5. TARTIŞMA.....   | 35   |
| 6. SONUÇ.....  | 37   |
| 7.KAYNAKLAR.....   | 39   |
| ÖZGEÇMİŞ.....  |      |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

|    |                  |
|----|------------------|
| °C | Santigrat derece |
| μ  | Mikron           |
| μg | Mikrogram        |
| μl | Mikrolitre       |
| μm | Mikrometre       |
| cm | Santimetre       |
| dk | Dakika           |
| kg | Kilogram         |
| L  | Litre            |
| m  | Metre            |
| mg | Miligram         |
| ml | Mililitre        |
| mm | Milimetre        |
| nm | Nanometre        |

### Kısaltmalar

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| ACN                             | Asetonitril                             |
| AFB1                            | Aflatoksin B1                           |
| Al <sub>2</sub> C <sub>6</sub>  | Alüminyum klorür (susuz)                |
| AlCl <sub>3</sub>               | Alüminyum klorür                        |
| a <sub>w</sub>                  | Su aktivitesi                           |
| C18                             | Karbon 18                               |
| C <sub>CRM</sub>                | Spike konsantrasyon değeri              |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | Metilen klorür                          |
| CH <sub>3</sub> COOH            | Asetik asit                             |
| CHCl <sub>3</sub>               | Kloroform                               |
| C <sub>met</sub>                | Metotla bulunan miktar                  |
| C <sub>obs</sub>                | Bulunan konsantrasyon değeri            |
| C <sub>ref</sub>                | Referans konsantrasyon değeri           |
| C <sub>samp</sub>               | Örneğin konsantrasyon değeri            |
| Dak                             | Dakika                                  |
| ELISA                           | Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay      |
| GC                              | Gaz Kromatografisi                      |
| H <sub>2</sub> O                | Su                                      |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>  | Fosforik asit                           |
| HCl                             | Hidroklorik asit                        |
| HPLC                            | Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| KCl                             | Potasyum klorür                         |
| LC                              | Sıvı kromatografisi                     |



|                  |  |
|------------------|--|
| LC-MS            | Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi       |
| LC-MSMS          | Sıvı kromatografisi-kütle-kütle spektrometresi |
| LD <sub>50</sub> | %50 öldürücü doz                               |
| LOD              | Tespit Limiti                                  |
| LOQ              | Ölçüm Limiti                                   |
| MeOH             | Metanol  |
| NaCl             | Sodyum klorür                                  |
| OTA              | Okratoksin A                                   |
| PDA              | Photodiode Array Dedektör                      |
| pH               | Asitlik  |
| ppb              | Milyarda bir                                   |
| ppm              | Milyonda bir                                   |
| r <sup>2</sup>   | Korelasyon katsayısı                           |
| RSD              | Bağıl Standart Sapma                           |
| RT               | Alıkonma zamanı                                |
| S/N              | Sinyal/Noise(gürültü)                          |
| SD               | Standart Sapma                                 |
| SPE              | Katı faz ekstraksiyonu                         |
| STC              | Sterigmatosistin                               |
| TLC              | İnce tabaka kromatografisi                     |
| UHPLC            | Ultra Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi      |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 2.1. a) STC kimyasal formülü, b) Aflatoksin B1 kimyasal formülü ..... | 8  |
| Şekil 3.1. Analizlerin yapıldığı gradyen programı.....                      | 26 |
| Şekil 3.2. Otosampler için belirlenen metot parametreleri .....             | 26 |
| Şekil 3.3. PDA dedektör için belirlenen metot parametreleri .....           | 27 |
| Şekil 4.1. Kalibrasyon grafiği .....  | 29 |
| Şekil 4.2. STC standartına ait pik görüntüsü .....                          | 30 |
| Şekil 4.3. STC içermeyen bira örneği .....                                  | 31 |
| Şekil 4.4. STC içermeyen biraya ait kromatogram .....                       | 32 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| Çizelge 2.1. Mikotoksin çeşitleri, bunların kaynakları, hedef hayvan, doku veya organlar ve etkileri (Kaya 2001). .....  | 4  |
| Çizelge 2.2. Sterigmatosistin farklı organik çözücülerdeki çözünürlük oranları ve soğuk ve dondurucu depolamadaki stabilitesi (Kontaminasyon miktarı: 5 µg STC) (Septien vd 1993)..... | 8  |
| Çizelge 2.3. Gıda maddelerinde, yemde, tozda, yapı malzemelerinde ve iç havada STC'nin tespiti için kromatografik metodların özeti (Veršilovskis ve De Saeger 2009).....               | 15 |
| Çizelge 4.1 Kalibrasyon Eğrisi'nin Korelasyon Katsayısı ( $r^2$ ) (Correlation coefficient) .....  | 29 |
| Çizelge 4.2. Sterigmatosistin için elde edilen Alıkonma Zamanları, Pik alanları ve % geri kazanım ile ilgili sonuçlar .....  | 31 |
| Çizelge 4.3. 200 ppb STC eklenmiş örneğe ait geri kazanım çalışması .....  | 32 |
| Çizelge 4.5. Bira örneklerinin analiz sonuçları .....  | 34 |



## 1. GİRİŞ

Mikotoksinler mantarlar tarafından üretilen, hayvanlarda ve insanlarda toksik etkiler yaratan sekonder metabolitlerdir. Dünyada yaklaşık 100000 küf cinsi tanımlanmış olup bunların 400'den fazlası potansiyel olarak toksik kabul edilmektedir (Keser ve Kutay 2008).

Tarımsal ürünlerde mikotoksin oluşumu, uygun koşullarda ürüne bağlı olmak üzere, hasattan tüketime kadar hemen her aşamada meydana gelebilmektedir. Mikotoksinler, gıda güvenliğinin sağlanması açısından kontrol altına alınması gereken önemli sorunlardan biridir. İnsan ve hayvan sağlığı açısından önemli olan fındık, antep fıstığı, kuru incir, siyah zeytin, kırmızı toz ve pul biber gibi ihraç ürünlerinin yanında, süt ve süt ürünleri ve başta mısır olmak üzere diğer tahıl ürünleri mikotoksinlerle kontamine olabilmektedir (Oruç 2005).

Sterigmatosistin (STC) *A.versicolor*, *A. chevalieri*, *A. ruber*, *A. amstelodami*, *A. aureolatus*, *A. quadrilineatus* ve *A. sydowi* gibi birçok *Aspergillus spp.* küfleri tarafından üretilen bir mikotoksindir (Rabie vd 1977, Lund vd 1995, Reijula ve Tuomi 2003). *Penicillium*, *Bipolaris*, *Chaetomium* ve *Emiricella* gibi diğer türler de bu toksini üretebilmektedirler.

STC'nin akut toksik, mutajenik, sitotoksik ve karsinojenik etkileri araştırılmış ve hepatotoksik, kanserojen ve teratojen etkileri saptanmıştır (Purchase ve Van Der Watt 1969, Cole ve Cox 1981, Davis 1981). Bununla beraber Aflatoksin B1 (AFB1) ile kıyaslanırsa hem daha az toksiktir hem de kanserojen etkisi daha zayıftır. Farelerde saptanan akut toksik doz, öldürücü doz (LD) 800 mg/kg, ördek yavruları için LD<sub>50</sub>=1µg/yumurta olarak belirlenmiştir. STC bazı küfler tarafından çok yüksek miktarda oluşturulduğundan tehlikeli kabul edilmektedir (Tunail 2000).

STC gıdalarda doğal olarak az görülmektedir. Bu nedenle gıdalarda bulunması üzerine sınırlı sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir. STC'nin hububatta, ekmekte, kolzada, soya fasülyesinde, peynirde, baharatlarda, kakao çekirdeğinde, sebzelerde, antep fıstığı çekirdeğinde, kahve çekirdeğinde ve yemlerde bulunduğu dair araştırma sonuç raporları vardır. Ayrıca yüksek seviyelerde STC, *A.versicolor* ile kontamine olmuş meskenlerde ve inşaat malzemelerinde de tespit edilmiştir (Gravesen vd 1999, Nielsen vd 1999, Engelhart vd 2002). Hububatların *Aspergillus* küfleriyle kontaminasyonu, Avrupanın (kuzey, kuzeybatı, kuzeydoğu ve orta Avrupa) iklim koşulları altında özellikle depolama süresince mümkündür. Hububatların hasattan sonra *Aspergillus* ile kontaminasyonu, STC ve AFB1 ile Okratoksin A (OTA) gibi diğer toksinlerin olası üretiminden dolayı sağlık riski içermektedir (Veršilovskis ve De Saeger 2010).

Bu çalışmada Türkiye piyasasında satılan biralarda STC olup olmadığı ve varsa düzeyinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Böylece bu konudaki bilimsel literatüre bir katkı sağlanacaktır.



## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* gibi küf (mantar) cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir. İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde güçlü ve çeşitli toksik etki oluşturmaktadır (Girgin 2001).

Mikotoksinlerin insanlar üzerindeki etkilerini net olarak söyleyebilmek olanaklı değildir. İnsanlar üzerinde direk araştırmalar yürütülemediğinden toksisite denemeleri en duyarlı hayvan olan ördek yavruları, fareler ve ratlar kullanılarak genellikle oral dozlarla bazen de subkutan yolla (deri altı enjeksiyonları ile) yapılır. Bir mikotoksinin toksisitesi belli bir hayvan türü için onun letal dozu (LD<sub>50</sub> değeri) ile belirtilir. Bu değer hayvanlarda kg başına, bazen de birey başına düşen doz (mg, µg, ng) olarak verilir. Hayvan denemelerinde akut ve kronik etkileri saptanan mikotoksinlerin insanlar için de tehlikeli olacağından kuşku duyulmamalıdır (Tunail 2000).

Mikotoksinler bütün toksikolojik sendromlar gibi akut veya kronik olarak karakterize edilebilmektedir. Akut toksisite hızlı bir şekilde ortaya çıkarak belirgin toksik cevaplar oluştururken, kronik toksisite uzun süreçlerde etki gösteren düşük dozlar sonucu örneğin kanser gibi geri dönüşü olmayan etkilerle karakterize edilmektedir. İnsan ve hayvanlarda ortaya çıkan mikotoksin kaynaklı sağlık sorunlarının neredeyse tamamı kronik olarak nitelendirilmektedir (Bennett ve Klich 2003).

Mikotoksinlerin vücutta etkili oldukları organ ve dokulara göre veya etki mekanizmalarına bağlı olarak çeşitli etkilerinden söz edilmektedir. Karaciğere etki edenler "hepatotoksik", deriye etkili olanlar "dermatoksik", böbreklerde toksik etki yapanlar "nefrotoksik", sinir sistemine etki edenler "nörotoksik", bağışıklık sistemini etkileyenler "immunotoksik" veya "immunosupresif" olarak tanımlanmaktadır. Toksik etkilerinden başka; mutajenik, kanserojenik, teratojenik, halusinojenik, östrojenik, tremorjen etkileri de görülebilmektedir (Tunail 2000).

Sonuç olarak mikotoksinler insanlarda; karaciğer kanserine ve gen yapısında değişikliklere yol açar, vücudun hormonal dengesini bozar, bağışıklık sistemini zayıflatır, kısırılığa ve sakat doğumlara neden olur. Ayrıca gıda emilimini azaltır, kemikleri zayıflatır ve vücut direncini düşürerek vücudu hastalıklara açık hale getirir. Çizelge 2.1'de mikotoksin çeşitleri, bunların kaynakları, hedef hayvan, doku veya organlar ve etkileri görülmektedir.

Çizelge 2.1. Mikotoksin çeşitleri, bunların kaynakları, hedef hayvan, doku veya organlar ve etkileri (Kaya 2001).

| Mantar Çeşidi   | Mikotoksinler                   | Kaynaklar                                | Hedef organ, doku ve oluşan etki   | Etkilenen canlılar             |
|---|---------------------------------|--|--|--------------------------------|
| <i>A.flavus</i><br><i>A.parasiticus</i><br><i>P.puberulum</i>           | Aflatoksinler                   | Tahıllar,yemler ve yağlı tohum küspeleri | Karaciğer; gelişme hızı ve verimde azalma, sarılık, kanama, sürgün, karaciğer kanseri ve bağışıklık sisteminin baskılanması      | Tüm hayvan türleri ve insanlar |
| <i>A.ochraceus</i><br><i>P.viridicatum</i>                              | Okratoksinler                   | Tahıllar ve otlar                        | Karaciğer ve böbrek hasarı, iştah kaybı, ishal ve bağışıklık sisteminin baskılanması   | Kanatlılar ve insanlar         |
| <i>P.rubrum</i>   | Rubratoksinler                  | Tahıllar, baklagiller ve yağlı tohumlar  | Aflatoksine benzer etki gösterirler  | Tüm hayvan türleri             |
| <i>F.roseum</i> ve diğer <i>Fusarium</i> türleri                        | Zearelenon                      | Tahıllar                                 | Östrajenik etki  | Geviş getirenler ve domuzlar   |
| <i>P.citrinum</i>   | Sitrinin                        | Tahıllar                                 | Sinirsel belirtiler, ishal, gelişme geriliği, karaciğer ve böbrek nekrozu, kalp ve iskelet kasında miyopati ve karaciğer kanseri | Kanatlılar ve domuzlarda       |
| <i>A.versicolor</i><br><i>A.nidulans</i>                                | Aspertoksin<br>Sterigmatosistin | Tahıllar, pirinç ve yemler               | Karaciğer kanseri  | Tüm hayvan türleri             |
| <i>A.clavatus</i><br><i>P.patulum</i>                                   | Patulin                         | Slaj, elma ve yemler                     | Sinirsel belirtiler, beyin kanaması ve deri kanseri  | Sığırlar                       |
| <i>A.ochraceus</i><br><i>P.puberulum</i>                                | Penisillik asit                 | Tahıllar ve mısır                        | Deri kanseri ve kanamalar  | Tüm hayvan türleri             |
| <i>Fusarium</i> ,<br><i>Trikoderma</i> ,<br><i>Sefalosporium</i><br>vb. | Trikotesenler                   | Tahıllar ve yemler                       | Dermatit, deride nekroz, kanamalar, anemi ve granulositopeni vb.   | Tüm hayvan türleri             |
| <i>P.citreoviridae</i>  | Streoviridin                    | Pirinç ve tahıllar                       | MSS, kalp ve solunum felci ve çarpınmalar  | Tüm hayvan türleri             |
| <i>F.tricinatum</i>   | Butenolid                       | Mısır, ot ve tahıllar                    | Bacaklarda gangren ve kuyrukta nekroz  | Sığırlar                       |
| <i>Penicillium</i> türleri  | Penitremler                     | Tahıllar                                 | Kas titremeleri, felç ve çarpınmalar   | Tüm hayvan türleri             |
| <i>Fusarium</i> türleri   | Fuminosinler                    | Mısır                                    | Beyin ve akciğer yangısı   | At, domuz ve kanatlılar        |
| <i>A.flavus</i><br><i>A.oryzae</i>                                      | Kojik asit                      | Mısır                                    | Çarpınmalar ve ödem  | Tüm hayvan türleri             |
| <i>A.niger</i><br><i>A.oxalicum</i>                                     | Okzalik asit                    | Bitkiler                                 | Mide irkiltisi, MSS ve böbrek hasarı, kanama ve kan kalsiyum düzeyinde azalma  | Tüm hayvan türleri             |
| <i>C.purpurea</i><br><i>C.paspali</i>                                   | Ergot alkaloidler               | Tahıllar                                 | Kuru gangren, aşırı uyarı ve kanın pıhtılaşması  | Tüm hayvan türleri             |
| <i>Stachybotrysatra</i>   | Satratoksinler                  | Tahıllar, otlar                          | Kemik iliği, deri ve mukozalar   | Tüm hayvan türleri             |
| <i>Aspergillus</i> ,<br><i>Zygosporium</i><br><i>Nigrosabulum</i> vb.   | Sitakalasanlar                  |  | Hücre zarları, pıhtılaşma, fagasitöz vb.   | Tüm hayvan türleri vb.         |
| <i>A.terreus</i>  | Territremler                    | Tahıllar, otlar                          | MSS, tremorlar, neromuskuler kavsaklar   | Tüm hayvan türleri             |
| <i>S.sclerotiorum</i>   | Psoralenler                     | Kereviz vb.                              | Deri yangısı   | Tüm hayvan türleri             |



## 2.2. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Mikotoksin oluşumuna nem, su aktivitesi ( $a_w$ ), sıcaklık, substrat bileşimi, pH, rekabetçi küf, mikroorganizma gelişimi ve bitki üzerindeki mekanik hasar etkilidir. Tarım ürünü veya gıdanın nem içeriği, atmosfer bağıl neminden etkilendiğinden sıcaklıkla birlikte bağıl nem öncelikle fungus sporlarının çimlenmesini ve misellerin gelişmesini ardından da toksin oluşumunu etkileyen en önemli faktördür. Ayrıca tarım ürününün veya gıdanın çeşidi, kimyasal bileşimi, ürünün yetiştirildiği klima zonu, ürünün olgunluk durumu, hasat, işlemler, depolama bulaşan küflerin spektrumuna etki eden diğer faktörlerdir. Her şeyden önce tarımsal ürünün veya gıdanın küf spektrumunda bulunan küflerin potansiyel mikotoksin üreticisi olup olmadıkları önem taşır. Kontamine küfler mikotoksin üreticisi olsalar bile toksinin sentezlenmesinde; ürünün nem içeriği, sıcaklık, işleme ve depolamada havanın bağıl nemi etkindir. Ayrıca atmosferik oksijen, diğer modifiye atmosfer gazları, ışık, süre, asitlik (pH) gibi faktörlerin de etkisi vardır (Ominsk vd 1994, Tunail 2000, Weidenböner 2001, Kapetanakou vd 2009).

Spadaro vd (2010) OTA oluşumuna  $a_w$ , pH ve sıcaklığın etkisinin araştırdıkları çalışmada *A. carbonaris* için  $a_w$  0.98, pH 4 ve 30 °C sıcaklıkta maksimum seviyede OTA üretiminin olduğunu tespit etmişlerdir.

Mikotoksin oluşumunu; karbonhidratlar (glukoz, sakkaroz vb.), belli aminoasitler (asparagin, glycin vb.) ve yağ asitleri arttırmaktadır. Bitkisel ürünler yüksek karbonhidrat içerikleri nedeniyle mikotoksin kontaminasyonunda hayvansal ürünlere göre daha büyük risk taşımaktadır. Hayvansal ürünlerden ise özellikle süt riskli gruptadır (Weidenböner 2001).

### 2.2.1. Bağıl nemin veya su aktivitesinin etkisi

Fungusların gıda maddeleri üzerinde gelişebilmeleri ve toksin oluşturmaları atmosferin bağıl nem oranı arttıkça kolaylaşır. Genellikle ortamın nisbi neminin % 50-60, gıdaların nem oranının  $\geq 9$  olduğu durumlarda kolayca gelişerek mikotoksin sentezleyebilirler. Örneğin *Aspergillus flavus* ve *Aspergilluslar* % 13-18 rutubet içeren gıdalarda kolayca gelişerek çoğalırlar. Fungusların gıdalarda gelişme ve toksin oluşturmaları gıdanın düşük su aktivitesi ( $a_w$ ) değeri ile sınırlandırılabilir veya engellenebilir (Marquardt ve Frohlich 1992).

Funguslar bakterilerle kıyaslandıklarında daha düşük bağıl nemde gelişebilirler. Optimum gelişmeleri için minimum  $a_w$ : 0.97 – 0.99 değerlerini talep etmelerine karşın min.  $a_w$ : 0.80 – 0.85 değerlerinde de rahatlıkla çimlenebilir ve gelişebilirler. Kserofilik *Eurotium* türleri ve *Monascus (sin. Xeromyces) bisporus* min  $a_w$ : 0.61 – 0.62 değerlerinde bile varlıklarını sürdürürler.

*Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium*'un minimum  $a_w$  değerleri karşılaştırıldığında *Penicillium* ve *Fusarium*'ların daha yüksek minimum  $a_w$  değerleri istedikleri, mikotoksin üreticisi bazı önemli *Aspergillus* türlerinin min.  $a_w$ : 0.80 değerlerinin altında, min  $a_w$ : 0.70 - 0.71 değerlerinde bile gelişebildikleri görülür. O nedenle *Aspergillus*'lar kserofilik küflerden sayılırlar. *Penicillium* cinsinden yalnızca *Penicillium aurantiogriseum* minimum  $a_w$ : 0.79 değeri gösterir. Mikotoksin üretimi için

gereken minimum  $a_w$  değerleri, gelişim için talep edilen minimum  $a_w$  değerlerinden daha yüksektir. Her bir mikotoksin, kendisini sentezleyen küf türüne bağlı olarak farklı  $a_w$  değerinde oluşturulur. Örneğin *Aspergillus clavatus* patulini sentezlemek için minimum  $a_w$ : 0.99 değerini, *Penicillium griseofulvum* ise minimum  $a_w$ : 0.85-0.95 değerini talep eder. AFB1 ve okratotoksin genel olarak minimum  $a_w$ : 0.83-0.90 değerlerinde oluşturulur. Havanın bağlı neminin % 80'den % 86'ya yükselmesi veya daha fazla artması durumunda hem küf gelişimleri hızlanır, hem de mikotoksin sentezleri için minimum  $a_w$  değerlerine ulaşılır. Aflatoksin üreticisi *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'un reçel ve marmelatlarda üreyememe nedenleri, yüksek miktarda bulunan şekerin suyu bağlayarak, bağlı olmayan, yarayışlı su miktarını düşürmesidir. Bu iki *Aspergillus* türü kserofilik özelliktedir, ancak ozmofilik karakterli değildir (Tunail 2000).

Tahıllarda %20-25 arasında nem içeriği bulunduğunda mikotoksin oluşumu maksimum miktarda olmaktadır. Bu nedenle nem miktarının; tahıllarda %13'ten az, yüksek yağ içerikli tohumlarda ise %7'den az olması gerektiği belirtilmiştir (Weidenbörner 2001).

### 2.2.2. Sıcaklığın etkisi

Küflerin üremeleri geniş sıcaklık aralıklarında olabilir, fakat her küf türünün optimum üreme sıcaklığı farklılık gösterir. Küflerin en yüksek miktarda mikotoksin sentezlemeleri ise o küf türünün optimum üreme sıcaklığında veya bu sıcaklık değerinin biraz altında olmaktadır. Aflatoksin üreten küfler minimum 6-8 °C lerde maksimum 50-60 °C lerde üreyebildikleri halde toksin oluşumu için minimum 10-13 °C ve maksimum 42 °C sıcaklık isterler. Bunların optimum gelişmeleri 35-38 °C olduğu halde maksimum toksin konsantrasyonuna 25-30 °C lerde ulaşılır. *Penicillium* ve *Fusarium*'ların düşük sıcaklıklarda (< 5 °C) gelişebilmelerine karşılık *Aspergillus* türleri bu sıcaklıklarda üreyemez ve toksin oluşturamaz. İçlerinden sadece *Aspergillus ochraceus* diğer *Aspergillus* türlerine oranla daha düşük sıcaklık derecelerinde OTA sentezleyebilir (Tunail 2000, Kaya 2001, Agag 2004).

+4 °C nin altındaki sıcaklık değerlerinde mikotoksin oluşumunun önlenebileceği belirtilmektedir (Weidenbörner 2001). Tahıl ve diğer bazı tarımsal ürünlerin OTA ile kontaminasyonunda; tropik ve subtropik iklimlerde *Aspergillus ochraceus* sorumlu tutulurken, serin ve soğuk iklimlerde *Penicillium verrucosum* (sin. *Pen. viridicatum*) ağırlıklı olarak rol oynar. Soğukta kalmış ve  $a_w$  değeri oldukça yüksek tahıllarda *Fusariumlar* ön plandadır ve trikotesen grubu mikotoksinleri oluştururlar. Uzun süre depolanacak tahıllarda özellikle soğuk ve serin iklimlerde danelerin %13.5'a veya daha aşığı nem içeriğine kadar özel kurutma tesislerinde kurutulması ve 10-15 °C lerde depolanması küf gelişmesinin önlenmesi için önerilir. Depolama sıcaklığının daha düşük tutulması durumunda danelerin nem içeriği biraz daha yüksek olabilir (Tunail 2000).

### 2.2.3. Diğer faktörlerin etkisi

Mikotoksin oluşumuna pH'nın, atmosferdeki oksijenin, ışığın ve CO<sub>2</sub>'in etkileri laboratuvar denemeleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu araştırmalar aflatoksin ve patulin üzerine yoğunlaşmıştır.

Fungusların gelişebilmek için daha fazla asit ortamları tercih ettikleri, bununla beraber pH 1.5 - 8.5 arasında gelişebildikleri bilinmektedir. Aflatoksin üreticileri pH 2.5 - 6.0 arasında toksin oluştururlar, ancak yüksek miktardaki üretimi pH 5.0'den başlayarak daha yüksek pH'larda gerçekleştirirler. *Hypomyces* sınıfında bazı küflerin atmosfer oksijeni azaldığında üremelerinin yavaşladığı ancak durmadığı görülür. Enerjilerini oksidatif fosforilasyon ile sağlayan bu küfler, oksijen yokluğunda veya azalmasında alkol fermentasyonunu alternatif yol olarak kullanabildiklerinden gelişmelerini sürdürebilirler (Tunail 2000).

Küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu, düşük O<sub>2</sub> konsantrasyonu (< %1) ve yüksek konsantrasyonlarda CO<sub>2</sub> ile inhibe edilmektedir. Yüksek konsantrasyonlu CO<sub>2</sub>'nin, yüksek konsantrasyonda N<sub>2</sub> ve düşük konsantrasyonda O<sub>2</sub> uygulamasından daha etkili olduğu belirlenmiştir. Özel gaz kompozisyonlarına toleransı, sıcaklık ve su aktivitesi (a<sub>w</sub>) etkilemektedir (Weidenbörner 2001).

### 2.3. Sterigmatosistin

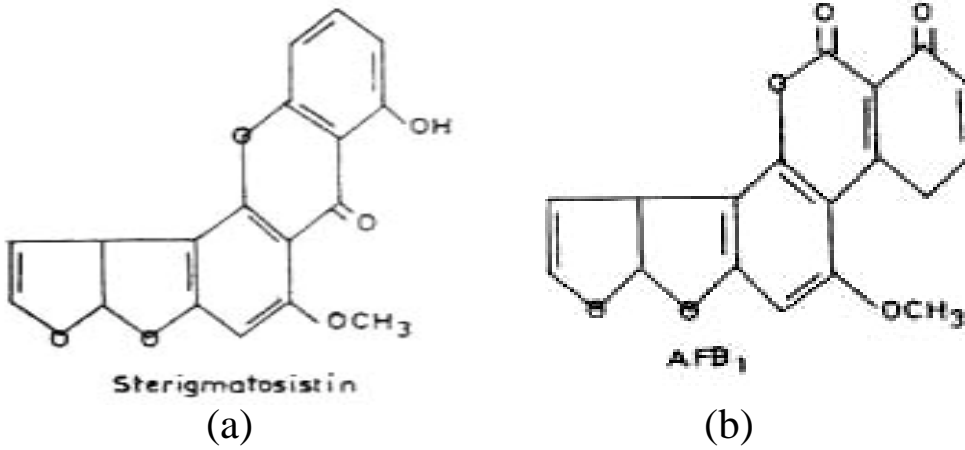
Sterigmatosistin hayvanlarda farklı toksikolojik, mutajenik ve karsinojenik etkiler gösteren ve Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü tarafından 2B kanserojen madde olarak sınıflandırılan, yaklaşık 15 çeşit küf tarafından üretilen toksik bir metabolittir. Sterigmatosistin en önemli üreticisi *Aspergillus versicolor*'un belli suşlarıdır (Cole 1976, Veršilovskis ve De Saeger 2010). *Emerciella nidulans*, *Asp. sydowii*, *Eurotium amstelodamii*, *Bipolaris spec.* de bu mikotoksini oluşturabilir. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus rugulosus* ve *Aspergillus ustus*'da içeren *Aspergillus*'un diğer türleri tarafından da sterigmatosistin üretildiği bulunmuştur (Davis 1981).

Aflatoksin biyosentezinde de ara ürün olarak görülen sterigmatosistin bir endotoksin olup suda çözünmez ve ortama salgılanmaz. Ancak misellerin parçalanması veya otoliz sonucu ortama geçer. Aflatoksine benzer bir yapı göstermesine karşılık toksin kumarin bileşiği değildir. Bileşik UV ışınları altında brik rengi floresan verir.

*Aspergillus versicolor* 4-40 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişir. Optimum gelişme sıcaklığı 25-30 °C olan fungus sterigmatosistini 15-32 °C lerde sentezler. *Aspergillus versicolor* kserofil funguslardandır ama ozmofil karakterli değildir. Gelişmek için minimum a<sub>w</sub>=0.74-0.78 değerini gereksinir. Bu değer altında gelişemez, a<sub>w</sub>=0.84'ün altında ise konidilerinin çimlenmesi engellenir. Reçel, konfitür, marmelat gibi ürünlerde %30 oranında şeker bulunması sterigmatosistin oluşumunu engeller (Tunail 2000).

#### 2.3.1. Sterigmatosistin kimyasal yapısı

Sterigmatosistin, açık sarı renkte ve iğne şeklinde kristaller oluşturabilmektedir. Metanol, etanol, acetonitril, benzen ve kloroformda kolay çözünür. Sıcak etanolik potasyum hidroksit ile reaksiyona girer ve metil sülfat ve metil iyodad ile metillenir (Desphande 2002). Erime noktası 246 °C, UV ışığı absorbe ettiği maksimum dalgaboyu 245-325 nm, moleküler formülasyonu C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> dır. Yapısal olarak AFB1'e benzerdir (Bkz. Şekil 2.1a, b) ve aynı 7,8 -dihidrofuro (2,3-b) furan yapısına sahiptir (Rodricks 1969, Tunail 2000).



Şekil 2.1. a) STC kimyasal formülü, b) Aflatoxin B1 kimyasal formülü

Septien vd (1993) sterigmatosistin'in farklı organik çözücülerdeki çözünürlüğü ve stabilitesi üzerine yaptıkları çalışmada sterigmatosistin'in 7 ve 30 günden sonra kloroformda daha dayanıklı olduğunu, kloroform ve piridinde daha çözünür olduğunu tespit etmişlerdir. Dondurucu depolamada sadece kloroformda %90 geri kazanım elde edilmiştir. Sterigmatosistin standart solüsyonunun depolama ve çözünürlüğü için en uygun çözücünün kloroform olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Çizelge 2.2'de görülmektedir.

Çizelge 2.2. Sterigmatosistin'in farklı organik çözücülerdeki çözünürlük oranları ve soğuk ve dondurucu depolamadaki stabilitesi (Kontaminasyon miktarı: 5 µg STC) (Septien vd 1993)

|                   |              | % Stabilité    |        |                      |        |
|-------------------|--------------|----------------|--------|----------------------|--------|
|                   |              | Soğuk depolama |        | Doncurucuda depolama |        |
| Organik solvent   | % Çözünürlük | 7 gün          | 30 gün | 7 gün                | 30 gün |
| Benzen            | 95.80        | 93.80          | 81.20  | 91.50                | 80.05  |
| Toluen            | 91.77        | 87.10          | 75.56  | 89.36                | 71.23  |
| Etiler            | 95.43        | 88.24          | 83.26  | 81.80                | 81.73  |
| Etil asetat       | 90.84        | 88.68          | 88.17  | 91.21                | 89.88  |
| Aseton            | 92.15        | 84.65          | 81.07  | 93.04                | 81.58  |
| Asetonitril       | 94.65        | 99.27          | 70.93  | 93.48                | 73.43  |
| Kloroform         | 101.05       | 101.03         | 95.55  | 95.97                | 95.88  |
| Metanol           | 89.16        | 97.09          | 74.60  | 90.01                | 74.11  |
| Kloroform:metanol | 89.30        | 95.40          | 90.35  | 90.48                | 72.68  |
| Piridin           | 101.26       | 99.01          | 83.36  | 98.90                | 83.58  |

### 2.3.2. Sterigmatosistinin toksisitesi

Sterigmatosistinin akut toksik, mutajenik, sitotoksik ve karsinojenik etkileri araştırılmıştır (Purchase ve Van Der Watt 1970, Noda vd 1981, Terao 1983, Sreemannarayana vd 1987). STC'nin hepatotoksik, kanserojen ve teratojen etkileri saptanmıştır (Purchase ve Van Der Watt 1969). Bununla beraber AFB1 ile kıyaslanırsa hem daha az toksiktir hem de kanserojen etkisi daha zayıftır. Fakat kontamine gıdalarda aflatoksine göre daha fazla miktarda STC üretildiğinden insan ve hayvan sağlığı için önemli bir tehlikedir. STC' nin toplam etkisi açısından insan ve hayvanlar için çok daha potansiyel olan aflatoksinden daha az tehlikelidir denemez (Holzapfel vd 1966). Farelerde saptanan akut toksik doz LD<sub>50</sub>=800 mg/kg, ördek yavruları için LD<sub>50</sub>=1µg/yumurta olarak belirlenmiştir. Sterigmatosistin bazı küfler tarafından çok yüksek miktarda oluşturulduğundan tehlikeli kabul edilir (Tunail 2000).

STC, çoğu test edilmiş hayvanın akciğeri için akut toksiktir ( Purchase ve Van der Watt 1969, Purchase ve Pretoriu 1973). Karsinojenitesi uygulama sıklığına ve yoluna ve türe göre değişmekle birlikte organ özgüllüğü ile kanıtlanmıştır ( Purchase ve Van der Watt 1970).

Purchase ve Van der Watt'ın (1970) sıçanlar üzerinde STC'nin akut toksisitesinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada, STC'nin akut oral LD<sub>50</sub> değerinin uygulama aracı olarak difenilformamid ve buğday tohumu yağı kullanılan dişi sıçanlarda 120 mg/kg, erkek sıçanlarda ise 166 mg/kg olduğu tespit edilmiştir. İntraperitoneal olarak, sırasıyla difenilformamid ve buğday tohumu yağının uygulama aracı olarak kullanıldığı erkek sıçanlarda akut LD<sub>50s</sub> değeri 60 ve 65 mg/kg dır. Ölüm sonrası asıl bulgular akciğer ve böbreklerin nekrozudur. Akciğerde nekrozun yeri toksinin uygulama şekline göre değişmektedir. Ağır kanama, böbrek tübüllerinin şiddetli nekrozu ve glomerül yüksek dozlarda (144 mg/kg) meydana gelmektedir fakat belirgin dejeneratif değişiklikler düşük dozlarda (10-100 mg/kg) da görülmektedir. Böbreklerdeki zararın derecesinin, uygulamanın şekline ve uygulama aracına bağlı olduğu görülmüştür.

Noda vd'nin (1981) üretilmiş Çin hamster hücrelerinde STC'nin mutajenik ve sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada, metabolik aktivasyon sisteminin varlığında ve yokluğunda sterigmatosistinin etkilerini araştırmışlardır. Aktivasyon sisteminin varlığında STC'nin mutajenik ve sitotoksik etkileri son derece artmıştır ve %1 mikrozom fraksiyonu indüklemeye etkileri içinde en etkilisi olduğunu görülmüştür.

Schroeder ve Kelton'un (1975) STC'nin tavuk embriyosu üzerine toksisitesini araştırdıkları çalışmada, 5 günlük embriyoda 1 ve 2 µg/yumurta arasında STC'nin toksik etkisi görünmezken, asıl öldürücü dozun 5-7 µg da ve 10 µg da ise embriyoların %90-100 oranında öldüğünü tespit etmişlerdir. Teratojenik etki ve ağırlık kaybının genellikle öldürücü olmayan dozla ilişkili olduğunu göstermektedir.

Farelerde STC intraperitoneal enjeksiyon (Fujii vd 1976) veya ağız yoluyla uygulamadan (Dickens vd 1966) sonra hepatoselüler kansere, deriye tekrarlanmış uygulamadan (Purchase ve Van der Watt 1973) sonra ise skuamöz hücre kanserine neden olmaktadır.

Rabie vd'nin (1977) STC üreten *Aspergillus*'un yeni türleri üzerine yaptıkları çalışmada, *Aspergillus aurantio-brunneus*, *Aspergillus quadrilineatus* ve *Aspergillus ustus* adında 3 yeni *Aspergillus* türünün, sterigmatosistin ürettiğini rapor etmişlerdir. *Aspergillus rugulosus*'un sterigmatosistin ürettiği doğrulanmış, *Aspergillus stellatus* ve *Aspergillus multicolor*'ın toksisitesi tanımlanmıştır.

Mahrous vd (2006) STC'nin toksisitesi ve klastojenitesinin (kromozom kusuruna neden olma) değerlendirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada STC'nin *Oreochromis niloticus* balığı üzerinde genotoksik ve toksipatolojik etkisinin olduğu tespit etmişlerdir. Genotoksik etkiler sabit bantların kaybolması veya yeni bantların oluşumunu da içeren polimorfizm band çiftlerinde bazı değişiklikler şeklinde görülmüştür.

STC'nin karsinojenik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, STC 52 hafta boyunca diyet veya sonda ile beslenen sıçanlara günlük 0.15-2.25 mg oranında uygulanmış ve yüksek dozda STC alan 8 sıçan 5-18 hafta içerisinde ölmüştür. 50 sıçandan 42. haftaya kadar yaşayan 39 sıçanda sonunda hepatoselüler karsinoma gelişmiştir. Bunlardan 31 tanesinde çeşitli derecelerde fibrosis görülmüştür. Değişik organlarda 8 tümör ve deney sıçanlarının %85 inin midesinde akantotik değişiklikler meydana gelmiştir. STC'e maruz kalan sıçanların akciğerinde görülen lezyonlar Bantu da bulunan hepatom ve toksik hepatitis ile benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular Afrika'da yüksek oranda akciğer kanserinin görülmesinin mikotoksinlerin yemekle alınmasıyla ilişkili olabileceğini desteklemektedir (Purchase ve Van der Watt 1969).

STC'nin civcivler üzerinde akut toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, LD<sub>50</sub> değeri 10.0 ve 14.0 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde STC zeytinyağında çözülerek enjekte edilmiş ve enjeksiyondan 9 ile 21 saat arasında ölüm meydana geldiği görülmüştür. Histopatolojik çalışmalar, böbrekte tübüler dejenerasyon ve nekroz; akciğerde ise sinüzoidlerde fibroblastik çoğalma ile nekroz ve kanama olduğunu kanıtlamıştır (Sreemannarayana vd 1987). Vesonder ve Horn (1984) tarafından 7.75 µg/g STC içeren yemle beslenen mandıra sığırlarında kanlı ishal ve ölüm gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Yemden izole edilen 9 adet *A.versicolor*'ın 13-89 µg/g STC ürettiği, sıvı kültürde ise daha az miktarda STC ürettiği belirtilmektedir.

### 2.3.3. Sterigmatosistin üreten küfler ve gelişme şartları

Yapısal olarak aflatoksin benzeyen sterigmatosistin, aslen *Aspergillus versicolor*'ın bir metaboliti gibi izole edilmiştir. STC *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus aureolatus*, *Aspergillus quadrilineatus* ve *Aspergillus sydowi* gibi birçok *Aspergillus* spp. küfleri tarafından üretilen bir mikotoksin (Scroeder ve Kelton 1975, Rabie vd 1977, Lund vd 1995, Reijula ve Tuomi 2003). *Penicillium*, *Bipolaris*, *Chaetomium* ve *Emiricella* gibi diğer türler de bu toksini üretebilirler. Daha sonraları *Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus rugulosus* ve *Aspergillus ustus*'da içeren *Aspergillus*'un diğer türleri tarafından üretildiği bulunmuştur (Davis 1981).

STC'nin asıl üreticisi olan *Aspergillus versicolor* düşük su aktivitesinde (<0.8) gelişebildiğinden kserofiliktir. *Aspergillus versicolor* için minimum ve maksimum büyüme sıcaklığı 4-40 °C, optimum sıcaklık ise 30 °C'dir.

Rabie vd (1976) katı ve yarı sentetik ortamda *Aspergillus versicolor* ve *Bipolaris sorokiniana* ile yaptıkları çalışmada, her iki ortamda da *Aspergillus versicolor* tarafından daha fazla STC üretildiği tespit edilmiştir. *Aspergillus versicolor* için optimum STC üretim sıcaklığı 27-29 °C iken, *B. sorokiniana* için 23 °C dir. Sıvı kültürde *B. sorokiniana* tarafından üretilen STC miktarı ihmal edilebilir düzeyde iken *Aspergillus versicolor* tarafından 210 mg/litre STC üretildiği görülmüştür. Katı ortamda ise *Aspergillus versicolor* tarafından 8 g/kg STC üretilmiştir.

*Aspergillus* sınıfındaki birçok tür, ördek yavruları için STC üretimi ve toksisitesi üzerine değerlendirilmiş olup, *Aspergillus aurantio-brunneus*, *Aspergillus quadrilineatus* ve *Aspergillus ustus*'un STC ürettiği bulunmuştur. Bu üç yeni türün ördek yavruları için toksik olduğu tespit edilmiştir (Rabie vd 1977).

Halls ve Ayres'in (1975) yaptıkları çalışmada, sitrik asit döngü bileşikleri ile bağlı olarak kullanıldığında, inorganik fosfatın *Aspergillus versicolor* tarafından STC üretiminin arttığını tespit etmişlerdir.

#### 2.3.4. Gıdalarda bulunması

Sterigmatosistin gıdalarda doğal olarak az görülür. Bu nedenle gıdalarda bulunması üzerine sınırlı sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir. STC'nin hububatta, ekmekte, kolzada, soya fasülyesinde, peynirde, baharatlarda, kakao çekirdeğinde, sebzelerde, antep fıstığı çekirdeğinde, kahve çekirdeğinde ve yemlerde bulunduğu dair araştırma sonuç raporları vardır. Ayrıca yüksek seviyelerde STC, *Aspergillus versicolor* ile kontamine olmuş meskenlerde ve inşaat malzemelerinde de tespit edilmiştir (Gravesen vd 1999, Nielsen vd 1999, Engelhart vd 2002). Hububatların *Aspergillus* küfleriyle kontaminasyonu, Avrupanın (kuzey, kuzeybatı, kuzeydoğu ve orta Avrupa) iklim koşulları altında özellikle depolama süresince mümkündür. Hububatların hasattan sonra *Aspergillus* ile kontaminasyonu, STC ve AFB1 ile OTA gibi diğer toksinlerin olası üretiminden dolayı sağlık riski içermektedir (Veršilovskis ve De Saeger 2010).

STC'nin; küflü buğday (Scott vd 1972, Atalla vd 2003), yem (Lepom 1986), pirinç (Takahashi vd 1984) ve yerfıstığında (Youssef vd 2008) küf metaboliti olarak bulunduğu rapor edilmiştir. *Aspergillus versicolor* ile inokülasyondan sonra jambonda yüksek seviyede STC üretildiği tespit edilmiştir (Halls ve Ayres 1973). *Aspergillus versicolor* sporları ile inoküle edilmiş farklı tip ekmeklerin (buğday, arpa, tam buğday v.s.) araştırılması süresince STC konsantrasyonunun 10 gün depolama sonunda 100-400 µg/kg'a ulaştığı bulunmuştur (Reiß 1976).

Son 30-40 yıl süresince STC'nin çeşitli ürünlerde doğal olarak bulunması üzerine sadece birkaç tane araştırma gerçekleştirilmiştir. Buckle (1983) tarafından 1976-1979 yılları süresince hububatları, yem bileşiklerini, saman ve silajı da kapsayan 4000'in üzerinde hayvan yem maddelerini küf ve mikotoksin açısından araştırıldığı

bildirilmektedir. Bu kontrol etme, rutin danışma ve inceleme sonucunda Agricultural Development and Advisory Service (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) İngiltere ve Wales'deki Mikrobiyoloji Laboratuvarları tarafından çiftlik hayvanlarının sağlığı ve üretim problemleri ile tohum depolarındaki sorunlarla bağlantılı olarak gerçekleştirilmiştir. Genellikle *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri tarafından sarılmış küflü hububatların okratoksin A, sitrinin, zearelenon ve STC ile kontamine olduğunu bulmuşlardır (523 tohum örneğinden 17'sinin ve 1 saman örneğinin STC için pozitif olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın olumsuz yanı analitik metodun yüksek tayin limiti değerinin (LOD) (20 mikrogram/kg) yüksek olmasıdır. Brezilya'da yapılan diğer bir çalışmada, analiz edilen 286 örnekte (mısır, maniok unu, kuru fasulye) STC tespit edilmemiştir (Soares ve Roriguez-Amaya 1989). Ancak bu çalışmada da uygulanan metodun LOD (15-35 µg/kg) değeri biraz yüksektir. Türkiye'de 1989 yılında yapılan bir çalışmada, 167 mısır örneği STC açısından analiz edilmiştir. LOD değeri 20 µg/kg olmak üzere 10 örnekte STC tespit edilmiştir (Ozay ve Heperkan 1989). Ayrıca 1972 de Kanada'da buğday örneklerinde sterigmatosistine rastlanmıştır (Scott vd 1972). 1975'de Japonya'da pirinçte ve hayvan yeminde; 1977'de Polonya'da kahve çekirdeğinde; 1982'de Hindistan'da mısırdaki sterigmatosistin varlığının araştırıldığı bildirilmektedir (Veršilovskis ve De Saeger 2010). 1994'de Mısır'da 24 çeşit baharattan oluşan 120 farklı örnekte doğal mikotoksin varlığı araştırılmış ve kırmızı biber, Frenk kimyonu, kimyon ve origanum örneğinden oluşan 10 örnekte konsantrasyon aralığı 18-23 µg/kg arasında değişen sterigmatosistin tespit edilmiştir (El-Kady vd 1995). Diğer bir çalışma UK de 1996'da gerçekleştirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada LC-MS metod sterigmatosistin tespitinde kullanılmıştır. LOD değerleri peynir, ekmek ve mısır ürünlerinde 1.7 ile 2.4 µg/kg arasında bulunmuştur. Örneklerin hiçbirinde STC'ye rastlanılmamıştır (Scudamore vd 1996). 2006-2007'de Letonyada farklı tohumlarda (arpa, buğday, karabuğday ve pirinç) yapılan bir araştırmada 215 örnekten 55'inde konsantrasyonu 0.7-83 µg/kg arasında değişen STC bulunmuştur (Veršilovskis vd 2008b). Analiz edilen 26 bira örneğinden 2'sinde konsantrasyonu 4.0-7.8 µg/kg arasında değişen STC bulunduğuna dair sadece bir kayıt vardır (Veršilovskis vd 2008a). Küçük miktarlarda veya gıda maddelerinde bulunan küflerden izole edilen STC'nin bulunmasıyla ilgili tohum ve ekmekte (Takahashi vd 1984, Scott vd 1972, Begum ve Samajpati 2000), soya fasülyesi ve yer fıstığında (Begum ve Samajpati 2000, Shannon ve Shotwell 1976), pirinçte (Begum ve Samajpati 2000), kakao çekirdeğinde (Hurst vd 1987), bitkilerde (Thurm vd 1979b), yer fıstığında (Sommer vd 1976), kahve çekirdeğinde (Scudamore vd 1997), ve yemde (Versonnder ve Horn 1985) araştırmalar yapılmıştır.

Takahashi vd (1984) *Aspergillus versicolor* tarafından doğal olarak enfekte edilmiş kahverengi pirinç tanelerinde mantar miselyumu ve sterigmatosistin dağılımı üzerine yaptıkları çalışmada, farklı öğütme seviyelerinde öğütülmüş pirinç ve pirinç kepeğinde mikotoksin seviyesi florodansitometre tarafından belirlenmiş ve mikotoksin konsantrasyonunun % 97.7 den % 56.4 e kadar öğütme derecesine bağlı olarak %71.6 dan %7.7 ye düştüğü belirlenmiştir.

STC'nin peynirlerde bulunmasıyla ilgili çalışmalar da vardır. Süt ürünlerinde STC'yi de içeren mikotoksinlerin varlığı iki sebepten kaynaklanmaktadır. Birincisi dolaylı kontaminasyon olup, kontamine yemlerle beslenen hayvanlar aracılığıyla olurken; ikincisi direkt kontaminasyon olup, süt ürünleri üzerindeki küflerin kazara



veya kasıtlı olarak büyümesinden dolayı olmaktadır (Sengun vd 2008). *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* gibi aflatoksin üreten küfler peynir üzerinde nadir bulunurken, *Aspergillus versicolor* sıklıkla bulunmaktadır. Peynir olgunlaştırma odasından ve peynir üzerinden izole edilen *Aspergillus versicolor*'un sterigmatosistin üretebildiği belirlenmiştir (Lund vd 1995). Depolarda olgunlaştırma süresince, evde veya markette dilimleme ve kesme sonrası depolama süresince peynir kolaylıkla küflenebilirken, STC ile kontamine olma olasılığı da yüksektir.

*Aspergillus versicolor* ile kontamine edilmiş peynirde STC tespit edilmiştir (Scott 1989). Northolt vd (1980) Hollanda'da depolarda olgunlaştırılan Gouda ve Edam peynirlerinde STC'nin bulunduğunu rapor etmişlerdir. 39 peynir örneğinden 9'unda 5-600 µg /kg aralığında değişen konsantrasyonlarda STC bulunmuştur. Van Egmond vd (1980) STC'nin, kontamine peynirlerde farklı sıcaklıklarda (-18 °C den 16 °C ye) 3 aylık periyotda kararlı olduğunu belirtmiştir. Bullerman tarafından düşük sıcaklıkların (5-7 °C) *Aspergillus versicolor*'ın büyümesini ve depolama ve olgunlaşma süresince STC üretimini engellediği, bu sıcaklıklarda *Penicillium* türlerinin gelişebileceği, onların ise aflatoksin veya STC üretmediği belirtilmiştir (Versilovskis ve De Saeger 2010).

Mısırdaki Ras peynirlerde STC'nin bulunması, dağılımı ve kararlılığı üzerine çalışılmıştır. Örneklerin %35'inin pozitif olduğu, konsantrasyon aralığının 10-63 µg/kg aralığında değiştiği ve ortalama konsantrasyonun 22 µg/kg olduğu bulunmuştur. *A.versicolor* sporları ile kontamine olan Ras peynirlerde, olgunlaştırmanın 45. gününden sonra toksin üretimi başlamış ve 90 günden sonra maksimuma ulaştığı tespit edilmiştir. 6 aydan fazla olgunlaştırılan peynirlerde toksin üretiminin engellendiği görülmüştür (Abd Alla vd 1996).

Engel ve Teuber'in (1980) Wilstermash peynirinde STC'nin göçüyle (migrasyon) ilgili yaptıkları çalışmada, *Aspergillus nidulans* ile inokülasyondan ve 27 °C'de 60 gün inkübasyondan sonra maksimum oranda mikotoksin üretildiğini, üretilen mikotoksinlerin peynir yüzeyinden 8 mm içeriye yerleştiklerini bulmuşlardır. Van Egmond vd tarafından benzer sonuçların doğal olarak *Aspergillus versicolor* gelişen Gouda peynirlerinde de elde edildiği bildirilmektedir (Versilovskis ve De Saeger 2010). Veringa vd (1989) tarafından peynir yüzeyinden 1-1.5 cm içinde STC bulunduğu tespit edilmiştir. Versilovskis ve De Saeger'in (2010) bildirdiğine göre; Lafont vd tarafından migrasyonla ilgili yapılan başka bir çalışmada; doğal olarak kontamine olmuş 3 sert peynirin dıştaki 2 cm'lik tabakasında 45-330 µg/kg konsantrasyonda STC tespit edilirken, peynirlerin merkezinde bu toksine rastlanılmadığı belirtilmektedir. Veringa vd (1989) Hollanda'da 1989 yılında peynirlerde STC gelişimini etkileyen faktörler üzerine çalışmalar gerçekleştirmiştir. Laktoz, gliserol, yağ içeriği, olgunlaşma süresince yüksek nem (>%86) ve sıcaklık peynirlerde *Aspergillus versicolor* tarafından STC üretimini uyaran birinci grup faktör olarak belirlenmiştir. Toksin, peynirde %90 bağıl nemde ve 14 °C de olgunlaştırmanın ilk 5-6 haftası süresince sentetik olarak üretilmiştir. Uyarıcı faktörlere bağlı olarak STC konsantrasyonu olgunlaştırmanın 8. gününden sonra 160-700 µg/kg konsantrasyona ulaşmıştır. Peynirlerde STC'nin sentetik ikinci üretiminde konsantrasyon belirgin olarak düşmüştür. Görünüşte peynir yüzeyindeki ince plastik kaplama küflerin gelişimi için gerekli olan düşük moleküllü maddelerin geçişine izin verirken, STC üretiminde önemli olan yağ ve yağ benzeri yüksek moleküllü bileşiklerin difüzyonunu engellemiştir. Bu

yüzden olgunlaştırmanın ilk haftası süresince peynir yüzeyindeki birçok plastik kaplamanın varlığı toksin üretimine karşı etkili bir çare olabilir. Yüksek enfeksiyon yoğunluğunda depolarda küf ve küf sporları ile ağır kontamine havanın sonucu olarak veya zayıf hijyenik durumda rafa kaldırılma, yüksek nemde depolamayla bağlantılı olarak STC üretimi için elverişli koşullar yaratılır. Halls ve Ayres (1975) yarı sentetik ortamda sterigmatosistin üretimini etkileyen faktörleri araştırmış ve sitrik asit çevriminin bileşikler olan sitratlar,  $\alpha$ -ketogluteratlar, suksinatlar, fumarazlar ve malatların STC üretimini artırırken asetatların etkilemediğini tespit etmişlerdir. 2008 yılında Letonya ve Belçika'da peynirlerde de STC varlığı araştırılmıştır. Lokal süper marketlerden alınarak analiz edilen farklı tip ve olgunlukta 21 peynir örneğinden 2'sinde STC tespit edilmiştir. Pozitif örneklerdeki STC konsantrasyonu sırasıyla 0.52 ve 1.23  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , LC-MS/MS metodunun LOD değeri ise 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dır (Veršilovskis vd 2009).

### 2.3.5. Sterigmatosistin tespitinde kullanılan yöntemler

Sterigmatosistin tespitinde esas olarak İnce tabaka kromatografisinin (TLC) kullanıldığı birçok metod vardır. STC'nin gıdalarda tespitine yönelik analitik metodlar iki grup olarak belirlenmiştir. Bunlar immünokimyasal ELISA ve kromatografidir. STC'nin ayrılması (saflaştırma ve konsantrasyonu) ve tespiti için TLC (Vorster ve Purchase 1968, Reiß 1976, Shannon ve Shotwell 1976, Gimeno 1979, Siriwardana ve Lafort 1979, Thurm vd 1979a, Van Egmond vd 1980, Francis vd 1985, Tapio 1985, Versonder ve Horn 1985, Van Egmond ve Paulsch 1986, Francis vd 1987, Volkov 1994, Abramson vd 1997, El-Shanawany vd 2005), HPLC (Sommer vd 1976, Stack vd 1976, Abramson ve Thorsteinson 1989, Veršilovskis vd 2008a), HPLC LC-MS (Scudamore vd 1996), HPLC LC-MS/MS (Sulyok vd 2007, Veršilovskis vd 2007, Veršilovskis ve Mikelsone 2008), UHPLC-orbitrapMS (Zachariasova vd 2010), GLC-MS (Salhab vd 1976) ve GC-MS (Tanaka 2007) gibi kromatografik teknikler sıklıkla kullanılmıştır. STC UV ışığı altında iyi floresansa sahip olmadığından TLC metodlar, çok hassas değildir ve tespit limiti (LOD) 20-50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  arasında değişir. Fakat son zamanlarda Stroka vd (2004) tarafından yapılan çalışmada rutin ve izleme amaçlı bir ince tabaka kromatografisi ile bir reaktif serbest türevlendirme prosedürü (sterigmatosistin florösans indüksiyonu için) başarıyla uygulanmış ve sonuçta LOD 2-11  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bulunmuştur.

STC'nin belirlenmesi ile ilgili yüksek performanslı sıvı kromatografisi uygulamaları da bulunmaktadır. Bunlar alüminyum klorid ile post kolon türevlendirme reaksiyonunun kullanıldığı çok hassas olmayan yöntemlerdir. Bu yüzden ppb seviyelerinin aşağısında STC'nin tespiti, tercihen kütle cihazı kullanılmasıyla yapılmalıdır. Farklı hububatlar için elektrosprey pozitif iyonlaşma tandem kütle spektrometrisi ile HPLC geliştirilirken; çok yakınlarda peynir, ekme ve mısır gibi gıdalar için atmosferik basınçlı iyonlaşma kütle spektrometrik dedeksiyon bağlı HPLC'nin kullanıldığı metodlar geliştirilmiştir. STC'yi (LOD 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de içeren mikotoksinlerin eş zamanlı tespiti için çoklu mikotoksin kütle spektrometrik metod da geliştirilmiştir (Veršilovskis vd 2008a). Çizelge 2.3'de gıda maddelerinde, yemde, tozda, yapı malzemelerinde ve iç havada STC'nin tespiti için kromatografik metodların özeti verilmektedir.

Çizelge 2.3. Gıda maddelerinde, yemde, tozda, yapı malzemelerinde ve iç havada STC'nin tespiti için kromatografik metodların özeti (Veršilovskis ve De Saeger 2009)

| <b>Matriks</b> | <b>Ekstraksiyon</b>                            | <b>Yağını uzaklaştırma ve temizleme</b>  | <b>Ayırma ve tespit</b>                    | <b>LOD<br/>µg/kg</b> | <b>Recovery<br/>%</b> |
|----------------|--|--|--|----------------------|-----------------------|
| Peynir         | 100 ml % 5 NaCl+200 ml MeOH/aseton (50/50 v/v) | CHCl <sub>3</sub> ve kloroform-etil aseetat karışımı ile sıvı sıvı ekstraksiyonu, Silikajel kolonda SPE                    | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV               | 20                   | 87                    |
| Peynir         | CHCl <sub>3</sub>                              | -  | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV               | -                    | 89-97                 |
| Peynir         | MeOH/%4 KCl (90/10 v/v)                        | Florisil ve poliamid kolonda SPE   | TFA ile TLC-UV                             | 5                    | 30-80                 |
| Peynir         | ACN/%4 KCl (85/15 v/v)                         | Temizleme: CHCl <sub>3</sub> ve kübrük karbonat kolon ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu  | Al <sub>2</sub> Cl <sub>6</sub> ile TLC-UV | 2                    | 86-88                 |
| Peynir         | CHCl <sub>3</sub>                              | n-hekzan ile defatting, temizleme: CHCl <sub>3</sub> ve sonra ACN ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu                              | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV               | 10                   |                       |
| Peynir         | ACN/%4 KCl (85/15 v/v)                         | Yağını uzaklaştırma: n-hekzan, temizleme: iki atomlu toprak kolon ve CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu         | TLC-UV                                     | -                    | 85-91                 |
| Peynir         | ACN/H <sub>2</sub> O (90/10 v/v)               | Yağını uzaklaştırma:n-hekzan,temizleme: Strata X kolonda SPE sonra azot akımı altında kurutma, mobil fazda tekrar çözdürme | LC-ESI <sup>+</sup> -MS/MS                 | 0.03                 | 96-104                |
| Tahıl          | MeOH/%4 KCl (90/10 v/v)                        | Temizleme: CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu   | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV               | 100                  | 60                    |

Devamı Arkada

Çizelge 2.3'ün devamı

| <b>Matriks</b>                            | <b>Ekstraksiyon</b>                 | <b>Yağın uzaklaştırma ve temizleme</b>   | <b>Ayırma ve tespit</b>      | <b>LOD<br/>µg/kg</b> | <b>Recovery<br/>%</b> |
|---|-------------------------------------|--|------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Ekmek,<br>tütsülenmiş<br>jambon,<br>salam | ACN/%4KCl<br>(90/10 v/v)            | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme: CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı<br>ekstraksiyonu,silikajel kolonda SPE   | TLC-UV                       | 20                   | -                     |
| Tahıl                                     | ACN/H <sub>2</sub> O<br>(90/10 v/v) | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme: CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı<br>ekstraksiyonu, polisitren ile jel nüfuz<br>etme kromatografisi  | GLC-MS                       | 5                    | >90                   |
| Pirinç                                    | Etilasetat                          | Buharlaştırma,MeOH-%20 KCl(4/1<br>v/v)ile çözme, n-hekzan ile yağın<br>uzaklaştırma, CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı<br>ekstraksiyonu, evaporasyon, kuru<br>tortunun aseton ile çözülmesi,<br>Sephadex LH-20 kolonda SPE.eluatın<br>buharlaştırılması ve kuru tortunun<br>asetonda tekrar çözdürülmesi | GLC                          | 50                   | -                     |
| Ekmek                                     | CHCl <sub>3</sub>                   | Ekstraktın buharlaştırılması,<br>CHCl <sub>3</sub> ile kuru tortunun yeniden<br>çözdürülmesi   | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV | 20                   | -                     |
| Mısır, Yulaf,<br>buğday                   | ACN/H <sub>2</sub> O<br>(90/10 v/v) | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme: silikajel kolonda gel<br>nüfuz etme kromatografisi   | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV | 30                   | -                     |
| Tahıl,<br>soyafasülyesi                   | MeOH/%4 KCl (90/10<br>v/v)          | Florisil kolonda SPE   | TLC-UV                       | 50                   | 92-134                |

Devamı Arkada

Çizelge 2.3'ün devamı

| <b>Matriks</b>  | <b>Ekstraksiyon</b>                              | <b>Yağın uzaklaştırma ve temizleme</b>  | <b>Ayırma ve tespit</b>  | <b>LOD<br/>µg/kg</b> | <b>Recovery<br/>%</b> |
|---|--|---|--|----------------------|-----------------------|
| Antep fıstığı   | ACN/%4KCl<br>(90/10 v/v)                         | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme:CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı<br>ekstraksiyonu,silikajel kolonda SPE             | HPLC-UV  | -                    | -                     |
| Mısır, yulaf  | ACN/H <sub>2</sub> O<br>(90/10 v/v)              | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme: silikajel kolonda gel nüfuz<br>etme kromatografisi                                | HPLC-UV  | 20                   | -                     |
| Tahıl, mısır, soya fasülyesi,<br>yem  | ACN/%4KCl<br>(90/10 v/v)                         | Yağın uzaklaştırma: izooktan,<br>temizleme: CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı<br>ekstraksiyonu                                  | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV   | 140                  | 92-95                 |
| Silajlık mısır  | MeOH/CHCl <sub>3</sub><br>(50/50 v/v)            | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme: CHCl <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O ile sıvı-sıvı<br>ekstraksiyonu                | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV   | 10                   | -                     |
| Bitkiler  | Etilasetat                                       | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme:CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı<br>ekstraksiyonu,silikajel kolonda SPE             | TFA anhidrit ile TLC-<br>UV  | 20                   | -                     |
| Kakao çekirdekleri  | ACN/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>(95/5 v/v) | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme:<br>CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu, silika<br>bant-elut SPE kolonda | CN kolonda HPLC-UV   | 13                   | 100-108               |
| Arpa  | ACN/%4KCl<br>(90/10 v/v)                         | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme: CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı<br>ekstraksiyonu, silikajel kolonda SPE           | HPLC-FLD<br>(piridin ve asetik<br>anhidrit ile kolon öncesi<br>türevlendirme | 20                   | 31-96                 |
| Mısır, manyok unu, pirinç, kuru<br>siyah fasülye, silajlık<br>mısır, ekme, peynir | MeOH/%4 KCl<br>(90/10 v/v)                       | Temizleme ajanları ve HifloSuper-Cel<br>ile temizleme ardından CHCl <sub>3</sub> ile<br>parçalama                             | HPLC-FLD   | 15-35                | 98-117                |

Devamı Arkada

Çizelge 2.3'ün devamı

| <b>Matriks</b>  | <b>Ekstraksiyon</b>  | <b>Yağın uzaklaştırma ve temizleme</b>   | <b>Ayırma ve tespit</b>                           | <b>LOD<br/>µg/kg</b>                     | <b>Recovery<br/>%</b> |
|---|--|--|---|--|-----------------------|
| Mısır,ekmek,peynir  | ACN/%4 KCl<br>(90/10 v/v)MeOH/%4<br>KCl (90/10 v/v)              | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme:<br>CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu                     | HPLC-APCI <sup>+</sup> -MS                        | 1.7                                      | 118                   |
| Tahıl, mısır ve mısır bazlı ürünler   | ACN/%4 KCl<br>(90/10 v/v)  | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme: CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu, silikajel kolonda SPE | HPLC-FLD  | 1.9<br>2.4<br>3.0                        | 96<br>55<br>70-110    |
| Tahıl, un, pirinç   | ACN/%4 KCl<br>(95/5 v/v)   | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>temizleme: CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu, fenil kolonda SPE     | HP-TLC  | 2.0                                      | 80                    |
| Pirinç  | ACN/H <sub>2</sub> O<br>(85/15 v/v)                              | Temizleme: MycoSep#226 kolon   | GC-MS   | 2.0<br>4.0<br>10 <sup>a</sup>            | 72                    |
| Tahıl   | ACN/H <sub>2</sub> O<br>(84/16 v/v)                              | Strata X SPE kolonda SPE, sonra azot altında buharlaştırma, mobil fazla kuru tortunun tekrar çözdürülmesi        | LC-MS/MS<br>HPLC-UV<br>LC-ESI <sup>+</sup> -MS/MS | 4 <sup>a</sup><br>2 <sup>a</sup><br>0.15 | 80-107                |
| Ekmek, fındık, pirinç, sarımsak, domates, elma, limon, kırmızı şarap, reçel | ACN/H <sub>2</sub> O/<br>CH <sub>3</sub> COOH<br>(79/20/1 v/v/v) | -  | LC-ESI-MS/MS                                      | 0.4                                      | 101-109               |
| Mısır, fıstık, Antep fıstığı, buğday, kuru üzüm, incir                      | ACN/H <sub>2</sub> O<br>(80/20 v/v)                              | -  | LC-MS/MS  | 10                                       | 101-109               |
| Bira  | -  | Strata X SPE kolonda SPE, sonra kuru tortunun konsantrasyonunu artırma ve mobil fazda tekrar çözdürme            | HPLC-UV   | 0.26                                     | 81-126                |

Devamı Arkada

Çizelge 2.3'ün devamı

| <b>Matriks</b>                 | <b>Ekstraksiyon</b>   | <b>Yağın uzaklaştırma ve temizleme</b>  | <b>Ayırma ve tespit</b>      | <b>LOD<br/>µg/kg</b> | <b>Recovery<br/>%</b> |
|--------------------------------|---|---|------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Yem                            | CHCl <sub>3</sub> /%4 KCl   | Kloroform kalıntısının konsantrasyonu   | TLC-UV                       | 30                   | -                     |
| Yem                            | CHCl <sub>3</sub> /H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>(90/10 v/v)  | Jel filtrasyonu   | TLC-UV                       | 50                   | -                     |
| Yem                            | MeOH/%4 KCl (90/10 v/v)   | Temizleme: Florisil kolonda SPE   | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV | 50                   | -                     |
| Farklı gıda maddeleri          | ACN/%4 KCl+HCl<br>(90/10 v/v)   | Yağın uzaklaştırma: n-hekzan,<br>Temizleme: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu,  | TLC-UV                       | 20                   | 80                    |
| Yem, mısır, silaj              | MeOH/%4 KCl (90/10 v/v)   | Temizleme: Florisil kolonda SPE   | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV | 2                    | -                     |
| Silaj                          | CHCl <sub>3</sub>   | Temizleme: H <sub>2</sub> O ve CHCl <sub>3</sub> ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu,                             | AlCl <sub>3</sub> ile TLC-UV | -                    | -                     |
|                                | ACN/ H <sub>2</sub> O   | -   | HPLC-UV                      | -                    | -                     |
|                                | MeOH  | -   | HPLC-UV                      | -                    | -                     |
| Yapı malzemeleri, iç hava, toz | ACN   | Cam fiber filtre ile filtrasyon, kuru tortunun MeOH/ H <sub>2</sub> O (50/50 v/v) ile tekrar çözdürülmesi | LC-ESI <sup>+</sup> -MS/MS   | 2-4                  | 33                    |
|                                | Etil asetat sonra<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ACN/H <sub>2</sub> O+<br>H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 1.5) | Katlanmış filtre ile filtrasyon, kuru tortunun MeOH/ H <sub>2</sub> O (30/70 v/v) ile tekrar çözdürülmesi | LC-ESI <sup>+</sup> -MS/MS   | 1.1-1.5<br>µg /L     | 61                    |
|                                |   | Temizleme:<br>Chromabond XTR kolonda SPE  | HPLC-UV                      | 100                  | 50-64                 |

a) Kolonda Ng. Metodun hassaslığı µg /kg olarak belirtilmemiş.

### **2.3.6. Yasal düzenlemeler**

Çek Cumhuriyeti ve Slovakya’da gıdalardaki STC seviyesiyle ilgili düzenlemeler yapılmıştır. Toksin için izin verilen sınır, pirinç, sebze, un, kümes hayvanları, et ve süt için 5 µg/kg, diğer gıdalar için ise 20 µg/kg olarak belirlenmiştir. Diğer ülkelerde ise yasal düzenlemeler yoktur. Bu yüzden kontrol ve izleme programları da bulunmamaktadır (Stroka vd 2004). Veršilovskis ve De Saeger’in (2010) bildirdiğine göre Avrupa Mikotoksin Biliçlenme Ağı (European Mycotoxin Awareness Network) tarafından 70 kg’lık bir insan için önemli risk oluşturmayacak STC miktarı 8 µg/kg vücut ağırlığı / gün şeklinde tanımlanmıştır.

### **2.4. Validasyon**

Validasyon bir cihazın, metodun veya ölçüm sisteminin belirlenen amaca uygun olduğunun test edilerek yazılı kayıtlarla onaylanmasıdır. Validasyon ile analitik metodun, ilgili performans parametrelerine veya karakteristiklerine uyduğu kanıtlanmalıdır.

#### **2.4.1. Metot validasyonu**

Metot validasyonu, bir analitik metodun kullanım amacı için kabul edilebilir olduğunu kanıtlayan işlemdir. Bir metodun performansını belirlemek için yapılan ölçme işlemleridir.

#### **2.4.2. Metot validasyonu işleminin amaçları**

Yapılan ölçümün belirlenen amaca uygun doğrulukta sonuç vermesi önemli bir ihtiyaçtır. Bu ise analitik ölçüm yapan laboratuvarın belli koşulları yerine getirmesi ile mümkündür. Bir metodun performansının belirlenen analiz ihtiyacına uygun olduğunu belirlemek ve göstermek için metot validasyonu yapılmalıdır.

#### **2.4.3. Metot validasyonu ne zaman uygulanmalıdır**

Metot validasyonu, herhangi bir metot bir laboratuvarında ilk defa uygulanacağı zaman, bir analiz için yeni metot geliştirildiği zaman, kullanmakta olan metotta değişiklik yapıldığı zaman, valide edilmiş bir metot başka bir laboratuvarında kullanılacağı zaman veya farklı bir cihazla kullanılacağı zaman, ilk metodu karşılaştırmak için, kalite kontrol testleri sonucunda metodun performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığında uygulanması gerekir.

#### **2.4.4. Validasyon parametrelerinin belirlenmesi**

Validasyonu yapılacak metot performans parametreleri metodun uygulama amacına ve kapsamına bağlı olarak belirlenir. Metot validasyonuna başlamadan önce kullanılacak cihazın performansının standartla test edilmesi ve uygunluğunun saptanması gerekir. Metot performansı ile ilgili hiçbir bilgi yoksa ön testler yapılarak metodun uygulama amacına uygunluğu kontrol edilir. Test sonuçlarına göre metot performans kriterleri belirlenir.



#### 2.4.5. Metot validasyon parametreleri

Spesifiklik, seçicilik, kesinlik, tekrarlanabilirlik, ara-tekrarlanabilirlik, doğruluk, lineerlik, ölçüm aralığı, tayin limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ) ve sağlamlıktır.

##### Spesifiklik/Seçicilik

Spesifiklik testinin amacı analiz edilen maddenin matriksin yanında doğru olarak ölçülüp ölçülemediğinin belirlenmesidir. Spesifiklik, diğer bileşenlerin varlığının beklendiği yerde bir analitin varlığının tespit edilmesidir. Bu diğer bileşenler tipik olarak çeşitli pislikler, degradasyon ürünleri, matriks içindeki diğer bileşenler, vs. olabilirler. Seçicilik, metodun, testi belirtilmiş koşullar altında, ilgili analiti diğer bileşenlerle birlikte bulunduğu bir matriks içinde doğru olarak tanımlama yetisidir.

##### Tespit Limiti ( Limit of Detection-LOD)

Tespit limiti örnekte ölçülebilen fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük miktardır. Örneğin sinyal olarak okunabildiği düşük derişimdir. Tespit limiti genellikle sinyal/gürültü oranının 3 katı olarak alınır.

##### Ölçüm Limiti (Limit of Quantitation-LOQ)

Ölçüm limiti kabul edilebilir doğrulukta ve tekrarlanabilirlikte ölçülebilen en düşük derişimdir. Ölçüm limiti 3 metotla hesaplanabilir.

##### LOD/LOQ Testi

###### Metot 1

LOD ve LOQ için azalan konsantrasyonda standart hazırlanarak elde edilen kromatogram pik yüksekliği ve gürültü (noise) ölçülerek (S)inyal/(N)oise (gürültü) oranı hesaplanır. LOD S/N oranının üç katı alınarak LOQ S/N oranının 10 katı alınarak hesaplanır.

###### Metot 2

LOD ve LOQ için yaklaşık beklenen LOD'nin üç katı konsantrasyonda standart hazırlanarak elde edilen sinyal değerinden (kromatografik analizlerde alan, spektrofotometrik analizlerde absorbans) miktar hesaplanır.

### Metot 3

Bu yöntemde LOD ve LOQ için azalan derişimlerde standart hazırlanarak elde edilen sonuçların %RSD'si hesaplanır. Belli bir %RSD tekrarlanabilirlikte ölçülebilen miktar LOQ olarak hesaplanır.

### Ölçüm Aralığı ve Lineer Aralık

Ölçüm aralığı metodun uygulama aralığını belirler. Mevcut örnek tipinde analitin kabul edilebilir bir kesinlik ve gerçeklikle tespit edilebildiği konsantrasyon aralığıdır. Metot valide edilirken validasyon deneyleri bu aralık göz önünde bulundurularak planlanır.

Lineer aralık ise kalibrasyon işleminin lineer olduğu derişim aralığıdır. Lineer aralık metot ölçüm aralığından daha dar olabilir.

### Lineer Ölçüm Aralığı

Ölçüm aralığında derişim/sinyal bağlantısının lineer olduğu derişim aralığıdır. Lineer ölçüm aralığını belirlemek için artan derişimde 7 kalibrasyon standardı hazırlanarak ölçüm yapılır. Derişime karşılık okunan sinyal grafiğe geçirilerek lineer bölge belirlenir. Kalibrasyon doğrusunun korelasyon katsayısı ve Residual Standart sapması hesaplanır.

### Doğruluk

Bir ölçüm cihazının veya metodun ölçüm sonucunun gerçek değere ve birbirlerine yakınlığını ifade etmek için kullanılır. Doğruluk niteleyici bir kavramdır ve rakamsal olarak verilmemelidir. Doğruluğun iki bileşeni vardır.

**Gerçeklik:** Gerçek değere yakınlığın ölçüsüdür. Bir metodun sistematik hatası (bias) doğruluğun gerçeklik bileşenini oluşturur.

**Kesinlik (precision)** ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığının ölçüsüdür ve ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını gösterir. Kesinlik standart sapma veya %RSD olarak ifade edilir.

**Tekrarlanabilirlik:** Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Mutlak hata veya rölatif (% hata) olarak ifade edilir. Bir metodun, aynı laboratuvarda, aynı cihazla, aynı kişi tarafından, kısa zaman aralığında yaptığı ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür.

### Hassasiyet (Sensitivity)

Bir ölçüm cihazının veya metodun hassasiyeti o metot veya cihazla yapılacak analizin en düşük tayin sınırını belirler. Birim miktar için cihazın verdiği sinyal büyüklüğüdür.

Kromatografik analizlerde Respons faktörü olarak ifade edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi sistemin hassasiyetini verir.

#### Geri Kazanım (Recovery)

Kimyasal ölçümde gerçek değer ölçülmesi uygulanan metoda bağlı olarak değişim gösterir. Deneysel işlemler esnasında çeşitli nedenlerle kayıp oluşur. Bu kayıp miktarının oranını ve belirsizliğini hesaplamak gerekir. Kayıp miktarı metodun geri kazanım oranı olarak ifade edilir. Geri kazanım, sertifikalı referans madde ile spike yöntemi ile ve referans metotla analiz edilerek belirlenir.

#### Sertifikalı Referans Madde ile Geri Kazanım

Sertifikalı referans madde mevcutsa referans madde analiz edilir ve bulunan değer referans madde değerine oranı geri kazanım ( $R_m$ ) oranıdır. Formül 2.1'e göre hesaplanır.

$$R_m = \frac{C_{obs}}{C_{CRM}} \quad (2.1)$$

$C_{obs}$ : Bulunan konsantrasyon değeri,  $C_{CRM}$ : Referansın konsantrasyon değeri

#### Analit Ekleme Yöntemi ile Geri Kazanım

Sertifikalı referans madde mevcut değilse spike yöntemi ile geri kazanım oranı bulunabilir. Analiz edilecek maddeyi içermeyen matriks madde üzerine belli oranda standart eklenerek analiz edilir. Formül 2.2'ye göre hesaplanır.

$$R_m = \frac{C_{obs}}{C_{spike}} \quad (2.2)$$

$C_{obs}$ : Bulunan konsantrasyon değeri,  $C_{spike}$ : Spike konsantrasyon değeri

Analiz edilecek maddeyi içermeyen matriks yoksa örnek üzerine belli oranda standart eklenerek analiz edilir. Formül 2.3'e göre hesaplanır.

$$R_m = \frac{C_{obs} - C_{smp}}{C_{CRM}} \quad (2.3)$$

$C_{smp}$  = Örneğin konsantrasyon değeri

## Referans Metotla Geri Kazanım

Analiz örneği belirsizliği bilinen referans metotla analiz edilerek geri kazanım oranı bulunabilir. Analiz örneği aday metot ve referans metotla analiz edilir. Formül 2.4'e göre hesaplanır.

$$R_m = \frac{C_{met}}{C_{ref}} \quad (2.4)$$

$C_{met}$ = Metot konsantrasyon değeri,  $C_{ref}$ = Referans konsantrasyon değeri

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Materyal

Araştırmanın materyalini piyasadan alınmış olan bira örnekleri oluşturmaktadır. Bira örneklerinde sterigmatosistin varlığı UHPLC ile tespit edilmiştir. Bütün örnekler analiz edilinceye kadar buzdolabında 5 °C de muhafaza edilmiştir. Denemelerde HPLC saflığında kimyasallar kullanılmıştır.

#### 3.2. Metot

Birada sterigmatosistin miktarının tayini için Veršilovskis vd (2008a) birada STC'nin belirlenmesi metodu seçilmiştir. Yapılan çalışmalarla, metodun doğrusallığı (Linearity), seçiciliği (Selectivity-Specificity), tekrarlanabilirliği (Repeatability), geri kazanımı (Recovery), Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ) belirlenmiştir. Şekil 3.1'de analizlerin yapıldığı gradyen programı, Şekil 3.2'de otosampler için belirlenen metot parametreleri ve Şekil 3.3'de PDA dedektör için belirlenen metot parametreleri gösterilmektedir.

##### A. Sistem koşulları

**UHPLC sistemi:** Thermo Scientific Accela UHPLC

**Dedektör:** Photodiode Array Dedektör; ex.: 245 nm, em.: 325 nm

**Kolon:** C:18 ( 3 mm x 150 mm x 5 µm )

**Akış Hızı:** 0,4 ml/dakika

**Mobil Faz:** asetonitril:su (60:40 v/v )

##### B. Kullanılan kimyasallar

**Asetonitril:** HPLC için uygun kalitede

**Metanol:** HPLC için uygun kalitede

**Sterigmatosistin:** Applichem (Lot no: IR004282)

**Saf su:** HPLC için uygun kalitede

| Pump General |       | Gradient Program |     |     |     |                          |    |
|--------------|-------|------------------|-----|-----|-----|--------------------------|----|
| Pump 1       |       |                  |     |     |     |                          |    |
|              | Time  | A%               | B%  | C%  | D%  | $\mu\text{l}/\text{min}$ | P2 |
| 0            | 0.00  | 100.0            | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 400.0                    |    |
| 1            | 10.00 | 100.0            | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 400.0                    |    |
| 2            |       | 100.0            | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 400.0                    |    |

Şekil 3.1. Analizlerin yapıldığı gradyen programı

| Accela AS Method                        | Sample Preparation | Reservoir Content        | Timed Events   |
|---|--------------------|--------------------------|--|
| Injection volume (ul):                  | 100                | Injection Mode           | <input checked="" type="radio"/> Partial loop<br><input type="radio"/> Full loop<br><input type="radio"/> No waste |
| Needle height from bottom (mm):         | 1.0                | Tray Temperature Control | <input type="checkbox"/> Enable tray temperature control<br>Temperature (°C): 30.0                                 |
| Syringe speed (ul/s):                   | 8.0                | Column Oven Control      | <input checked="" type="checkbox"/> Enable column oven control<br>Temperature (°C): 30.0                           |
| Flush volume (ul):                      | 400                |                          |  |
| Flush/Wash source:                      | bottle             |                          |  |
| Wash volume (ul):                       | 0                  |                          |  |
| Flush speed (ul/s):                     | 100.00             |                          |  |
| Post-injection valve switch time (min): | 0.0                |                          |  |
| Loop loading speed (ul/s):              | 8.00               |                          |  |

Şekil 3.2. Otosampler için belirlenen metot parametreleri

Accela PDA Method

Diode Array Scan Rate: 80Hz

Run

Run Length (min)  Filter Rise Time (sec)

Spectra

Collect Spectral Data Wavelength Step (nm)

Start Wavelength (nm)  Sample Rate (Hz)

End Wavelength (nm)  Filter Bandwidth (nm)

Units

Wavelength / Absorbance

Diode / Intensity

Channels

No Channels

One Channel

Two Channels

Three Channels

Sample Rate (Hz)

Channel A

Wavelength (nm)  Filter Bandwidth (nm)

Channel B

Wavelength (nm)  Filter Bandwidth (nm)

Channel C

Wavelength (nm)  Filter Bandwidth (nm)

Şekil 3.3. PDA dedektör için belirlenen metot parametreleri

### 3.3. Bira Örneklerinin Analize Hazırlanması

Bira örnekleri laboratuvar tipi ultrasonik banyoda 40 dakika bekletilerek analizden önce gazının alınması sağlanmıştır. Gazı alınan örneklerden 30 ml alınarak örnek filtre edilmiş, 10 ml süzüntü 5 ml asetonitril: su (10:90, v/v) karışımı ile seyreltilmiş ve Oasis HLB (60 mg) katı faz ekstraksiyon (SPE) kolonu (Waters, Milford, MA, USA) kullanılarak saflaştırılmıştır. Örnek SPE kolona yüklemeye önce kolon sırasıyla 6 ml metanol ve 6 ml su geçirilerek şartlandırılmıştır. Ardından 15 ml seyreltilmiş örnek kolona (manifold (Waters, Milford, MA, USA) kullanılarak) yüklenmiştir. Kolon asetonitril: su (30: 70, v/v) ile yıkanmış ve sterigmatosistin 3 ml %100 asetonitril ile elue edilmiştir. Kalan eluat azot altında kurutmak için buharlaştırılmış ve 200 µl asetonitril: su (60: 40, v/v) karışımında tekrar çözündürülmüş ve akabinde UHPLC ile analiz edilmiştir.

### 3.4. UHPLC Analizi

Thermo Scientific Accela UHPLC Photodiode Array Dedektörlü (PAD) (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) sistem kullanılmıştır. Kromatografik değerlendirmeler Excalibur yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Kromatografik ayırım (Thermo scientific C18 (5µm), 150x3.0 mm, kolonda (Part no:97105-153030, Waltham, Massachusetts, USA ) gerçekleştirilmiştir. Mobil faz asetonitrilde %40 sudan oluşmuş ve isokratik mod kullanılmıştır.

Sterigmatosistin ölçümü harici kalibrasyondan hesaplanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak pik alanının ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Sterigmatosistin 245 nm ve 325 nm dalga boylarında tespit edilmiştir.

### **3.5. Stok Solüsyonun Hazırlanması**

5 mg STC 10 ml asetonitril: su (50:50 v/v) da çözülerek yaklaşık 500 µg/ml stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyondan 500 µl alındı ve ortam sıcaklığında oksijensiz azot altında kurutuldu. Akabinde 5 ml asetonitrilde çözdürüldü. Hazırlanan stok çözelti ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra -18 °C de muhafaza edilmiştir.



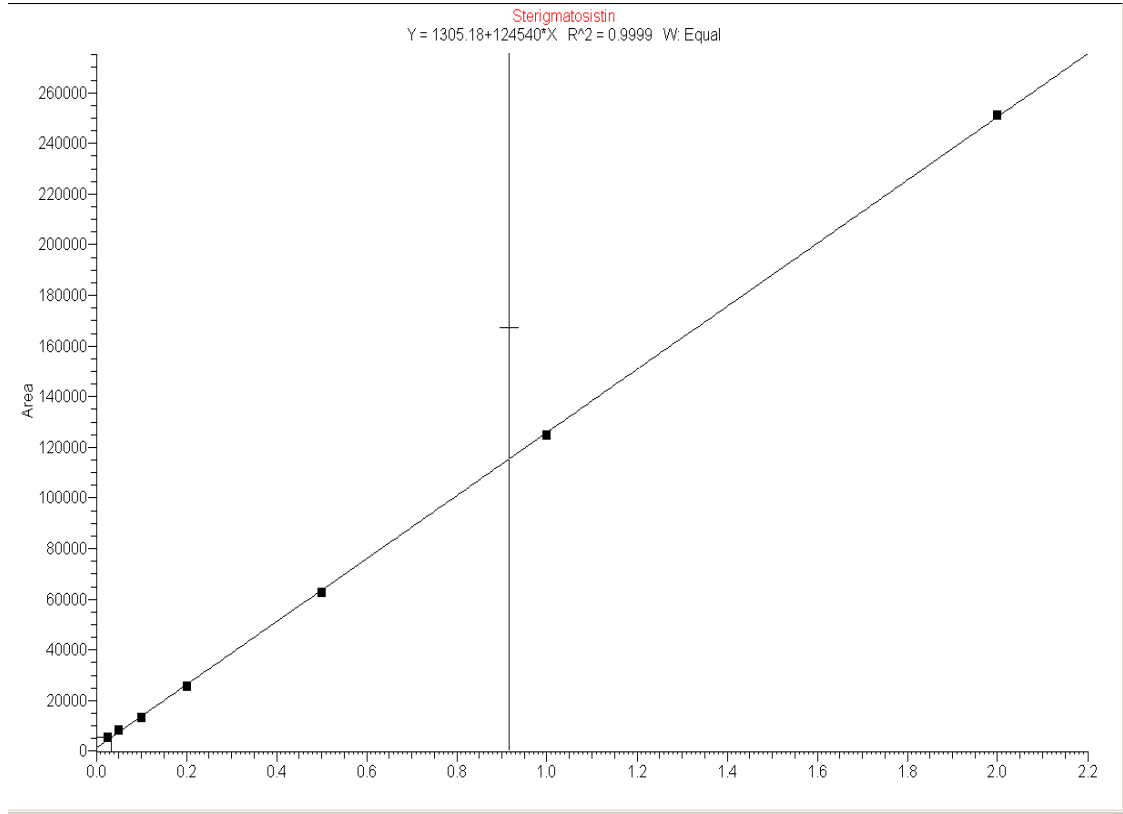
## 4. BULGULAR

### 4.1. Doğrusallık Çalışmaları (Linearity Studies)

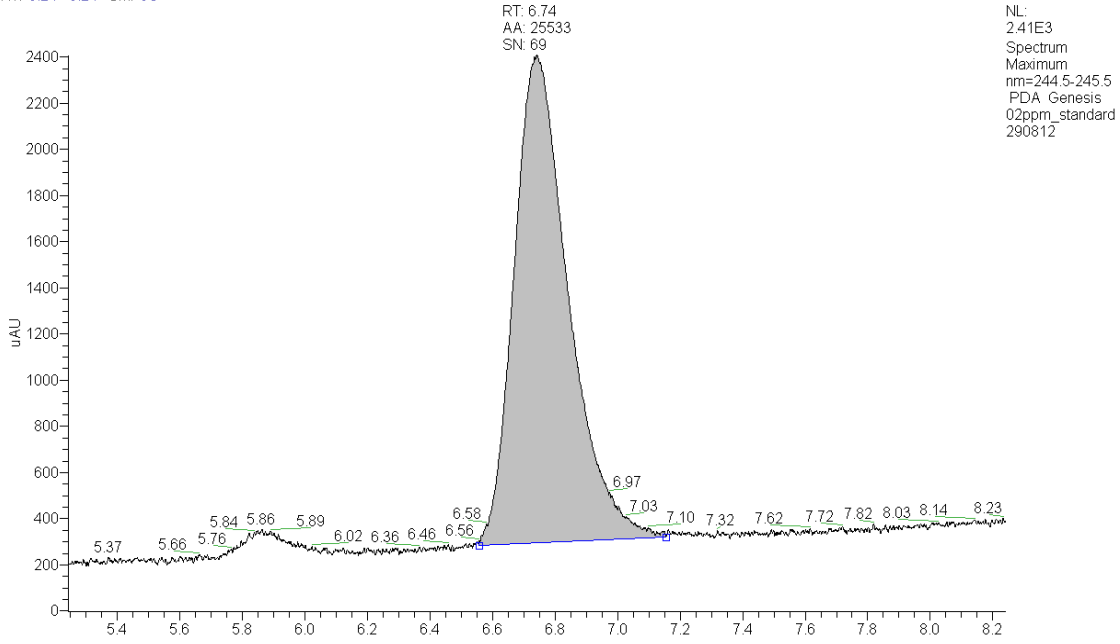
Stok solüsyonun seyreltilmesi için asetonitril: su (75:25, v/v) kullanılmıştır. 25 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 500 ppb, 1 ppm, 2 ppm konsantrasyonlarında standart kullanılarak yapılan enjeksiyonlardan sonra elde edilen kalibrasyon eğrisinin Korelasyon Katsayısı- $r^2$  (Correlation coefficient) hesaplanmış ve elde edilen Kalibrasyon Eğrisi için  $r^2=0.9999$  olarak bulunmuştur. Çizelge 4.1’de kalibrasyon eğrisinin bağlantı katsayısı ( $r^2$ ) (Correlation coefficient), Şekil 4.1’de STC için elde edilen kalibrasyon grafiği ve Şekil 4.3’de STC standartına ait pik görüntüsü görülmektedir.

Çizelge 4.1 Kalibrasyon Eğrisi’nin Korelasyon Katsayısı ( $r^2$ ) (Correlation coefficient)

| Parametreler                  | Sterigmatosistin |
|-------------------------------|------------------|
| Korelasyon Katsayısı( $r^2$ ) | 0.9999           |
| Eğim                          | 124540           |
| y-intercent                   | 1305.18          |



Şekil 4.1. Kalibrasyon grafiği



Şekil 4.2. STC standartına ait pik görüntüsü

#### 4.2. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları (Repeatability Studies)

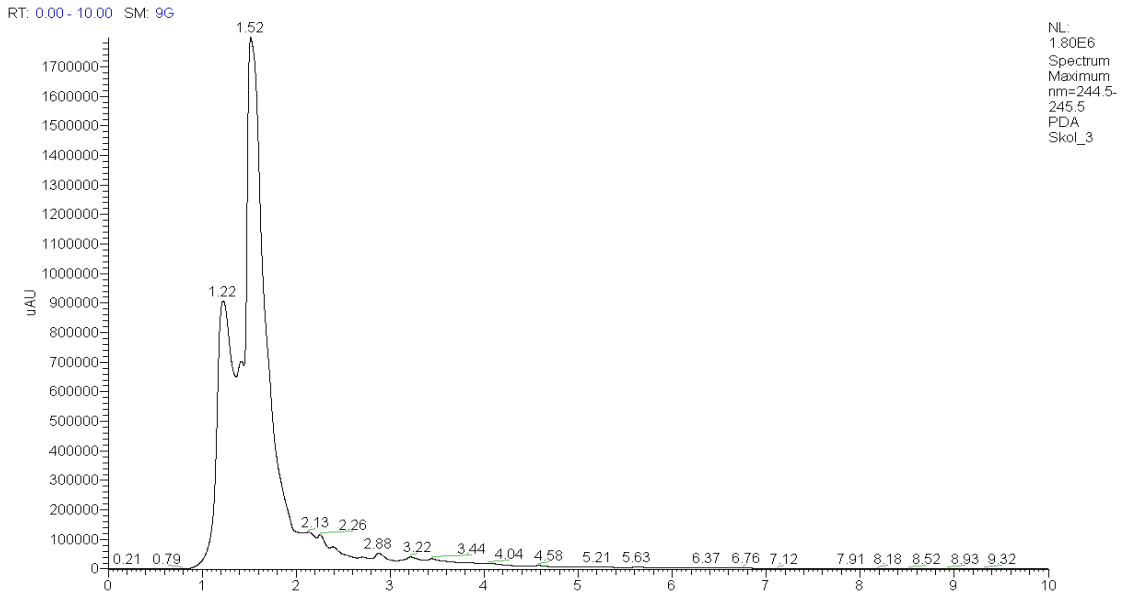
Birada 200 ppb ye eşdeğer olacak şekilde 10 ppm standarttan 600 µl spike yapılan bira örneklerinden 10 tekrar yapıldı. Bu şekilde değerlendirilen sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Sterigmatosistin için elde edilen Alıkonma Zamanları, Pik alanları ve % geri kazanım ile ilgili sonuçlar

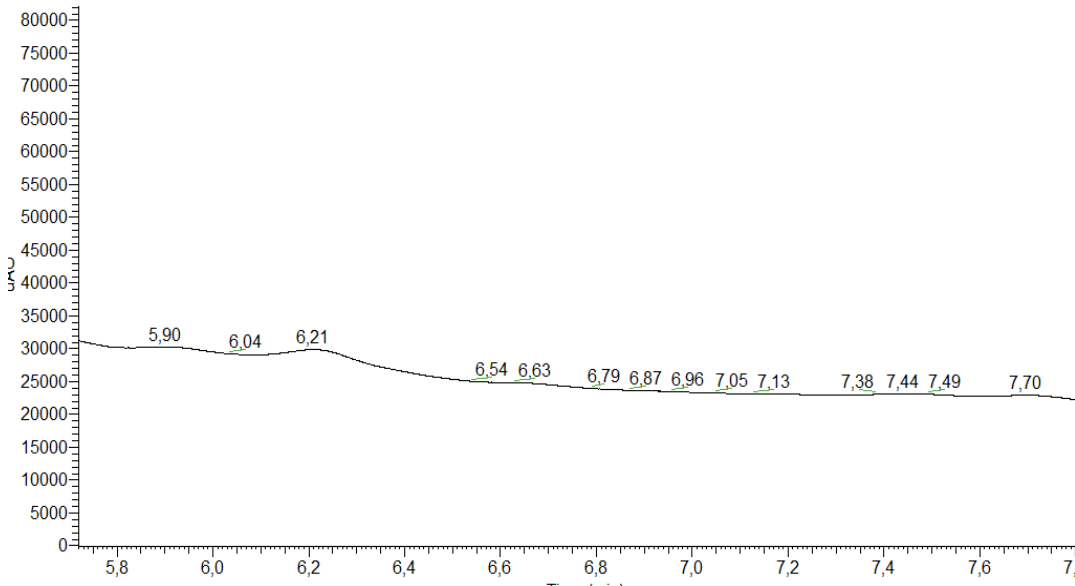
| Sterigmatosistin | Alıkonma Zamanı (dak) | Pik Alanı(Hz*s) | % Geri kazanım |
|------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Enjeksiyon       |                       |                 |                |
| 1                | 6.74                  | 1235511         | 95.34          |
| 2                | 7.33                  | 1211537         | 93.49          |
| 3                | 7.33                  | 1243186         | 95.95          |
| 4                | 7.33                  | 1164409         | 89.87          |
| 5                | 7.35                  | 1144585         | 88.34          |
| 6                | 7.35                  | 1149378         | 88.71          |
| 7                | 7.35                  | 1270682         | 98.08          |
| 8                | 7.35                  | 1290031         | 99.58          |
| 9                | 7.35                  | 1195775         | 92.27          |
| 10               | 7.33                  | 1256002         | 96.94          |
| Ortalama         | 7.28                  | 1216109.60      | 93.69          |
| SD               | 0.19                  | 51445.44        | 7.95           |
| %RSD             | 2.6                   | 4.23            | 4.23           |

### 4.3. Seçicilik Çalışmaları ( Selectivity-Specificity Studies)

Seçicilik çalışmasında sterigmatosistin içermeyen bir bira örneği analiz edildi. STC'nin bağlı çıkış zamanında yabancı pikler görülmedi (Bkz. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.3. STC içermeyen bira örneği



Şekil 4.4. STC içermeyen biraya ait kromatogram

#### 4.4. Geri Kazanım Çalışmaları (Recovery Studies)

Birada bulunabilecek sterigmatosistin için orta konsantrasyon değeri olarak 200 ppb (%100) olarak kabul edilmiş ve örnekte nihai konsantrasyon 200 ppb olacak şekilde 10 ppm standarttan 600 µl standart eklenerek 10 tekrar yapılmıştır. 200 ppbde elde edilen geri kazanım sonuçları Çizelge 4.3’de görülmektedir.

Çizelge 4.3. 200 ppb STC eklenmiş örneğe ait geri kazanım çalışması

| Konsantrasyon ppb | Geri kazanım | % Geri kazanım |
|-------------------|--------------|----------------|
| 200               | 190.68       | 95.34          |
| 200               | 186.98       | 93.49          |
| 200               | 191.90       | 95.95          |
| 200               | 179.74       | 89.87          |
| 200               | 176.68       | 88.34          |
| 200               | 177.42       | 88.71          |
| 200               | 196.16       | 98.08          |
| 200               | 199.16       | 99.58          |
| 200               | 184.54       | 92.27          |
| 200               | 193.88       | 96.94          |
| Ortalama          | 187.71       | 93.69          |
| SD                | 7.95         |                |
| % RSD             | 4.23         |                |

#### 4.5. Tespit Limiti Çalışmaları (Limit of Detection-LOD Studies)

Örnekte nihai konsantrasyon 25 ppb'ye eşdeğer olacak şekilde 1.25 ppm standart ile 600 µl yükleme (spike) yapılarak 10 tekrar yapıldı. Bu enjeksiyonların Curve'e göre konsantrasyon hesapları yapıldı. Elde edilen konsantrasyon değerlerinin standart sapması (SD) hesaplandı. Bulunan ortalama standart sapmanın 3 katı Tespit Limiti (Tanım Limiti) olarak kabul edildi. Çizelge 4.4'de STC için tespit limiti çalışmasına ait sonuçlar görülmektedir.

Çizelge 4.4. Sterigmatosistin için Tespit Limiti çalışmasına ait sonuçlar

| Konsantrasyon ppb | Geri kazanım | % Geri kazanım |
|-------------------|--------------|----------------|
| 25                | 17.28        | 69.12          |
| 25                | 17.16        | 68.64          |
| 25                | 17.90        | 71.6           |
| 25                | 17.88        | 71.52          |
| 25                | 17.72        | 70.88          |
| 25                | 18.32        | 73.28          |
| 25                | 17.10        | 68.4           |
| 25                | 18.4         | 73.6           |
| 25                | 18.12        | 72.48          |
| 25                | 17.22        | 68.88          |
| Ortalama          | 17.71        | 70.84          |
| SD                | 0.49         |                |
| % RSD             | 2.78         |                |
| LOD               | 1.48         |                |

#### 4.6. Ölçüm Limiti Çalışmaları (Limit of Quantitation-LOQ Studies)

Bulunan ortalama standart sapmanın 10 katı alınarak ölçüm limiti tespit edilmiştir. Formül 4.1'e göre hesaplanmıştır.

$$LOQ = SD \times 10 = 0.49 \times 10 = 4.9 \text{ ppb} \quad (4.1)$$

#### 4.7. Bira Örneklerinin Analizi

30 farklı bira örneği 5 tekerrürlü ve 2 paralelli olarak analiz edilmiş ve analiz sonucunda örneklerde STC tespit edilmemiştir. Bira örneklerinin analiz sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Bira örneklerinin analiz sonuçları

| <b>Örnek adı</b>                | <b>Bira tipi</b> | <b>Analiz sonucu</b> |
|---------------------------------|------------------|----------------------|
| Tuborg Gold                     | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Tuborg Special                  | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Tuborg Fıçı                     | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Corono Cerveza                  | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Hoagaarden                      | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Leffe Brune Braun               | Siyah bira       | < LOQ                |
| Leffe Blonde Blond              | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Carlsberg                       | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Skol                            | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Venüs                           | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Efes pilsen                     | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Efes Alkolsüz                   | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Mariachi                        | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Efes Dark                       | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Mariachi Black                  | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Bomonti                         | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Efes Dark Brown                 | Siyah bira       | < LOQ                |
| Efes Xtra                       | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Mojo                            | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Efes Pilsen Fıçı                | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Satsu m:x                       | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Miller                          | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Marmara Gold                    | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Efes Pilsen Yüksek Alkollü Fıçı | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Beck's                          | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Efes Light                      | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Marmara Kırmızı                 | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Gusta                           | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Efes limonlu Fıçı Şişe          | Açık renkli bira | < LOQ                |
| Süral Perge Bira                | Açık renkli bira | < LOQ                |

## 5. TARTIŞMA

Yapılan literatür taraması sonucu, ulaşılabilen kaynaklar arasında, birada sterigmatosistin analizi üzerine yayınlanmış yalnızca iki çalışmaya rastlanılmış, Letonya’da gerçekleştirilen ilk çalışmada analiz edilen 26 bira örneğinden 2 tanesinde sterigmatosistin olduğu belirlenmiştir (Veršilovskis vd 2008a). Diğer çalışma Zachariasoğlu vd (2010) tarafından birada sterigmatosistini de içeren 32 adet mikotoksinin araştırılması üzerine yüksek çözünürlü kütle spektrometresi yöntemini (U-HPLC-orbitrapMS) kullanarak gerçekleştirilmiştir. Bu metotta sterigmatosistin için geri kazanım oranı %91-%118 arasında değişmektedir.

Veršilovskis vd (2008) birada sterigmatosistin tespitine yönelik yaptıkları çalışmada LOD değeri 0.26 µg/l, LOQ değeri 0.68 µg/l olarak elde edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin daha yüksek olması LOD değerinin 25 ppb de geri kazanım çalışması yapılarak hesaplanması, sözü edilen çalışmada ise LOD değerinin örnek körüne standart eklenerek enjeksiyon tekrarı ile hesaplanmasından kaynaklanmaktadır. Aynı yöntemle geri kazanım yapılmadan standart eklenmiş örnek körü ile LOD ve LOQ hesaplanmış olsaydı bu çalışmada da daha düşük değerler elde edilecekti.

Litaratürde ince tabaka kromatografisi yöntemiyle tahıllarda (Scott ve ark, 1972, Gimeno 1979, Stroka, 2004) STC tespitine yönelik yapılan çalışmalarda en düşük LOD değerinin 2 µg/kg olduğu, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle tahıllarda ve birada ( Stack vd 1976, Abramson ve Thorsteinson 1989, Hsieh vd 1973, Scudamore vd 1997) STC tespitine yönelik çalışmalarda ise en düşük LOD değerinin 0.26 µg/l olarak birada elde edildiği görülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen LOD değerinin sözü edilen çalışmalardan elde edilen değerler ile karşılaştırıldığında ince tabaka kromatografisinden elde edilen değerden düşük olduğu, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile yapılan çalışmalardan elde edilen LOD değerinden ise yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni kullanılan cihazın ve kolonun farklı olmasından, örnek hazırlama aşamasından ve farklı metotla LOD değerinin hesaplanmasından kaynaklanmış olabilir.

Bu çalışmadan elde edilen LOD ve LOQ değerleri Çizelge 2.3 ile karşılaştırıldığında çoğu çalışmadan elde edilen değerlerden düşük olduğu görülmektedir. Scudamore vd (1996) mısır ürünü, ekmek ve peynirde HPLC-MS ile STC’nin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada; ekmek, yemlik mısır ve peynir için LOD değerleri sırasıyla 1.9 µg/kg, 1.7 µg/kg ve 2.4 µg/kg olarak elde edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen LOD değerinin Scudamore vd (1996) tarafından bulunan değerlerden düşük olduğu görülmektedir.

Veršilovskis vd (2008) tarafından sterigmatosistin için 5 µg/kg seviyesinin altında yeterli LOQ değerinin LC-MS ve GC-MS metoduna dayandığı bildirilmektedir. Bu çalışmada UHPLC ile LOQ değeri 4.9 µg/kg olarak elde edilmiştir.

Ülkemizde gıdalardaki sterigmatosistin seviyesiyle ilgili yasal düzenlemeler bulunmamakla birlikte Çek Cumhuriyeti ve Slovakya’daki düzenlemelerde toksin için izin verilen sınır, pirinç, sebze, un, kümes hayvanları, et ve süt için 5 µg/kg, diğer

gıdalar için ise 20 µg/kg olarak belirlenmiştir (Stroka vd 2004). Bu çalışmada LOQ değeri 4.9 µg/l olarak elde edilmiş olup STC tespiti amacıyla kullanılabilir. Bu çalışma ile sterigmatosistin tayinine yönelik bilimsel literatüre katkı sağlanmış olacaktır.



## 6. SONUÇ

Bu çalışmada piyasadan toplanan 30 farklı bira örneği sterigmatosistin kalıntısı açısından araştırılmış olup, örneklerin hiçbirinde sterigmatosistin kalıntısına rastlanılmamıştır. Ülkemizde en çok tüketilen alkollü içeceklerden biri olan birada STC kalıntısına rastlanılmaması halk sağlığı açısından sevindiricidir. Birada STC varlığı üretiminde kullanılan arpa, malt, pirinç ve buğdaya bağlı olmakta ve çevresel faktörler havadaki nem ve depolama sıcaklığı gibi faktörler STC oluşumunu etkilemektedir. STC ile kontamine olmuş yiyeceklerin tüketilmesi insan sağlığı açısından tehlike oluşturduğundan oluşumunun önlenmesi gerekmektedir. Sterigmatosistin toksik etkisi dikkate alındığında önümüzdeki yıllarda da kontrolünün yapılması önem arz etmektedir.



## 7.KAYNAKLAR

- ABD ALLA, E.A., METWALLY, M.M., MEHRIZ, A.M. and ABU SREE, Y.H. 1996. Sterigmatocystin: Incidence, fate and production by *Aspergillus versicolor* in Ras cheese. *Nahrung*, 40: 310-313.
- ABRAMSON, D. and THORSTEINSON, T. 1989. Determination of sterigmatocystin in barley by acetylation and liquid chromatography. *J. Assoc. Off. An. Chem.*, 72:342-344.
- ABRAMSON, D., MILLS, J.T., MARQUARDT, R.R. and FROHLICH, A.A. 1997. Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed form Western Canada. *Can. J. Vet. Res.*, 61: 49-52.
- AGAG, B.I., 2004. Mycotoxins in foods and feeds. *Ass.Univ.Bull. Environ. Res.*, 7 (1) 173-205.
- ATALLA, M.M., HASSANEIN, N.M., EL-BEIH, A.A. and YOUSSEF, Y.A. 2003. Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergilli* in relation to different relative humidities and storage periods. *Nahrung*, 47: 6-10.
- BEGUM, F. and SAMAJPATI, N. 2000. Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds. *Naturwissenschaften*, 87: 275-277.
- BENNETT, J.W. and KLICH, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol 16:No:3 497-516.
- BUCKLE, A. E., 1983. The occurrence of mycotoxins in cereals and animal feed-stuffs. *Veterinary Research Communications*, 7:171-186.
- COLE, R.J. 1976. Mycotoxins and other fungal related food problems. Editör J.V.Rodricks, *Advanced Chem.Ser.* 149.Am.Chem. Soc., Washington, D.C.,68-89.
- COLE, R. J. and COX, R.H. 1981. *Handbook of toxic fungal metabolites*, Academic Press, New York.
- DAVIS, N.D. 1981. Sterigmatocystin and other mycotoxins produced by *Aspergillus species*. *J. Food Prot.*, 44:711-714.
- DESPHANDE, S.S. 2002. *Handbook of food toxicology*. Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Avenue, pp.387-457. New York, USA.
- DICKENS, F., JONES, H.E.H. and WAYNFORTH, H.B., 1966. Oral subcutaneous and intratracheal administration of carcinogenic lactones and related substances: the intratracheal administration of cigarette tar in the rat. From the Courtauld Institute of Biochemistry, Middlesex Hospital Medical School, London W.1, 134-144.

- EL-KADY, I.A., EL-MARAGHY, S.S. and MOSTAFA, M.E. 1995. Natural occurrence of mycotoxins in different species in Egypt. *Folia Microbiologica*, 40: 297-300.
- EL-SHANAWANY, A.A., MOSTAFA, E.M. and BARAKAT, A. 2005. Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergilli* toxins. *Mycopathologia*, 159: 281-289.
- ENGEL, G. and TEUBER, M. 1980. Formation and distribution of sterigmatocystin in cheese inoculated with *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus nidulans*. *Milchwissenschaft*, 35: 721-724.
- ENGELHART, S., LOOCK, A., SKUTLAREK, D., SAGUNSKI, H., LOMMEL, A., FÄRBER, H. and EXNER, M. 2002. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 3886-3890.
- FRANCIS, O.J., WARE, G.M., CARMAN, A.S. and KUAN, S.S. 1985. Thin layer chromatographic determination of sterigmatocystin in cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68: 643-645.
- FRANCIS, O.J., WARE, G.M., CARMAN, A.S., KIRSCHENHEUTER, G.P., Kuan, S.S. and NEWELL, R.F. 1987. Thin-layer chromatographic determination of sterigmatocystin in cheese: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. An. Chem.*, 70:842-844.
- FUJII, K., KURATA, H., SHIGEYOSKI, O. and HATSUDA, Y. 1976. Tumour induction by a single subcutaneous injection of sterigmatocystin in newborn mice. *Cancer Res.* 36:1615-1618.
- GIMENO, A. 1979. Thin Layer Chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenon, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicilic acid, patulin and penitrem A. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 62: 579-585.
- GİRĞİN, G., BAŞARAN, N. ve ŞAHİN, G. 2001. Dünyada ve Türkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler. *Türk Hij.Den. Biyol. Derg.*, 58: 97-118.
- GRAVESEN, S., NIELSEN, P.A., IVERSEN, R. and NIELSEN, K.F. 1999. Microfungal contamination of damp buildings-examples of risk constructions and risk materials. *Environ. Health Perspect*, 3: 505-508.
- HALLS, N.A. and AYRES, J.C. 1973. Potential production of sterigmatocystin on country-cured ham. *Applied Microbiology*, 26: 636-637.
- HALLS, N.A. and AYRES, J.C. 1975. Factors affecting the production of sterigmatocystin in semisynthetic media. *Applied Microbiology*, 30:702-703.

- HSIEH, D.P., LIN, T. and YAO, R.C. 1973. Conversion of sterigmatocystin to aflatoxin B<sub>1</sub> by *Aspergillus parasiticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 1114-1118.
- HOLZAPFEL, C.W., PURCHASE, I.F.H., STEYN, P.S. and GOUWS, L. 1966. The toxicity and chemical assay of sterigmatocystin, a carcinogenic mycotoxin, and its isolation from two new fungal sources. *S.A. Medical Journal*, 1100-1001.
- HURST, W., SYNDER, K. and MARTIN, R. 1987. High-performance liquid-chromatographic determination of the mycotoxins patulin, penicillic acid, zearalenone and sterigmatocystin in artificially contaminated cocoa beans. *J. Chromatogr.*, 392: 389-396.
- KAYA, S. Mikotoksinler. In:Kaya S., Pirinçci, İ., Bilgili, A. 2001. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. İkinci Baskı. Ankara, Medisan Yayınevi, 537-571.
- KAPETANAKOU, A. E., PANAGOU, E. Z., GIALITAKI, M., DROSINOS, E. H., and SKANDAMIS, P. N. 2009. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins, *Food Control*, 20, 725-732.
- KESER, O. ve KUTAY, H.C. 2008. Mikotoksinlerin önlenmesinde kullanılan bazı yöntemler. I.Fiziksel yöntemler. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 34: 63-70.
- LEPOM, P. 1986. Determination of sterigmatocystin in feed by high- performance liquid chromatography with column switching. *Journal of Chromatography*, 354: 518-523.
- LUND, F., FILTENBORG, O. and FRISVAD, J.C. 1995. Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, 12: 173-180.
- MAHROUS, K.F., KHALIL, W.K.B. and MAHMOUD, M.A. 2006. Assessment of toxicity and clastogenicity of sterigmatocystin in Egyptian Nile tilapia. *African Journal of Biotechnology*, 5:12, 1180-1189.
- MARQUARDT, R.R. and FROHLICH, A.A. 1992. A review of recent advances in understanding Ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70: 3968-3988.
- NIELSEN, K.F., GRAVESEN, S., NIELSEN, P.A., ANDERSEN, B., THRANE, U. and FRISVAD, J.C. 1999. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia*, 145: 43-56.
- NODA, K., UMEDA, M. and UENO, Y. 1981. Cytotoxic and mutagenic effects of sterigmatocystin on cultured Chinese hamster cells. *Carcinogenesis*, 2: 945-949.

- NORTHOLT, M.D., VAN EDMOND, H.P., SOENTORO, P. and DEIJLL, E. 1980. Fungal growth and presence of sterigmatocystin in hard cheese. *J.Assoc.Off. Anal. Chem.*, 63:115-119.
- OMINSK, K.H., MARQUARD, R.R., SINHA, R.N. and ABRAMSON, A. 1994. Ecological Aspects of Growth and Mycotoxin Production by Stroage Fungi: 287-312.
- ORUÇ, H.H. 2005. Mikotoksinler ve tanı yöntemleri. *Uludağ Univ. J.Fac. Vet. Med.*, 24:105-110.
- OZAY, G. and HEPERKAN, D. 1989. Mould and mycotoxin contamination of stored corn in Turkey. *Mycotox.Res.*, 5:81-85.
- PURCHASE, I.F.H. and VAN DER WATT, J.J. 1969. Acute toxicity of sterigmatocystin to rats. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 7:135-139.
- PURCHASE, I.F.H. and VAN DER WATT, J.J. 1970. Carcinogenicity of sterigmatocystin. *Food Cosmet. Toxicol.*, 8: 289-295.
- PURCHASE, I.F.H. and PRETORIU, M.E. 1973. Sterigmatocystin in coffee beans. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 56: 225-226.
- RABIE, C.J., LUBBEN, A. and STEYN, M. 1976. Production of sterigmatocystin by *Aspergillus versicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on semisynthetic liquid and solid media. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 206-208.
- RABIE, C.J., STEYN, M. and VAN SCHALKWKY, G.C. 1977. New species of *Aspergillus* producing sterigmatocystin. *Applied and Environmental Microbiology*. 33:1023-1025.
- REIß, J. 1976. Mycotoxins in foodstuffs. VI. Formation of sterigmatocystin in bread by *Aspergillus versicolor*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 160: 313-319.
- REIJULA, K. and TUOMI, T. 2003. Mycotoxins of *Aspergilli*. Exposure and health effects. *Fornt. Biosci.*, 8: 232-235.
- RODRICKS, J.V. 1969. Fungal metabolites which contain substituted 7,8-dihydrofuro-[2,3-b]furans (DHFF) and 2,3,7,8-tetrahydrofuro[2,3-b]furans (THFF). *J.Agr. Food Chem.*, 17:457-461.
- SALHAB, A.S., RUSSELL, G.F., COUGHLIN, J.R. and HSIEH, D.P. 1976. Gas-liquid chromatography and mass spectrometric ion selective detection of sterigmatocystin in grains. *J. Assoc. Off. An. Chem.*, 59:1037-1044.

- SCHROEDER, H.W. and KELTON, W.H. 1975. Production of sterigmatocystin by some species of the genus *Aspergillus* and its toxicity to chicken embryos. *Applied Microbiology*, 30:589-591.
- SCOTT, P.M., VAN WALBEEK, W., KENNEDY, B. and ANYETI, D. 1972. Mycotoxin (Ochratoxin, Citrinin and Sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *J. Agr. Food Chem.*, 20: 1103-1109.
- SCOTT, P.M. 1989. Mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products. In: van Egmond HP, editor. *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science: London. pp. 193–259.
- SCOTT, P.M., in MAGAN, N., OLSEN, M. (Eds.), 2004. Mycotoxins in Food-Detection and Control –Other mycotoxins-17.4.1 Sterigmatocystin, Woodhead Publishing Limited, 417, Cambridge.
- SCUDAMORE, K.A., HETMANSKI, M.T., CLARKE, P.A., BARNES, K.A. and STARTIN, J.R. 1996. Analytical method for the determination of sterigmatocystin in cheese, bread and corn products using HPLC with atmospheric pressure ionization mass spectrometric detection. *Food Additives and Contaminants*, 13:343-358.
- SCUDAMORE, K.A., HETMANSKI, M.T., CHAN, H.K., COLLINS, S. 1997. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Additives and Contaminants*, 14: 157-173.
- SEPTIEN, I., CUTULI, M.T., GARCIA, M.E., SUAREZ, G. and BLANCO, J.L. 1993. Solubility and stability of sterigmatocystin in different organic solvents. *Toxicol.*, 31: 1337-1340.
- SENGUN, I.Y., YAMAN, D.B. and GONUL, S.A. 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal.*, 291-298.
- SHANNON, G.M. and SHOTWELL, O.L. 1976. Thin layer chromatographic determination of sterigmatocystin in cereal grains and soybeans. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.*, 59: 963-965.
- SIRIWARDANA, M.G. and LAFONT, P. 1979. Determination of mycophenolic acid, penicilic acid, patulin, sterigmatocystin and aflatoxins in cheese. *J. Dairy Sci.*, 62: 1145-1148.
- SOARES, L.M. and RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1989. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72: 22-26.

- SOMMER, N.F., BUCHANAN, J.R. and FORTLAGE, R.J. 1976. Aflatoxin and sterigmatocystin contamination of pistachio nuts in orchards. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 64-67.
- SPADARO, D., PATHARAJAN, S., LORE, A., GULLINO, M.L. and GARIBALDI, A. 2010. Effect of pH, water activity and temperature on the growth and accumulation of ochratoxin A produced by three strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Italian vineyards. *Phytopathol. Mediterr.*, 49:65-73.
- SREEMANNARAYANA, O., FROHLICH, A.A. and MARQUARDT, R.R. 1987. Acute toxicity of sterigmatocystin to chicks. *Mycopathologia*, 97: 51-59.
- STACK, M.E., NESHEIM, S., BROWN, N.L. and POHLAND, A.E. 1976. Determination of sterigmatocystin in corn and oats by gel permeation and high-pressure liquid chromatography. *J.Assoc.Off Anal. Chem.*, 59: 966-970.
- STROKA, J., DASKO, L., SPANGENBERG, B. and ANKLAM, E. 2004. Determination of the mycotoxin, sterigmatocystin, by thin layer chromatography and reagent-free derivatisation. *Journal of Liquid chromatography &Related Technologies*, 27: 2101-2111.
- SULYOK, M., RUDOLF, K. and SCHUHMACHER, R. 2007. A Liquid chromatography/ tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389: 1505-1523.
- TAKAHASHI, H., YASAKI, H. and NANAYAMA, U. 1984. Distribution of sterigmatocystin and fungal mycelium in individual Brown rice kernels naturally infected by *Aspergillus versicolor*. *Cereal Chem.*, 61: 48-52.
- TANAKA, K., SAGO, Y., ZHENG, Y., NAKAGAWA, H. and KUSHIRO, M. 2007. Mycotoxin in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 59-66.
- TAPIA, M. O. 1985. A quantitative thin layer chromatography method for the analysis of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, T-2 toxin and sterigmatocystin in foodstuffs. *Rev. Argent Microbiol.*, 17: 183-186.
- TERAO, K. 1983. Sterigmatocystin-a masked potent carcinogenic mycotoxin. *J. Toxicol., Toxin Rev.* 2: 77-110.
- THURM, V., PAUL, P. and KOCH, C. 1979a. Hygienic significance of sterigmatocystin in vegetable foods. 1. Analytic detection of sterigmatocystin. *Nahrung*, 23: 111-115.
- THURM, V., KOCH, C.E. and PAUL, P. 1979b. Hygienic significance of sterigmatocystin in vegetable foods. 3. Occurrence of sterigmatocystin. *Nahrung*, 23: 121-123.



- TUNAİL, N. 2000. Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. Funguslar ve mikotoksinler. Ankara Üniversitesi Ziraat fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, 3. Bölüm,13. Kısım, Ankara.
- VAN EGMOND, H.P., PAULSCH, W.E., DEIJLL, E. and SCHULLER, P.L. 1980. Thin layer chromatographic method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin in cheese. *J.Assoc.Off Anal. Chem.*, 63: 110-114.
- VAN EGMOND, H.P. and PAULSCH, W.E. 1986. Determination of mycotoxins. *Pure & Appl. Chem.*, 58: 315-326.
- VERINGA, H.A., VAN DEN BERG, G. and DAEMEN, C.B.G. 1989. Factors affecting the growth of *Aspergillus versicolor* and the production of sterigmatocystin on cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 43: 311-326.
- VERŠILOVSKIS, A., BARTKEVIČS, V. and MIĶELSONE, V. 2007. Analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray positive ionization. *Journal of Chromatography A.*, 1157: 467-471.
- VERŠILOVSKIS, A., DE SAEGER, S. and MIĶELSONE, V. 2008a. Determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *World Mycotoxin Journal.*, 1: 161-166.
- VERŠILOVSKIS, A., BARTKEVIČS, V. and MIĶELSONE, V. 2008b. Sterigmatocystin presence in typical Latvian grains. *Food Chemistry*, 109: 243-248.
- VERŠILOVSKIS, A. and MIĶELSONE, V. 2008. Sterigmatocystin presence in different Latvian bread samples. *Foodbalt.*, 156-160.
- VERŠILOVSKIS, A., VAN PETEGHEM, C. and DE SAEGER, S. 2009. Determination of sterigmatocystin in cheese by high-performance liquid chromatography –tandem mass spectrometry. *Food Additives and contaminants*, 26: 127-133.
- VERŠILOVSKIS, A. and DE SAEGER, S. 2010. Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods-An overview. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 54: 136-147.
- VESONDER, R.F. and HORN, B.W. 1985. Sterigmatocystin in dairy cattle feed contaminated with *Aspergillus versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 234-235.
- VOLKOV, N.V. 1994. The diagnosis of mycotoxin hepatitis in swine. *Microbiol Z.*, 56: 29-33.
- VORSTER, L.J. and PURCHASE, F.H. 1968. A method for the determination of

sterigmatocystin in grains and oilseeds. *Analyst.*, 93: 694-696.

WEIDENBÖRNER, M. 2001. *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. New York, Springer.

YOUSSEF, M.S., EL-MAGHRABY, O.M.O. and IBRAHIM, Y.M. 2008. Microbiota and mycotoxins of Egyptian peanut (*Arachis Hypogaea* L.) seeds. *Int. J. Bot.*, 4: 349-360.

ZACHARIÁSOVA, M., CAJKA, T., GODULA, M., MALACHOVA, A., VEPRÍKOVA, Z. and HAJŠLOVA, J. 2010. Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 24: 3357-3367.

## ÖZGEÇMİŞ

Meryem YILDIZ ÖCAL 1981 yılında Antalya'nın Manavgat ilçesinde doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Manavgat'ta tamamladı. 1996 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 1997 yılında Hacettepe Üniversitesi'ne yatay geçiş yaparak 2001 yılında Gıda Mühendisi olarak mezun oldu. 2004 yılına kadar özel sektörde Gıda Hijyen sorumlusu olarak çalıştıktan sonra Kamu hizmetine başladı. Kasım 2004-Mart 2006 yılları arasında Isparta İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğünde Kontrol Görevlisi olarak görev yaptı. Mart 2006 yılından itibaren Manavgat İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğünde Kontrol Görevlisi olarak görevine devam etmektedir. Ocak 2010 Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime devam etmektedir. Evli ve 1 çocuğu vardır.