

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FINDIK VE İNCİRLERDE AFLATOKSİN TAYİNİ
VE METOT DOĞRULAMASI**

**TE YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Banu ÖZER (DURGUN)

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Doç Dr. İnci ARISAN -ATAÇ

İSTANBUL, 2002

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	i
KISALTMA LİSTESİ	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iii
ÇİZELGE LİSTESİ	iv
ÖNSÖZ	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİ	2
2.1 ASPERGILLUS TÜRLERİNDEN A.FLAVUS VE A.PARASITICUS	4
2.1.1 Aspergillus Türü Küfler	4
2.1.2 Aspergillus Flavus ve Aspergillus Parasiticus	5
2.1.2.1 Sayımları	5
2.1.2.2 Tanımlamaları	6
2.1.3 Toksinler ve Toksisiteleri	6
2.1.4 Semptomları	7
2.1.5 Toksin Tespiti	8
2.1.6 Doğada ve Gıdalarda Dağılımı	8
2.1.7 Küf ve Toksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler	10
2.1.7.1 Genel Bilgi	10
2.1.7.2 Sıcaklık Etkisi	10
2.1.7.3 Su Aktivitesi (a_w) Etkisi	11
2.1.7.4 pH Etkisi	12
2.1.7.5 Gıda Koruyucularının Etkisi	12
2.2 MİKOTOKSİN ANALİZLERİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	22
2.2.1 Örnek Alınması	22
2.2.2 Örnek İşlenmesi	22
2.2.3 Mikotoksin Analiz Yöntemleri	23
2.2.3.1 Kromatografik Yöntemler	23
2.2.3.1.1 İnce Tabaka Kromatografisi	23
2.2.3.1.2 Kolon Koromatografisi	24
2.2.3.1.3 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	24
2.2.3.1.4 Gaz Kromatografisi	24
2.2.3.2 İmmunolojik Yöntemler	25
2.2.3.2.1 Enzim Bağlı İmmunosorbant testi (ELISA)	25
2.2.3.2.2 İmmunoafinite Kromatografisi	26
2.2.3.2.3 Radyoimmün Testi	26

2.3	HPLC SİSTEMİ	27
2.3.1	Prensip	27
2.3.2	HPLC Sisteminin Teknik Özellikleri	28
2.3.2.1	Modüler Sistem	28
2.3.2.2	Entegre Sistem	28
2.3.3	HPLC Sistemi Üniteleri	29
2.3.3.1	Solvent Besleme Ünitesi	29
2.3.3.2	Enjeksiyon Bloku	29
2.3.3.3	Kolon	30
2.3.3.4	Dedektör	32
3	FINDIK VE İNCİRLERDE AFLATOKSİN TAYİNİ YÖNTEMİ	34
3.1	Amaç ve Kapsam	34
3.2	Uygulama Yöntemleri	34
3.2.1	Uyarılar	34
3.2.2	Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları	34
3.2.3	Alet Ekipman Tanımları	35
3.2.4	HPLC Şartları	36
3.2.5	Spektrofotometre Kalibrasyonu	36
3.2.6	Stok Standart Hazırlanması ve Kalibrasyonu	37
3.2.6.1	Çalışma Standartlarının Hazırlanması	38
3.2.6.2	Örneğe İlave Edilecek Standart Çözeltinin Hazırlanması	38
3.2.6.3	Kalibrasyon Eğrisi	39
3.2.7	Numune Hazırlanması	39
3.2.7.1	İncir	39
3.2.7.2	Fındık	39
3.2.8	İmmunoafinite Safhası ve Enjeksiyon	39
3.2.9	Hesaplamalar	40
4	AFLATOKSİN ANALİZİ BELİRSİZLİK HESAPLAMASI	44
4.1	Deneysel İşlemler	44
4.1.1	Stok Standart Çözeltisi Hazırlanması	44
4.1.1.1	Stok Standart Çözeltisi Kalibrasyonu	44
4.1.1.2	Ara Stok Standart Çözeltisi Hazırlanması	45
4.1.1.3	Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	45
4.2	Belirsizlik Bileşenlerinin Hesaplanması	45
4.2.1	Aflatoksin Standartı Derişimi Belirsizliği	46
4.2.1.1	Stok Standart Çözelti Hacim Belirsizliği	46
4.2.1.2	Stok Standart Çözelti Derişim Belirsizliği	47
4.2.2	Örnek Tartım Belirsizliği	49
4.2.2.1	Tartım Belirsizliği	49
4.2.2.2	Hacim Belirsizliği	49
4.2.3	Kalibrasyon Eğrisinden Gelen Belirsizlik	50
4.2.4	Geri Kazanım Belirsizliği	54
4.3	Bileşik Belirsizliğin Hesaplanması	54
4.4	Genişletilmiş Belirsizlik	57
4.5	Raporlama	57

5	AFLATOKSİN ANALİZİ METOT DOĞRULAMA	62
5.1	Metod Doğrulama Parametreleri	62
5.1.1	Saptama Sınırı (LOD) ve Hesaplama Sınırı (LOQ)	62
5.1.2	Lineer Ölçüm Aralığı (Linearite)	63
5.1.3	Geri Kazanım	64
5.1.3.1	Fındık	65
5.1.3.2	İncir	68
6	METODUN DEĞERLENDİRMESİ	68
	KAYNAKLAR	69
	ÖZGEÇMİŞ	75



SİMGE LİSTESİ

° C	Santigrat derece
A	Absorbans değeri
aw	Su aktivitesi
C	Konsantrasyon
C ₀	Örnekte bulunan konsantrasyon (ng/ml)
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
Da	Dalton
dk	Dakika
E	Aflatoksinin molar absorptivitesi
E ₁	Her bir aflatoksinin Benzen/Asetonitril içindeki molar absorbtivitesi,
F	Faktör
g	Gram
H ₂ O	Su
HCl	Hidroklorik asit
kg	Kilogram
KGy	Radyasyon birimi
Krad	Radyasyon birimi
L	Litre
M	Aflatoksinin molekül ağırlığı
m	Aflatoksin miktarı
µg	Mikrogram
mg	Miligram
Mi	Her bir aflatoksinin molekül ağırlığı,
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
N ₂	Azot
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
ppb	Milyarda bir
R	Geri kazanım
sa	Saat
V	Örnek hacmi
w	Ağırlık
W	Örnek tartımı
ε	Molar absorptivite

KISALTIMA LİSTESİ

AFPA	Aspergillus flavus ve parasiticus agar
ATA	Alimentary Toxic Aleukia
CPA	Siklopiazonik asit
CYA	Czapek Maya ekstrakt Agar
D-değeri	Ölüm değeri
DG18	Dikloran %18 gliserol agar
DRBC	Dikloran rose bengal kloramfenikol agar
ELISA	Enzim Bağlı İmunosorbant Testi
GC	Gaz Kromatografisi
Glu/fruk	Glukoz/fruktoz
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
LC	Likid Kromatografisi
LOD	Saptama Limiti
LOQ	Hesaplama Limiti
MY	Malat ekstraktı
ND	Tespit edilmedi
NG	Herhangi bir a_w değerinde oluşum tespit edilmemiştir
NS	Veri yok
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
RIA	Radyoimmun test
RSD	Relatif Standart Sapma
SD	Standart Sapma
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Aflatoksinlerin kimyasal yapıları 2
Şekil 2.2a	Elektron mikroskopu altında Aspergillus Flavus'un görünüşü 4
Şekil 2.2b	Elektron mikroskopu altında Aspergillus Flavus'un görünüşü 4
Şekil 2.3	Katı besi ortamında A.Flavus kolonileri 5
Şekil 2.4	Yerfıstığı tohumu üzerinde Aspergillus Flavus'un sporulasyonu 9
Şekil 2.5	Kolon dolgu maddeleri 31
Şekil 2.6	Genel HPLC görünümü 33
Şekil 3.1	Fındık numunesinin aflatoksin kromatogramı 41
Şekil 3.2	İncir numunesinin aflatoksin kromatogramı 42
Şekil 3.3	Yerfıstığı numunesinin aflatoksin kromatogramı 43
Şekil 4.1	Deneysel İşlemler 44
Şekil 4.2	Belirsizlik Bileşenleri 46
Şekil 4.3	Aflatoksin B1 kalibrasyon eğrisi 51
Şekil 4.4	Aflatoksin G1 kalibrasyon eğrisi 51
Şekil 4.5	Aflatoksin B2 kalibrasyon eğrisi 52
Şekil 4.6	Aflatoksin G2 kalibrasyon eğrisi 52

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 A.flavus konidyumlarının ölüm ve yaşamı, aflatoksinlerin yıkımı	13
Çizelge 2.2 A.flavus gelişmesi ve aflatoksin üretimi limitleri	13
Çizelge 2.3 Sıcaklık ve aflatoksin yıkımı	14
Çizelge 2.4 Su aktivitesi ve A.flavus'un büyümesi	15
Çizelge 2.5 pH ve A.flavus büyümesi (Czapek maya ekstrakt agar üzerinde)	16
Çizelge 2.6 Koruyucu (sorbik asit) ve A.flavus büyümesi	16
Çizelge 2.7 pH ve koruyucunun 52°C'de ısıtılmış A.flavus konidyumlarının ölüm oranları (D-değerleri) üzerine etkisi	16
Çizelge 2.8 Su aktivitesi, çözelti tipi ve koruyucunun 52°C'de ısıtılmış pH 4.5'e ayarlanmış A.flavus konidyumlarının ölüm oranları üzerine etkisi	17
Çizelge 2.9 A.parasiticus konidyumlarının ölüm ve yaşamı, aflatoksinlerin yıkımı	18
Çizelge 2.10 A.parasiticus tarafından aflatoksin üretim ve büyüme limitleri	18
Çizelge 2.11 Sıcaklık ve A.parasiticus NRRL 2999 tarafından prinç üzerinde aflatoksin üretimi	18
Çizelge 2.12 Sıcaklık ve A.parasiticus tarafından yer fıstığı üzerinde aflatoksin üretimi .	19
Çizelge 2.13 Su aktivitesi ve aflatoksin üretimi (ürün üzerinde A.parasiticus tarafından) .	20
Çizelge 2.14 pH ve A.parasiticus büyümesi (Czapek maya ekstrakt agar üzerinde)	21
Çizelge 2.15 Başlangıçtaki ortamın pH'sı ve A.parasiticus tarafından aflatoksin üretimi .	21
Çizelge 2.16 Koruyucu (sorbik asit) ve A.parasiticus büyümesi	21
Çizelge 3.1 Aflatoksinlerin molekül ağırlığı (Mi) ve molar absorptivite (E ₁)	37
Çizelge 3.2 Çalışma standartlarının hazırlanması	38
Çizelge 4.1 Aflatoksin Stok Çözelti Hacim Belirsizlik Bileşenleri	47
Çizelge 4.2 Toplam derişim belirsizliği değerleri	48
Çizelge 4.3 Kalibrasyon eğrisi verileri ve belirsizlik hesaplama	54
Çizelge 4.4 Bileşik Belirsizlik (Fındık için)	55
Çizelge 4.5 Bileşik Belirsizlik (İncir için)	56
Çizelge 4.6 B1 Kalibrasyon Verileri	58
Çizelge 4.7 B2 Kalibrasyon Verileri	59
Çizelge 4.8 G1 Kalibrasyon Verileri	60
Çizelge 4.9 G2 Kalibrasyon Verileri	61
Çizelge 5.1 LOD ve LOQ Hesaplama	63
Çizelge 5.2 Fındık için geri kazanım	64
Çizelge 5.3 İncir numunesi için düşük konsantrasyonda geri kazanım	66

Çizelge 5.4	İncir numunesi için yüksek konsantrasyonda geri kazanım	67
Çizelge 6.1	İncir ve Yer fıstığı z-skor değerleri	68



ÖNSÖZ

Yüksek Lisans çalışmalarım sırasında gerek çalışma prensibiyle, gerekse insanı her şeyden üstün tutan hayat görüşüyle bana sonsuz sabırla katlanan ve destek gösteren değerli Hocam Doç. Dr. İnci Ataç'a; benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Güner Özay'a, Dr. Cemil Oğuz'a, Doç. Dr. Ferda Seyhan'a, Murat Özdemir'e, Tübitak Gıda Bilimleri Teknolojisi ve Araştırma Enstitüsünde çalışan arkadaşlarıma ve Megalab ekibine; doğduğumdan bu yana bana bildikleri tüm doğruları bana öğretmeye çabalayan, insan hayatında bilginin ve öğrenmenin her zaman için geçerli olduğunu öğreten saygıdeğer annem Şükran Durgun'a, babam Şadi Durgun'a, ablam Ebru Durgun'a ve okumanın sonu olmadığını öğreten halalarım Nermin Saatçioğlu ve Sevim Durgun'a teşekkürü bir borç bilirim.



ÖZET

Gıda kaynaklı bazı yaygın küflerin metabolitlerinin toksijenik etkilerinden dolayı sağlık riskleri oluşturabildiği bilinmektedir. *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* kanserojenik toksinler (aflatoksinler) üreten, gıdalarda sık rastlanan küflerdendir. Aflatoksinlerin keşfiyle, bu toksinlerin gıdalardaki konsantrasyonlarının tespiti için çeşitli metotlar geliştirilmiştir ve oluşma riskleri bütün dünyadaki gıdalarda rastlanabilecek bir problem olmasından dolayı, kimyasal tespiti standardize edilmiştir.

Bu çalışmada standardize metotlardan biri kullanıldı ve mevcut laboratuvar şartlarında doğrulaması yapıldı. Ayrıca, yerfıstığı ve kuru incir'deki aflatoksin konsantrasyon seviyesinin tespiti ile ilgili uluslararası kolaboratif çalışmalara katılarak doğrulaması yapılan metodun güvenilir sonuçlar verdiği ispatlandı.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin, doğrulama, belirsizlik, fındık, incir, HPLC



ABSTRACT

It's known that the metabolites of some common foodborne fungi can present a health risk because of their toxigenic effects. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* are the common foodborne fungus which can produce cancerogenic toxins named aflatoxins. Since the discovery of aflatoxins, several methods were developed to detect their concentration in foods. Because aflatoxins are global problem in common foods, chemical determination of aflatoxins has become standardized.

In this study, one of these standardized methods was used and validated in current laboratory conditions. Also, by attending to international collaborative studies about detection of concentration level of aflatoxins in peanut and dried fig paste, it is proved that the validated method gives the correct results.

Keywords: Aflatoxin, validation, uncertainty, hazelnut, fig, HPLC



1. GİRİŞ

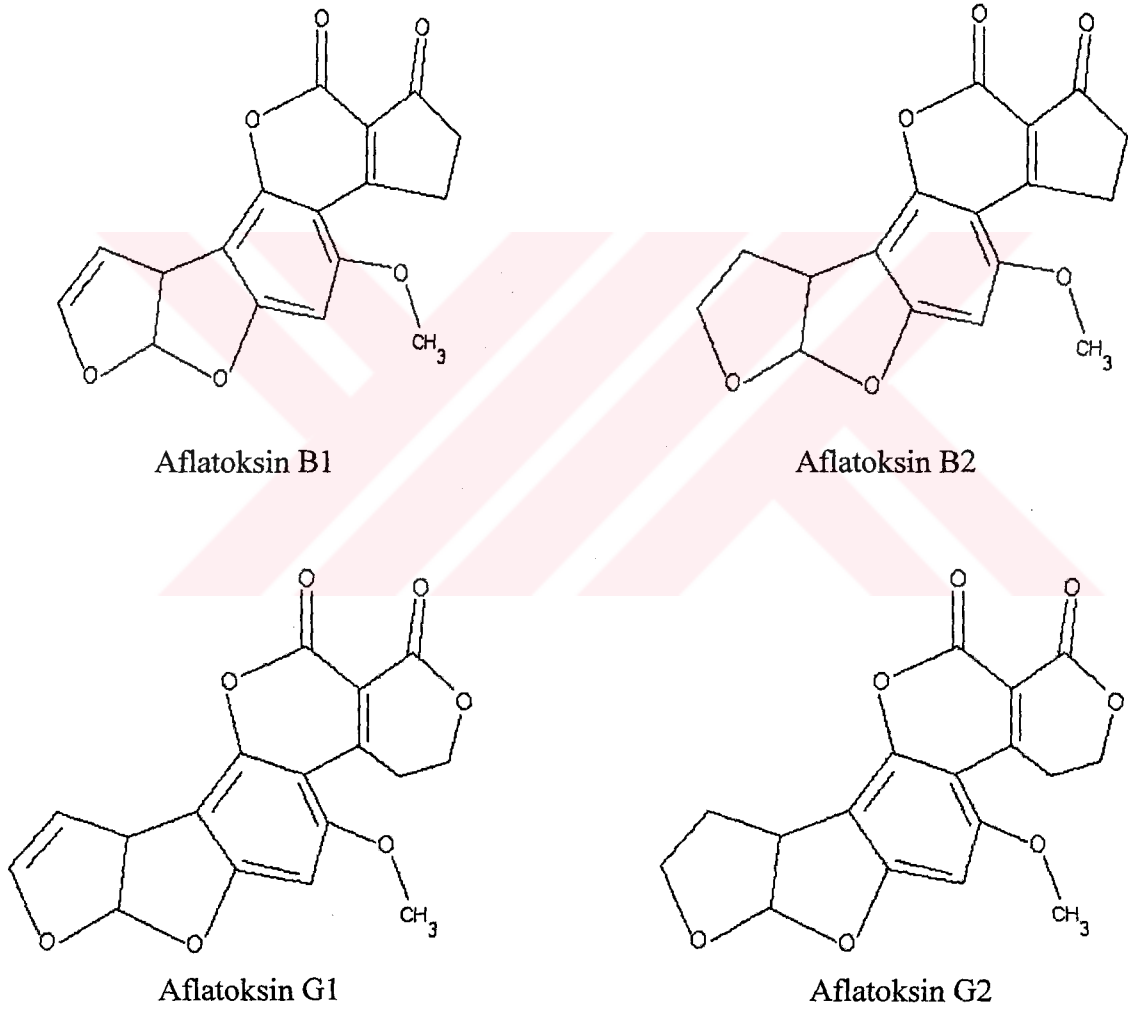
Gıdalarda oluşan küflerin bazı çeşitlerinin insan sağlığı üzerine olumsuz etkisi olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Mikotoksinler tarım ürünlerinde ya hasat öncesi bahçede/tarlada, ya da hasat sonrası depolama sırasında, toksin sentezleyen küflerin gelişmesi sonucunda oluşurlar. Vücut içinde mikotoksin sentezi gerçekleşmemekte, mikotoksinler insan ve hayvanlar tarafından dışarıdan genellikle gıdalarla/yemlerle alınmaktadır.

Fındık ve kuru incir ülkemiz ihraç ürünlerinde önemli bir yer kaplamaktadır. Bu ürünlerin ihracatında karşılaşılan en önemli sorun içerdikleri mikotoksin miktarlarıdır. Bu bakımdan bu ürünlerin mikotoksin kontrolleri gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu amaçla mikotoksinlerin özellikle aflatoksin B1 ve toplam aflatoksin (B1, B2, G1, G2) miktarlarının tespiti için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Ancak son zamanlarda görülmektedir ki ülkemizde aflatoksin kontrolü yapılmış ve tüketime uygun bulunmuş ürünler ihraç edildikleri ülkelerde tekrar analiz edildiğinde aflatoksin içeriği bakımından tüketime uygun olmadığı tespit edilerek geri gönderilmiştir. Bu durum ülkemize maddi ve manevi bakımdan büyük zararlar vermektedir. Dolayısıyla aflatoksin miktarlarının tespiti kadar kullanılan metodun uluslararası standartlara uygunluğunun ve sonuçların doğruluğunun uluslararası otoritelerce belirlenen kriterler ışığında ispatlanmış olması da çok önemlidir. Bu çalışmada fındık ve incirlerde HPLC ile aflatoksin tespiti için kullanılan metodun uluslararası düzeyde doğruluğunun ispatlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

Sıkça görülen küfler tarafından üretilen toksinler mikotoksinler olarak adlandırılırlar; Tanım, gıda ve yemlerde üreyen küfler ile ilgili olup, küflerin tamamı değil, belirli türleri mikotoksin üretmektedir.

Mikotoksinler küflerin ikincil metabolitleridir. Küflerin gelişimi ile ilgili normal metabolizmada yer almazlar ve genellikle gelişimi tamamlanmış mantarlar tarafından üretilirler. Molekül ağırlığı 50 Da olan tek heterosiklik halkalı yapıya sahip olanlarından, toplam molekül ağırlığı 500 Da'dan fazla olan düzensiz olarak dizilmiş 6 veya 8 halkadan oluşan yapıya sahip olanlarına kadar geniş bir aralıkta çok farklı moleküllerdir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Aflatoxinlerin kimyasal yapıları

Mikotoksinler 4 temel toksik etki gösterirler: akut, kronik, mutajenik ve teratojenik. Akut mikotoksin zehirlenmelerinin en çok bilinen etkisi karaciğer veya böbrekte meydana gelen bozukluklardır. Bu bozukluklar ölüme kadar gidebilir. Her ne kadar bazı mikotoksinler protein sentezinin interfere etkisi altında kalsalar da, cilt hastalıkları veya ölümlerden, çok önemli immun hasarlara kadar değişen bir aralıkta etki yapabilirler. Mikotoksinler dışında neurotoksinler vardır. Bunlar düşük dozlarda hayvanlarda sürekli titremelere sebep olabilirler. Sadece daha yüksek dozlarda kalıcı beyin hasarlarına veya ölümlere yol açarlar.

Düşük dozda mikotoksin uzun vadede de çeşitli etkiler gösterir. Birçok mikotoksinin temel kronik etkisi kansere sebep olmaktır. Özellikle de karaciğer kanserine sebep olurlar. Bazı mikotoksinler DNA replikasyonuna sebep olurlar ve bu yüzden mutajenik ve teratojenik etkiler oluşturabilirler.

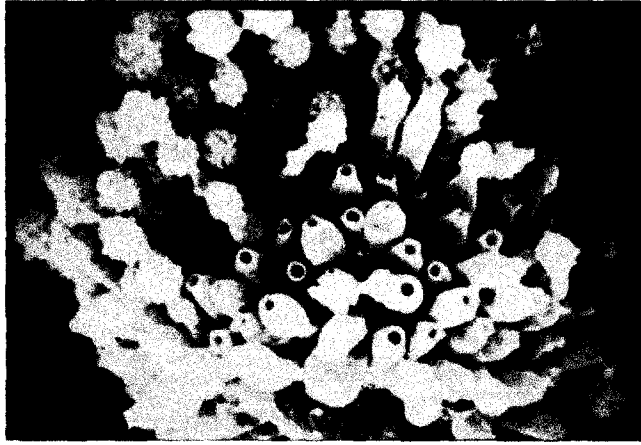
Mikotoksinlerin çoğu bakterial toksinler gibi protein yapısında olmayıp, nispeten daha küçük moleküllerdir. İnsan veya hayvanların immun sistemleri tarafından genellikle tespit edilemezler. Bu özellikleri ile akut mikotoksin zehirlenmelerinin belirtileri bakterial toksinlerden kaynaklanan zehirlenmelerin belirtilerinden oldukça farklıdır. Mikotoksinlerin belirtileri kimyasal yapıları kadar çok farklılık gösterir. Bazıları cilt ölümü, leopenia ve immunosupresyon (immun sistemin baskılanması) gibi bir takım etkiler meydana getirir. Bazı mikotoksinlerin belirtileri ise ölüme kadar anlaşılmaz. Kronik hastalıklar, kanser ve tümör oluşumu gibi akut hastalıklara sebep olan dozlardan daha düşük dozlarda ortaya çıkarlar ve sadece hastalık çok ilerlemiş ise anlaşılabilirler. Sonuç olarak mikotoksinlerin insan sağlığındaki potansiyel tehlikelerden bir tanesi biyolojik olarak tespit edilmelerindeki güçtür.

2.1 ASPERGILLUS TÜRLERİNDEN *A.flavus* ve *A.Parasiticus*

2.1.1 ASPERGILLUS TÜRÜ KÜFLER



Şekil 2.2a Elektron mikroskobu altında *Aspergillus Flavus*'un görünüşü



Şekil 2.2b Elektron mikroskobu altında *Aspergillus Flavus*'un görünüşü

2.1.2 *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*

2.1.2.1 Sayımları

A.flavus ve *A.parasiticus*'un başarılı sayımı koloni dağılımını azaltan uygun inhibitörlerin bulunduğu herhangi bir antibakteriyal sayım ortamında yapılabilir, DRBC ve DG18 tavsiye edilir. Stereomikroskop ile görülen, göreceli olarak hızla büyüyen, orta derinlikte, sarı-yeşil, saçaklı-tomurcuklanan yapılar gösteren koloniler *A.flavus* ve *A.parasiticus* olarak sayılabilir. Mikroskopik değerlendirme destekleyici bilgi verebilir, ama tam tanımlama için standart tanımlama ortamında bu kolonilerden alınan örnekler çalışılmalıdır.

Bu türlerin sayımı için daha etkili başka bir ortam da *Aspergillus flavus* ve *parasiticus* agardır (AFPA). AFPA'nın iki avantajı; 30°C'de iki gün inkübasyon sonrası sayım yapılabilir olması ve iki türün yoğun turuncu-sarı kolonileriyle eğitimsiz gözlemcilerce bile tanımlanabilmesidir. AFPA için belirlenen inkübasyon koşullarında (30°C – 42-48sa) parlak turuncu-sarı renk bu tür için spesifiktir.



Şekil 2.3 Katı besi ortamında *A.Flavus* kolonileri

2.1.2.2 Tanımlamaları

A.flavus ve *A.parasiticus*'un neredeyse tüm türlerde ayrımı zor değildir. Her ikisi de Czapek agar, maltözü agar ve Czapek maya özü agarı gibi standart tanımlama ortamlarında hızla büyürler ve sarı-yeşil konidyum kolonileri oluştururlar. *A.flavus*'u *A.parasiticus*'tan ayırmak daha zordur. En güvenilir ayırım özelliği; konidyum duvarlarındaki yapıdır; 1000 kat büyütmede *A.flavus*'un konidyumları genelde pürüzsüz, hafif pürüzlü görülürken *A.parasiticus*'unkiler ise net olarak pürüzlüdür. Bir çok başka özellikler de sınıflandırmada yararlıdır. Bu türlerin ayrımı önemlidir, *A.flavus* izolatları genelde sadece B aflatoksinleri üretirler ve %50'den az izolat toksijeniktir. *A.parasiticus* izolatları ise G ve B aflatoksinleri üretirler ve istisnasız her zaman toksijeniktirler. *A.flavus* izolatları ayrıca sıklıkla başka bir mikotoksin olan CPA'yı (cyclopiazonic asid) üretebilirler, *A.parasiticus* ise bu mikotoksini üretmez.

2.1.3 Toksinler ve Toksisiteleri

Aflatoksinler doğal olarak sadece *A. flavus*, *A. Parasiticus* ve son zamanlarda yapısı belirlenen bir tür olan *A. Nomius*. B1, B2, G1 ve G2 doğal olarak üretilen 4 ana aflatoksindir. B ve G aflatoksinleri ince tanaka kromatografisi plakasında UV ışık altında mavi ve yeşil floresan renk verir. 1 ve 2 rakamları sırasıyla major ve minor bileşenleri ifade eder. Yem ile alınan aflatoksin B1 ve B2 süt veren hayvanlarda değişikliğe uğrayarak (hidroksillenerek) bir başka aflatoksin formu olan aflatoksin M1 ve M2' e dönüşerek süte geçebilir. M1 ve M2 asıl moleküllerden daha az toksisite gösterir, fakat çocuklar tarafından yaygın bir şekilde tüketildiğinden dolayı dikkate değerdir. Yüksek toksik etkilerinden dolayı bir çok ülke gıdalarda ve yemlerde düşük aflatoksin limitleri ayarlamışlardır.

Aflatoksin B1'in çeşitli hayvan türlerinde bilinen en güçlü karaciğer karsinojeni olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda karaciğer kanseri Orta Afrika'da ve Güneydoğu Asya'nın bazı bölümlerinde yüksek oranlarda görülmektedir. Epidemiyolojik data başlangıçta insanlardaki karaciğer kanseri ile aflatoksinler arasında bir bağın olduğuna işaret etmiştir. Bazı Afrika ülkelerinde ve Tayland'da yapılan çalışmalar aflatoksin alımı ile insanlardaki karaciğer kanseri arasında bir korelasyonun olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, Amerika'da yapılan çalışmalarda tutarsız sonuçlar elde edilmiştir. Stoloff ve Friedman van Rensburg'un çalışmalarının ışığında Amerikanın kırsal alanlarında yaşayan çocuklardan belli bir oranının karaciğer kanserinden ölümlerine neden olacak miktarda aflatoksini mısırdan aldığını hesaplamışlar ve bu ölüm oranının "4-10 / 100.000 yetişkin populusyan" olduğunu

hesaplamalar da gerçekte bu oranın $<1/100.000$ olduğu görülmüştür. Stoloff tarafından yapılan bu hesaplamalar aflatoksinin Amerika'daki karaciğer kanserine kayda değer bir etkisinin olmadığı sonucunu güçlendirmektedir.

Van Rensburg ile Stoloff'un sonuçları arasındaki uyumsuzluk yakın zamanda öne sürülen bilgi çözüme kavuştu: İnsanlardaki bu çeşit karaciğer kanserinin başlaması için önceden veya eşzamanlı olarak Hepatit B virüsünün ortaya çıkması gerekebilir. Görünüşe göre aflatoksin ve Hepatit B ortak karsinojenlerdir. Sadece aflatoksinin ve Hepatit B'nin birlikte yaygın olduğu alanlarda karaciğer kanseri oluşma riski yüksektir. Karşı görüşlü raporlar olmasına karşın, yüksek aflatoksin alımları ile yüksek kanser oranları arasında bir ilişki olduğuna dair kayda değer kanıtlar mevcuttur.

Yakın zamandaki kanıtlar göstermektedir ki primatlar bazı hayvanlarda olmayan çeşitli yollarla aflatoksinlerin toksik etkilerini engelleyebilmektedirler. Aflatoksinlerin toksisiteleri daha önceden düşünülenenden kesinlikle daha azdır. Bununla birlikte hayvanlardaki bilinen karsinojen etkisi o kadar yüksektir ki gıdalarda seviyelerinin tespiti ve miktarlarının mümkün olduğunca düşürülmesi için çok büyük çaba harcanmalıdır. İzin verilen aflatoksin limitlerinin çok düşük seviyelere indirilmeleri devam edecektir.

Cyclopiazonic asid (CPA) *A.flavus* dahil birkaç *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilir. İnsan sağlığındaki rolü tam olarak açığa kavuşmamıştır. Fakat hayvan hastalıklarındaki varlığına dair kanıtlar güçlüdür.

2.1.4 Semptomları

Akut aflatoksin zehirlenmesinin semptomları Hindistanda Hepatit'in ortaya çıkmasından sonra çalışılmaya başlandı. Sarılık, hızla gelişen assit (peritoreal boşluktaki sıvı), ve portal hipertansiyon ile karakterize edilmiş hastalık karaciğerde gıda kaynaklı toksinlerin varlığını gösterir. Bununla birlikte kronik toksisiteye (örn. Karaciğer kanseri) neden olabilen düşük seviyelerdeki aflatoksin varlığı tamamen asimptomatiktir ve indüksiyon periyodu çok uzundur.

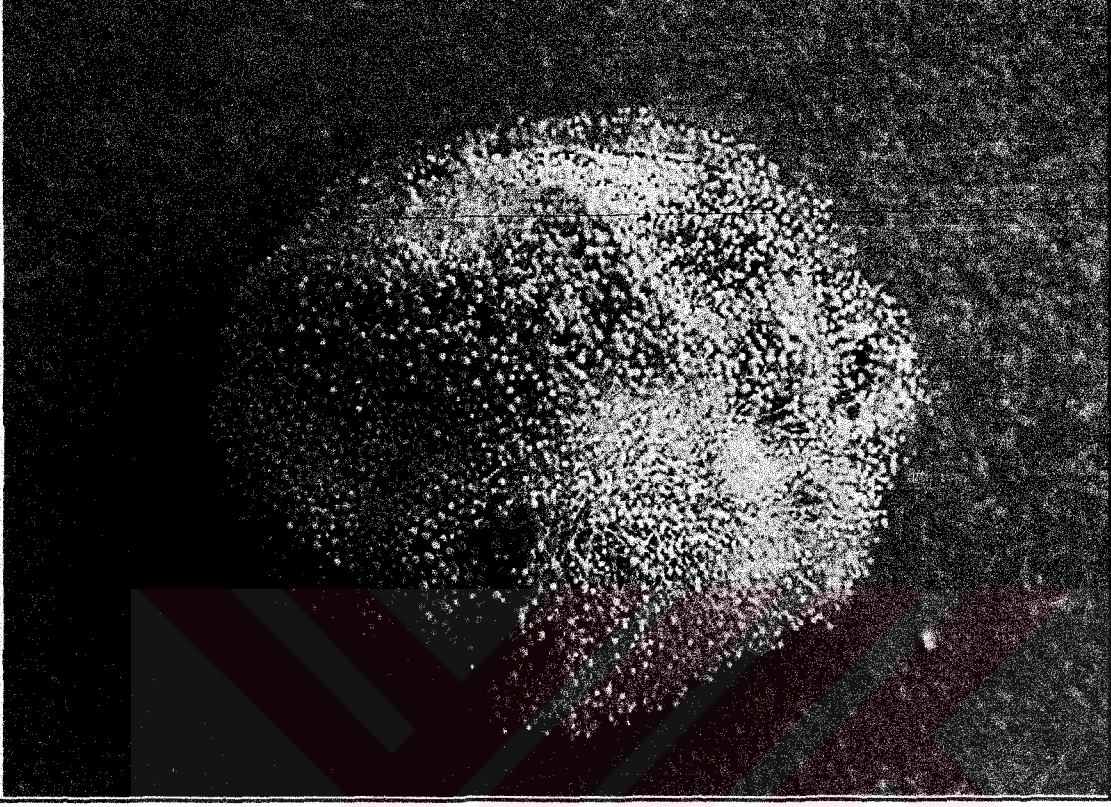
2.1.5 Toksin Tespiti

Aflatoksinlerin kimyasal olarak tespiti standardize edilmiştir (AOAC, 1984; Nesheim and Trucksess, 1986). Numuneler kloroform veya metanol/su ile ekstrakte edilir ve silikagel kolondan veya patentli bir ayırma paketinden (separating pack) geçirerek kısmen saflaştırılır. Daha sonra ekstrakt konsantre edilir ve ayırma yapılır, en çok kullanılan ayırma işlemi ince tabaka kromatografi si ve UV ile gözlelemedir. Daha kolay ve kantitatif ölçüm yapılabilir teknik UV ve absorpsiyon spektrofotometresi tespiti ile yüksek performans sıvı kromatografisidir. Yakın zamanda kromatografi tekniğine alternatif olarak ELISA teknikleri geliştirildi ve ticari amaçlı çeşitli ELISA kitleri kullanılmaya başlandı. Masraflı ve zayıf tespit edilebilme özelliğinden dolayı G aflatoksinlerinin kullanımı gün geçtikçe oldukça azaldı. Bununla beraber, gelişmiş sistemler ve geniş kullanım alanı yakın gelecekte olacaktır.

2.1.6 Doğada ve Gıdalarda Dağılımı

Aflatoksin üreten küfler genellikle yağlı tohumlarda, sert kabuklu meyvelerde (fındık, fıstık, ceviz v.b.) ve hubutta rastlanır. Yerfıstığı, mısır ve pamuk tohumu *A.flavusun* ürettiği en önemli ürünlerdir. Başlangıçta yapılan çalışmalar bu aşırı üremenin öncelikli olarak yetersiz kurutmadan veya yanlış depolamadan kaynaklandığını gösteriyordu ve bu fonksiyonlar nemli ortamlarda kesinlikle aflatoksin oluşumunda önemli bir rol alırlar. Bununla beraber, yakın zamanlarda ılıman iklim bölgelerinde yapılan çalışmalarda bu ürünlerde *A.flavus* üremesinin hasattan önce meydana gelmesinin önemi üzerinde durulmuştur. Yerfıstıklarındaki üreme kuraklık ve buna bağlı faktörler sonucunda meydana gelir. Mısırlardaki hasat öncesi üreme kısmen gelişmekte olan koçanlardaki böcek hasarlarından kaynaklanmaktadır. Pamuk tohumlarında üremenin nektar aracılığıyla oluştuğu düşünülmektedir. Diğer kabuklu yemişlerin çoğu üremeden kolay etkilenirler.

Ayrıca tahıllarda *A.flavus* gelişimi için bilinen bir substrattır. Fakat kabuklu yemişler ve yağlı tohumlar üzerinde yoğunlaşılması sebebiyle küçük taneli tahıllarda *A. flavus* tarafından meydana gelen bozukluklar üzerinde fazla durulmamıştır. Küçük taneli tahıllardaki aflatoksin seviyeleri nadiren kaydadeğer boyuttadır. Baharatlarda da bazen *A.flavus* üreyebilir. Bununla beraber baharat tüketimi çok düşük olduğundan bunlardaki aflatoksin varlığı gerçek bir risk oluşturmaz.



Şekil 2.4 Yerfıstığı tohumu üzerinde *Aspergillus flavus* sporulasyonu

Gelişmiş ülkelerin riskli olan gıdalardaki aflatoksin seviyesinin düşürmek için kullanılması zorunlu olan sınıflandırma ve temizleme prosedürleri vardır. Yerfıstıklarında küf gelişimi çekirdeğin renk değiştirmesi ile birlikte oluşur. İthalat ve ihracat ülkelerinde sağlık kurallarının zorunlu gerekliliklerini yerine getirildiğinden emin olmak için kolay etkilenen ürünlerde ve gıdalarda istatistiksel numune alma, büyük numunelerin ayrılması, alt numunelerin alınmasından önce homojenizasyon ve standardize aflatoksin analizleri kullanılır. Gelişmekte olan ülkeler daha şanssızdır. Düşük standartta kabuklu yemiş ve mısırın üretilip tüketildiği ülkelerde herhangi bir sınıflandırma ve denetim standardı yoktur. Bu yüzden de özellikle de kırsal alanlarda aflatoksin alımı her zaman çok yüksektir.

2.1.7 Küf ve Toksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

2.1.7.1 Genel Bilgi

Çizelge 2.1'de ve çizelge 2.9'de *A.flavus* ve *A.parasiticus* ölümlerinde direkt olarak etkili ana faktörlerin özeti verilmiştir. Çizelge 2.2'de ve çizelge 2.10'da da *A.flavus'un* ve *A.parasiticus'un* büyümesinde ve aflatoksin üretiminde etkili önemli çevresel parametrelerin özeti mevcuttur. *A.flavus'un* önemli özelliği üst mezofilik alanda geniş bir ısı aralığında üreme yeteneğidir. *A.flavus* aynı zamanda kserofiliktir ve 0,8'e kadar olan su aktivitesi (aw) değerlerinde büyüme gösterir.

Aflatoksinin 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda üretildiği rapor edilse de, çoğu raporda yaklaşık 34°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda az miktarda toksin üretiminin olduğu belirtilmektedir. Bu sıcaklık büyüme için gerekli yüksek limitin yaklaşık 10°C altındadır.

2.1.7.2 Sıcaklık Etkisi

A.flavus ısıya çok dirençli değildir, 52°C'de 40 dak. 60°C'de 1 dakikadan az D-değerine (ölüm değeri) sahiptir. Ortalama 2.5-4.5 arasındaki pH'ların etkisi minimaldir. Su aktivitesi kısmen koruyucu etki sağlasa da bu bitkisel bakteri veya maya hücrelerine göre mantar sporlarında daha azdır. 52°C'de *A.flavus* konidyumlarının D-değerleri 44 dk'dan 54 dk'ya çıkarken sukroz değerleri de 0'dan %60'a çıkmıştır (aw 0,99'dan 0,89'a Çizelge 2.8). NaCl etkisi daha kompleksdir; %6'ya kadar olan konsantrasyonlar D-değerlerinde artışa neden olurken daha yüksek konsantrasyonlarda düşüşe neden olur.

Büyüme 10°C'de veya biraz altında başlar ve 43°C'ye kadar devam eder. Optimal büyüme 30°C'yi biraz geçince elde edilir. Optimal sıcaklıklarda özgül büyüme hızları 500µm/h (yaklaşık 25mm/gün olabilir).

Aflatoksin en az 15-37°C arasındaki sıcaklıklarda üretilir. Ama optimum sıcaklık belirlenemez. Sıcaklığı hesaba katmadan, doğal substratların incelenmesinde yüksek aflatoksin üretimi görülmüştür. Literatürlerden bilinen aflatoksinin ısıyla yavaşça yok edildiğidir (Çizelge 2.3). Anlamlı aflatoksin konsantrasyonlarının azaltılabilmesi için yüksek doz iyonize radyasyon gereklidir (Çizelge 2.1)

A.parasiticus'un sıcaklıkla etkileşiminde yüksek konsantrasyonda sodyum klorür ve sukroz yüksek derecede koruyucu bulunmuştur.; aw'nin 0,85-0,90 değerlerinde, 55°C'de D-değerleri basal ortamdaki gibi 25 kat yüksek bulunmuştur. Spor yaşının yükseltilmesi sıcaklık direncini belirgin olarak azaltır, pH kullanılan tampon sistemine bağlıdır.

A.flavus gibi bu tür de üst mezofilde hızlıca büyür. İki türün de tüm büyüme parametreleri benzerdir, ama *A.parasiticus*'un maksimum özgül büyüme hızı biraz düşüktür. Optimal büyüme 30°C'de gelişir.

Pirinç (Çizelge 2.11) ve yer fıstığı (Çizelge 2.12) gibi ürünler kullanılarak yapılmış daha detaylı çalışmalar gösteriyor ki B ve G aflatoksin üretim oranı sıcaklık ile değişkenlik gösterir, düşük ısıda daha çok aflatoksin üretilmektedir. 30°C üzerinde aflatoksin B1 üretimi baskındır.

2.1.7.3 Su Aktivitesi (aw) Etkisi

A.flavus üzerine su aktivitesinin (aw) etkisi ile ilgili datalar (Çizelge 2.4) gösteriyor ki; Büyüme için optimal aw yüksek (ca 0.99) iken, maksimum aw ise 0.998 değerinde olabilmektedir. Büyüme için minimum aw belli değildir. Bazı yayınlarda aw 0.80'de büyüme rapor edilirken bazılarında daha yüksek değerler verilmiştir.

Su aktivitesinin (aw) *A. Parasiticus* üzerine etkisini gösteren çalışmalarda *A.parasiticus*' un büyümesi için minimum aw 0.83 bulunmuşken, aflatoksin üretimi için belirlenen minimum aw 0.87'dir.

Laboratuar ortamındaki verilerden elde edildiği üzere yüksek aw değerlerinde aflatoksin üretimi de beklenildiği gibi artmaktadır. Aw 'nin doğal ürünlerde aflatoksin üretimine etkisini gösteren veriler ise sınırlıdır (Çizelge 2.13)

Diener ve Davis'in verileri *A parasiticus*'un aflatoksin üretimi için alt limit aw değerini 0.86 olarak önermektedir, fakat başka yazarlarca 0.86 değerinde göreceli olarak yüksek düzeylerde üretim bildirildiğinden (Çizelge 2.13) gerçek değer biraz daha düşük olduğu düşünülmektedir. Yeni çalışmalar gerekmektedir

2.1.7.4 pH Etkisi

pH'nın *A.flavus* büyümesine etkisi minimaldir (Çizelge 2.5). Bu tür test edilen tüm pH değerlerinde (2.1 – 11.2) büyüdüyse de; pH<3.5 olduğunda büyüme hızının düştüğü ve pH<3.0 düzeylerinde daha da belirgin düşme gözlenmiştir.

Çizelge 2.14'da pH'nın *A. Parasiticus*'un büyümesi üzerine etkisi gösterilmiştir. Optimal büyüme pH 4 ile 7 arasında elde edilmiştir. *A. parasiticus* pH 2.2 'de üreyemezken, *A. flavus* pH 2.1'de önemli bir büyüme göstermiştir. (Çizelge 2.5)

Çizelge 2.15'da pH'nın aflatoksin üretimine etkisi tam olarak belirlenmiştir. Başlangıç pH değerlerine ait limitli veriler pH6'da aflatoksin üretiminde keskin bir pik, pH4'te azalma ve pH3'te çok az üretim göstermektedir.

2.1.7.5 Gıda Koruyucularının Etkisi

Özellikle düşük pH'da, düşük konsantrasyonda koruyucu bile *A.flavus* konidyumlarının sıcaklık direncini belirgin olarak azaltır (Çizelge 2.7). Sodyum benzoat potasyum sorbat'a oranla daha etkili bulunmuştur. Benzer etkinlik gösterdiklerine inanıldığından bu farklılık açıklanamamıştır. Yüksek sukroz konsantrasyonları D-değerlerinde koruyucuların etkisini azaltırlar.

A.flavus'un büyümesine koruyucuların etkisi ile ilgili veriler eksiktir (Çizelge 2.6). Bu konuyla ilgili bazı yayınlar yayınlandıysa da *A.parasiticus* ile ilgili olduğundan veya önemli bilgileri (pH gibi) eksik olduğundan dahil edilmez.

Sorbik asidin *A. parasiticus* büyümesi üzerine etkisi geniş olarak çalışılmıştır. (Çizelge 2.16) Büyümeyi önlemek için pH 5.0-5.5 arasında 1000-1500mg/kg sorbik asit gereklidir. Asetik asit büyümeyi pH 4.5'te 8000mg/kg olarak tam inhibe eder, 4000mg/kg ise etkisiz olduğu değerdir. Aynı pH'da propionik asidin 2000mg/kg'ı büyümeyi tam olarak inhibe ederken, 1000mg/kg etkisiz dozudur.

Genelde aflatoksin üretimindeki inhibisyon büyüme inhibisyonu ile paraleldir. Büyüme inhibisyonunun ciddi olduğu zamanlarda aflatoksin üretimi de çok limitlidir. Yine de koruyucular varlığında büyüme gelişirse aflatoksin üretimi olasılığı da göz önünde bulundurulmalıdır.

Çizelge 2.3 Sıcaklık ve aflatoksin yıkımı

Substrat	Isıtma metodu	Sıcaklık (°C)	Zaman (dak)	Aflatoksin azalması (%)	Ref.
Pamuk tohumu unu ^a	Cekletli ısıtıcı	100	120	70	1
Mısır tanesi	Kaynama	100	30	30	2
Mısır tanesi	Fırında pişirme	220 ^b	25	13	2
Mısır tanesi	Kızartma	175	20	35-50	2
Yer Fıstığı	Kızartma	235	NS	B1, G1 40-50 B2, G2 20-40	3
Yer Fıstığı	%5 tuzlu suda kaynatma ^c	116	30	80-100	4
Yer Fıstığı	Tuzsuz suda kaynatma ^c	116	30	32-37	4
Yer Fıstığı	Mikrodalga (1.6 kW)	137	15	69	5
Yer Fıstığı	Mikrodalga (3.23 kW)	150	5	95	5
Hindistan cevizi yağı	Güneş ışığı ^d	ambient	NS	75	6

^a Yüksek nem (%20). Daha düşük nem oranında etki azalır.

^b Fırının sıcaklığı, numunenin değil

^c Basınçlı pişirme, Brazilyadaki yerel üretimler gibi

^d Yağ alüminyum kap içerisinde 1.4 – 1.8 mm derinlikteki katmanlarda

1. Mann (1967)
2. Stoloff ve Trucksess (1981)
3. Waltking (1971)
4. Farah (1983)
5. Luter (1982)Samarajeewa (1988)

Çizelge 2.4 Su aktivitesi ve *A.flavus*'un büyümesi^a

Substrat	Kardinal değerler		a _w						Sıcaklık (°C)	pH	Ref.
	Min.	Opt.	0.85	0.87	0.90	0.95	0.98	0.99			
Malt agar	0.80	-	-	-	-	-	-	-	25	NS	1 ^b
Tuz malat	0.90	-	-	-	-	-	-	-	-	3.8	2 ^b
Malt jelatin	0.80	-	40	-	80	170	-	210	30	NS	3 ^b
Malt gliserol	0.81	0.99	40	110	-	290	400	250	31	NS	4 ^b
YNB glu/fruk	0.86	0.98	-	50	65	115	130	120	25	6.5	5
YNB gliserol	0.84	0.98	20	-	65	115	130	120	25	6.5	5
YNB NaCl	0.87	0.98	-	5	20	135	160	150	25	6.5	5
MY glu/fruk	0.87	0.98	-	-	220	430	500	-	37	6.5	6
M NaCl	0.86	0.98	-	-	60	280	430	-	37	6.5	6
MY glu/fruk	0.92	0.98	-	-	-	336	270	-	25	6.5	6
M NaCl	0.91	0.98	-	-	-	180	220	-	25	6.5	6
MY glu/fruk	0.82	0.98	65	-	145	330	485	260	30	6.5	7

Ref 1 (2 izolat), 6 (3 izolat), 7 (3 izolat) için izolatların ortlaması alınmıştır. Diğerleri 1 izolatlıdır.

^a Radyal büyüme (µm/sa)

^b İzolatın *A.flavus* tanımlaması yapılmamıştır

MY, malt mayası

Tuz malat, Malik asit ve Sodyum malat ile tamponlanmış mineral tuzları

1. Armolik ve Dickson (1964)
2. Pitt ve Christian (1968)
3. Ayerts (1969)
4. Northolt tarafından tekrar hesaplanmıştır (1977)
5. Pitt ve Hocking (1977)
6. Wheeler (1988)
7. Pitt ve Miscamble (1995)

Çizelge 2.5 pH ve A.flavus büyümesi^a (Czapek maya ekstrakt agar üzerinde)

PH	2.1	2.3	3.0	3.4	4.0	6.1	8.1	9.0	10.2	11.2	1
25 °C	42	86	168	177	220	227	211	207	158	138	1
30 °C	57	161	258	294	331	357	349	325	284	242	1
37 °C	70	118	202	234	279	296	291	282	215	160	1

Büyüme oranları yedi izolatın ortalamasıdır. Ortam otoklav işleminden sonra fosforik asit ve sodyum hidroksit ile ayarlanmıştır; pH değerleri çalışmanın başında ölçülmüştür.

^a Radyal büyü (µm/sa)

1. Wheeler (1991)

Çizelge 2.6 Koruyucu (sorbik asit) ve A.flavus^a büyümesi

	Sıcaklık (°C)		Ref.
	4	25	
Test edilen izolat sayısı	10	10	1
500 mg/kg ile inhibe edilmiş izolat sayısı	7	0	1
1000 mg/kg ile inhibe edilmiş izolat sayısı	10	9	1
2000 mg/kg ile inhibe edilmiş izolat sayısı	-	10	1

Test koşulları: %10'luk tartarik asit ile pH değeri 5.5'e ayarlanmış YM agar (Difco). İnokulum (ekim) plaka başına 10^7 . 30 güne kadar inkübasyon zamanı.

^a İzolatın A.flavus tanımlaması yapılmamıştır

1. Leiwen ve Marth (1984)

Çizelge 2.7 pH ve koruyucunun 52°C'de ısıtılmış A.flavus konidyumlarının ölüm oranları (D-değerleri) üzerine etkisi

Isıtılan ortam	Koruyucu Kons. (mg/l)	PH					Ref.
		2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	
Fosfat Tween Tamponu	0	40.8	41.7	43.2	44.4	44.7	1
Tampon + Potasyum sorbat	50	20.8	27.5	36.6	40.8	43.2	1
Tampon + Potasyum sorbat	100	18.9	25.9	30.9	39.9	42.6	1
Tampon + sodyum benzoat	50	15.2	24.1	33.2	34.2	34.9	1
Tampon + sodyum benzoat	100	8.1	9.5	14.4	17.6	20.9	1

Konidyumların ilk sayısı 10^5 . İzolatın A.flavus tanımlaması yapılmamıştır.

1. Beuchat (1981)

Çizelge 2.8 Su aktivitesi, çözelti tipi ve koruyucunun 52°C'de ısıtılmış pH 4.5'e ayarlanmış *A.flavus*^a konidyumlarının ölüm oranları üzerine etkisi

Isıtılan ortam	Kons. (%)	Hesaplanan a _w (min)	D-değeri	Ref.
Basal ortam ^b + sukroz	0	>0.998	44.0	1
	10	0.99	50.2	1
	30	0.975	52.6	1
	45	0.95	55.2	1
	60	0.90	58.0	1
Basal + sukroz + 500mg/l sorbat ^c	0	>0.998	38.8	1
	10	0.99	40.8	1
	30	0.975	48.6	1
	45	0.95	52.5	1
	60	0.90	56.0	1
Basal + NaCl	0	>0.998	42.7	1
	3	0.985	46.7	1
	6	0.965	50.0	1
	9	0.945	42.2	1
	12	0.925	40.6	1
Basal + 500mg/kg sorbat + NaCl + 500mg/kg sorbat ^d	0	>0.998	38.7	1
	3	0.985	41.7	1
	6	0.965	45.6	1
	9	0.945	37.8	1
	12	0.925	37.8	1
Basal + 1000mg/kg benzoat + NaCl + 1000mg/kg benzoat ^e	0	0.998	31.1	1
	3	0.985	28.9	1
	6	0.965	27.8	1
	9	0.945	26.1	1
	12	0.925	20.0	1

^a İzolatın *A.flavus* tanımlaması yapılmamıştır.

^b Fosfat Tween Tamponu

^c Sukroz + 500 mg/l sorbat için olan değerler birbirine çok yakındır, sukroz + 500 veya 1000 mg/kg sorbat için olan değerler %30'da 10dakikadan azdır, fakat %60'da sade 2-3 dakika daha azdır.

^d 1000mg/kg sorbat D-değerini 2-5 dakika düşürür.

^e 500mg/kg benzoat ile d-değeri 3-7 dakika uzar.

1. Beuchat (1981)

Çizelge 2.9 A.parasiticus konidyumlarının ölüm ve yaşamı, aflatoksinlerin yıkımı

Konidyumların direnci	
Radyasyon	27-35 krad (gamma ışınları)
Sıcaklık.	51°C'de 120 dak.
Koruyucular	MIC sorbik asit, 1500mg/kg
	MIC benzoik asit, bilinmiyor
	MIC asetik asit, 1%
	MIC propionik asit, pH 4.5, 0.2%
Aflatoksin B1 Direnci	
Sıcaklık	A.flavus için olan çizelgeye bakınız
Radyasyon	A.flavus için olan çizelgeye bakınız
Koruyucular	MIC propionik asit, pH 4.5, 0.2%

Çizelge 2.10 A.parasiticus tarafından aflatoksin üretim ve büyüme limitleri

	Minimum	Optimum	Maksimum
Büyüme			
Sıcaklık (°C)	12	32	42
Su aktivitesi	0.80-0.83	0.99	>0.99
PH	2	5-8	>11
Aflatoksin üretimi			
Sıcaklık (°C)	12	25	40
Su aktivitesi	0.86-0.87	0.95	>0.99
PH	2	6	>8

Çizelge 2.11 Sıcaklık ve A.parasiticus NRRL 2999 tarafından pirinç üzerinde aflatoksin üretimi

Sıcaklık (°C)	İnkübasyon zamanı (gün)	Aflatoksin (µg/kg)					Oran (B1=1,0)			Ref.
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Top.	B ₂	G ₁	G ₂	
8	21	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	1
11	21	0.1	ND	0.09	ND	0.2	0	0.90	0	1
15	21	2	0.2	3	0.3	5.5	0.10	1.50	0.15	1
18	9	125	19	160	12	316	0.15	1.29	0.10	1
25	7	450	85	235	32	802	0.19	0.52	0.07	1
28	7	760	110	180	25	1075	0.15	0.24	0.03	1
32	7	760	125	46	5	936	0.16	0.06	0.01	1
34	7	18	2	<0.2	ND	20	0.11	0	0	1
37	7	0.3	ND	ND	ND	0.3	-	-	-	1

Daha kısa inkübasyon zamanları için de her bir sıcaklıkta veri.
ND, tespit edilmedi

1. Sorenson (1966)

Çizelge 2.12 Sıcaklık ve *A.parasiticus* tarafından yer fıstığı^a üzerinde aflatoksin üretimi

Sıcaklık (°C)	Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					Oran (B1=1,0)			Ref.
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Top.	B ₂	G ₁	G ₂	
12	0	0	0	0	0	0	-	-	1
14	1700	1300	1400	670	5070	0.77	0.82	0.39	1
15	6900	1800	17600	3500	29800	0.26	2.55	0.51	1
20	84200	19900	213300	46600	364000	0.24	2.53	0.55	1
25	83300	13300	159900	55000	311500	0.16	1.92	0.66	1
30	94900	33300	106600	20800	255600	0.35	1.12	0.22	1
35	126600	33300	53300	16600	229800	0.26	0.42	0.13	1
40	2500	1000	1000	170	4670	0.40	0.40	0.07	1
43	0	0	0	0	0	-	-	-	1

^a 21 gün a_w 0.97-0.99 arasında inkübe edilmiş yer fıstığı.

1. Diener ve Davis (1967)



Çizelge 2.13 Su aktivitesi ve aflatoksin üretimi (ürün üzerinde *A.parasiticus* tarafından)

Substrat	a_w	Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					Oran ($B_1=1,0$)			Ref.
		B_1	B_2	G_1	G_2	Toplam	B_2	G_1	G_2	
Yer fıstığı ^a	0.99	10500	12000	8800	6700	38000	1.14	0.84	0.64	1
Yer fıstığı ^a	0.95	15200	18000	32000	10000	75200	1.18	2.11	0.66	1
Yer fıstığı ^a	0.90	3800	4000	4800	6000	18600	1.05	1.26	1.58	1
Yer fıstığı ^a	0.89	12200	1900	39700	8000	61800	0.16	3.25	0.66	1
Yer fıstığı ^a	0.88	1500	400	1700	500	4100	0.27	1.13	0.33	1
Yer fıstığı ^a	0.87	4300	1100	7600	1400	14400	0.25	1.76	0.33	1
Yer fıstığı ^a	0.86	3800	1000	3200	500	8500	0.26	0.84	0.13	1
Yer fıstığı ^a	0.85	0	0	0	0	0	-	-	-	1
Yer fıstığı ^b	0.99	64000	8950	104550	26950	201450	0.15	1.71	0.44	2
Yer fıstığı ^b	0.92	30450	4250	58350	18300	111350	0.14	1.92	0.60	2
Yer fıstığı ^b	0.86	9900	1750	23500	6800	41950	0.18	2.37	0.69	2
Mısır ^c	0.97	30000	2800	47000	3300	84100	0.13	1.57	0.11	3
Mısır ^c	0.90	62500	2660	144000	10000	219160	0.04	2.30	0.16	3
Mısır ^c	0.87	3760	890	18080	1170	23900	0.24	4.81	0.31	3

^a Sterilize, 900g'lık lotlar halinde 21 gün 30°C'de kontrollü ortamda inkübe edilmiş nemli yer fıstıkları.

^b 14 gün 25°C'de devamlı nemlendirilen havada 200g lotlar halinde inkübe edilmiş yüzeyi dezenfekte edilmiş yer fıstıkları

^c 16 gün 25°C'de petri'lerde inkübe edilmiş steril olmayan eşit miktardaki mısır

1. Diener ve Davis (1967)
2. Sanders (1968)
3. Montani (1988)

Çizelge 2.14 pH ve *A.parasiticus* büyümesi^a (Czapek maya ekstrakt agar üzerinde)

PH	2.2	2.4	3.4	4.2	5.3	6.3	7.3	8.5	9.5	10.5	Ref.
25 °C	0	23	208	216	213	210	205	192	187	158	1
30 °C	33	84	333	344	341	342	344	311	263	221	1
37 °C	83	108	191	222	246	283	280	270	227	192	1

^a Radyal büyüme ($\mu\text{m}/\text{sa}$). Büyüme oranları altı izolatin ortalamasıdır. Ortam otoklav işleminden sonra fosforik asit veya sodyum hidroksit ile ayarlanmıştır; pH değerleri çalışmanın başında ölçülmüştür.

1. Wheeler (1991)

Çizelge 2.15 Başlangıçtaki ortamın pH'ı ve *A.parasiticus* tarafından aflatoksin üretimi (μg)

PH	3.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0	8.0	Ref.
Aflatoksin	765	6065	6960	4590	5560	5870	5155	4285	1

Kültürler 7 gün 28°C'de çalkalama yapılmadan yarısentetik ortamda inkübe edilmiştir. Verilen değerler başlangıç pH'larıdır, çalışma sonunda pH'lar ölçülmemiştir. Aflatoksin değerleri her bir kültür kabı (25 ml) için olan değerlerdir.

1. Buchanan ve Ayres (1976)

Çizelge 2.16 Koruyucu (sorbik asit) ve *A.parasiticus* büyümesi

	Sıcaklık (°C)		
	4 ^a	12 ^b	25 ^c
Test edilen izolat sayısı	10	2	10
500 mg/kg ile inhibe edilmiş izolat sayısı	7	0	0
1000 mg/kg ile inhibe edilmiş izolat sayısı	10	0	9
1500 mg/kg ile inhibe edilmiş izolat sayısı	-	2	-
2000 mg/kg ile inhibe edilmiş izolat sayısı	-	-	10

^a 4 ve 25°C: Liewen ve Marth (1984). YM agar (Difco). %10'lük tartarik asit ile pH 5.5'e ayarlanmış. Her plakaya 10^7 spor inokulumu. İnkübasyon zamanı, 30 gün

^b 12°C: Bullerman (1983). Yeast ekstrakt (2%), sukroz (15%), sıvı ortam, HCl ile pH 5.0'a ayarlanmış. İnkübasyon 70 gün. Koruyucu olmadığında 1000 mg/kg'daki büyüme zamanı 3-5 kat daha fazladır.

2.2 MİKOTOKSİN ANALİZLERİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

2.2.1 Örnek Alınması

Günümüzde mikotoksinlerin insan gıdaları, hayvan yemleri, çeşitli doku ve organlardan analizleri için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu analiz yöntemleri sonucunda elde edilen veriler bazı faktörlere bağlı olarak değişmekte ve verilerin güvenilirliği etkilenmektedir. Bu faktörlerin başında örnekleme uygun şekilde yapılması yer almaktadır. Analiz yönteminde kullanılacak örneğin, ürünün toplamını ne kadar temsil ettiği çok önemli bir noktadır. Örneklemede ilk dikkat edilecek, örnek miktarı ve sayısıdır. Alınacak örnek toplam örneğin miktarına ve türüne göre değişmektedir. Yerfıstığı gibi büyük taneli olan ürünlerden alınacak temsili örnek miktarı küçük tanelilere oranla daha fazla olmalıdır. Sıvılarda ise mikotoksin analizleri için gerekli olan temsili örnek miktarı taneli olanlara göre daha azdır. Örneklemede ikinci önemli faktör, örnekleme yöntemidir. Mikotoksin analizlerinde temsili örneğin uygun şekilde alınabilmesi için tesadüfi örnek alınması önerilmektedir. Bunun için geliştirilmiş mekanik örnekleme cihazları mevcuttur. Örnek alınmadan önce orjinal örneğin harmanlanması gerekmektedir. Örneklemede üçüncü adım analizde kullanılacak örneğin alınmasıdır. Burada alınacak örneğinde orjinal örneği temsil etmesi gerektiğinden örnek miktarının azaltılmasında oldukça dikkat edilmesi gerekmektedir. Bazen orjinal örneğin çok fazla olduğu durumlarda iki safha halinde de uygulanabilmektedir. Bu ikinci örnekleme yapılmadan önce örnekler ekstraksiyon aşamasında kullanılacak şekilde öğütülerek partikül büyüklüğü azaltılmalıdır.

2.2.2 Örneklerin İşlenmesi

Mikotoksin analizleri başlamadan önce alınan örneklerin bazı işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir.

Ekstraksiyon: Ekstraksiyon aşamasında amaç toksinin örnekten çeşitli solventlerle ayrıştırılmasıdır. Kullanılacak solvent uygulanacak analiz yöntemine, toksine ve ürünün türüne göre değişmektedir.

Saflaştırma: Saf bir ekstrat elde edilebilmesi için yağların uzaklaştırılması gerekmektedir. Analizi yapılacak toksine ve analiz metoduna göre değişik solventler kullanılarak yağlardan arındırma işlemi yapılır.

Analiz: İstenilen amaca yönelik olarak kalitatif ve/ve ya kantitatif analizler yapılarak mikotoksinlerin varlığı tesbit edilir.

2.2.3 Mikotoksin Analiz Yöntemleri

Kromotografik Yöntemler

- İnce Tabaka Kromotografisi
- Kolon Kromotografisi
- Yüksek Basıncılı Sıvı Kromotografisi
- Gaz Kromotografisi
-

İmmunolojik Yöntemler

- Enzim Bağlı İmunosorbant Testi (ELISA)
- İmmunoaffinite Kromotografisi
- Radyoimmun Test (RIA)

2.2.3.1 Kromotografik Yöntemler

Maddeler karışımını bir hareketli faz yardımıyla bir sabit faz üzerinden geçirilerek bileşenlerine ayrılması işlemine kromatografi denir.

2.2.3.1.1 İnce Tabaka Kromotografisi

İnce tabaka kromatografisi uzun yıllardan beri mikotoksin analizlerinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde sabit faz bir cam, alüminyum veya plastik levha üzerine sabit kalınlıkta yayılır. Kullanılan sabit faz silikajeldir ve yöntemde adsorbsiyon ilkesi uygulanır. Mikotoksinler ultraviyole ışığı altında çeşitli renklerde floresan verirler ve ince tabaka kromatografisinde mikotoksinlerin floresan verme özelliklerinden faydalanılır. Diğer mikotoksin analizlerinde olduğu gibi ekstraksiyon ve temizleme aşamalarından sonra silikajel kaplı plakalara, elde edilen ekstrat ile standartlar damlatılarak uygun solventle yürütme işlemi yapılır. Yürütülen plaka ultraviyole ışığın altında incelenerek değerlendirilir. Bu yöntem hem kalitatif hem de kantitatif olarak kullanılabilir. Çeşitli doğrulama testleri uygulanabilir.

2.2.3.1.2 Kolon Kromotografisi

Bu yöntem özellikle preparatif amaçla kullanılır ve çoğunlukla adsorbsiyon ilkesi uygulanılır. Yöntemde sabir faz, bir cam kolon içine silikajel, alümina, florisil, kiselgur gibi çeşitli adsorbanlar doldurularak hazırlanır. Mikotoksin analizlerinde kolon kromotografisi çoğunlukla ekstraktın saflaşması yani yağların uzaklaştırılması safhasında kullanılmaktadır. Ekstrat kolona verilir ve toksine uygun solventlerle yapılan temizlik aşamasından sonra toplanan örnek (eluat) TLC,HPLC veya GC ye verilerek miktar tayini yapılır.

2.2.3.1.3 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromotografisi

İnce tabaka kromotografisine göre daha hassas ve güvenilir olduğundan günümüzde mikotoksin analizlerinde en çok kullanılan yöntemdir. Diğer kromotografi yöntemlerinde olduğu gibi bir sabit ve hareketli fazı vardır.Sabit faz bir kapiler kolon içine doldurulmuş adsorban bir maddedir. Kullanılacak kolon, analizi yapılacak toksine göre değişir. Analizi yapılacak olan toksin sabit faz içeren bir kolon boyunca hareketli faz yardımıyla taşınır.Kolon içinde değişik hızlarla yol alan bileşenler molekül boyutlarına göre ayrılarak kolondan çıkarlar. Maddelerin kolonun içinde kaldıkları bu süreye alıkonma süresi denir.Kolonun çıkış kısmı bir dedektöre bağlıdır ve dedektörce algılanan sinyal elektrik sinyaline dönüştürülerek yazıcıya gönderilir. Yazıcıda, sonuçlar çeşitli pikler oluşturur ve bu piklerin çıkış zamanına göre maddenin ne olduğu, pikin altında kalan alana göre de maddenin miktarı hesaplanır. Son yıllarda mikotoksin analizlerinde yüksek basınçlı sıvı kromotografisi, afinite kromotografisi ile beraber kullanılmaktadır. Bu sayede elde edilen verilerin güvenilirliği artmaktadır.

2.2.3.1.4 Gaz Kromotografisi

Gaz kromotografisi, buhar fazda geçen bir kromotografidir.Bileşikler karışımının birbirinden ayrılma ilkesi, bileşenlerin buhar olup hareketli faz ile sürüklenme ve sabit fazla tutunma eğilimlerinin farklı oluşudur. Bu eğilimlerin en önemlisi diğer kromotografi yöntemlerinde de olduğu gibi örnek madde sabit faz ilişkisidir. Daha az önemli olmakla beraber uçuculuk farkı, GC'de ikinci bir faktör olarak karşımıza çıkar. Hareketli faz bir inert gazdır ve taşıyıcı gaz olarak adlandırılır. En çok hidrojen ,helyum ve azot kullanılmaktadır. Örnek,cihaın enjeksiyon kısmından injekte edilir. İnjeksiyon işlemi için numune miktarı ve formuna göre özel olarak üretilmiş injektörler kullanılır. İnjektör septuma batırılır ve örnek madde kesit hızla bir şekilde hızla verilir. Örnek maddenin yavaş injekte edilmesi yani uzun bir zaman

2023 YILI EKİM AYI
BÜYÜK ÇİFTLİK MERKEZİ

aralığında verilmesi, birbiri içine girmiş piklere neden olur. İnjektion kısmında buharlaşan numune, taşıyıcı gazla spiral halinde sarılmış bir muhafaza içinden kolon dolgusu üzerine sürüklenir. Karışımı oluşturan bileşikler birbirinden ayrılarak ilerler ve farklı zamanlarda buhar halinde kolonu terk edip dedektör tarafından saptanarak yazıcıda kaydedilir. Böylece yazıcıda zamana karşı çizilmiş bir kromotogram elde edilir. GC tekniği ile incelenecek olan birleşiklerin belirli özelliklere sahip olması gerekir. Karışımı oluşturan birleşikler katı, sıvı veya gaz olabilir. Ancak her birinin çalışılan sıcaklık koşullarında uçucu olmaları gerekir. Sıvı ve gaz maddeler direkt injekte edilebilirken katı maddeler çözeltileri halinde verilirler. GC de önemli koşullardan biriside incelenecek bileşiklerin çalışılan sıcaklık koşullarında dayanıklı olmaları ve bozulmamalarıdır. GC'nin TLC'ye karşı çok önemli bir üstünlüğü, gaz veya oldukça uçucu bileşiklerin kolayca incelenebilmesidir.

2.2.3.2 İmmunolojik Yöntemler:

İmmunolojik yöntemlerin mekanizması mikotoksinlerle onlara karşı elde edilmiş antikorların bağlanmasına dayalıdır.

2.2.3.2.1 Enzim Bağlı İmmunosorbant Testi (ELISA)

ELISA (Enzyme Linked Immuno System Assay) bir antijen antikor reaksiyonudur. Oldukça spesifik ve sensitiv bir yöntemdir. Mikotoksin analizlerinde yarışmalı ELISA prensibine dayalı kit sistemleri kullanılır. Toksine karşı elde edilmiş, spesifik determinantlara sahip antikorlar plakaya yapıştırılır. İçinde toksin olduğu şüpheli örnek ve enzimle işaretli toksin yani konjugat beraberce plakaya eklenir. Bunun yanında bir kuyuya sadece enzimle işaretli toksinleri içeren negatif kontrol konulur. Antijen ve antikorların bağlanması için bir süre beklendikten sonra yıkama işlemi yapılarak yabancı maddeler uzaklaştırılır. Eğer örnekte toksin varsa antikorlarla bağlanacağından enzimle işaretli toksinlerin bağlanması için yeterli antikor kalmayacak ve substrat ilavesi sonucu açık bir renk şekillenecektir. Örnekte toksin yoksa, negatif kontrolde olduğu gibi, sadece enzimle işaretli enzimler antikora bağlanacak ve substrat ilavesi ile koyu bir renk değişimi görülecektir. Değerlendirmede görsel bulgular bir fikir versede esas olarak ELISA okuyucusundan alınan veriler önemlidir.

2.2.3.2.2 İmmunoafinite Kromotografisi

Bu yöntemde bir kolon içersinde mikotoksine karşı elde edilmiş monoklonal antikorların fonksiyonel kısımları Sepharose 4B'ye immunokimyasal yöntemlerle bağlanırlar. Örneklerden elde edilen ekstrakt bu kolona verilerek toksinlerin antikora bağlanması sağlanır. Çoğulukla metanol/su'yun değişik oranlarda karıştırılması ile önce yabancı maddeler kolondan atılır sonra antikorlara bağlanmış toksinler koparılarak toplanır. Bu yöntemde miktar tayini ya florometre ile ya da HPLC ile yapılmaktadır.

2.2.3.2.3 Radyoimmun Testi

Mikotoksinlerin analizinde kullanılan radyoimmun testi yöntemi, yarışmalı mekanizmaya bağlı bir antijen antikor reaksiyonudur. Bu test, bilinen konsantrasyonda radyoaktif madde (iyot 125) ile işaretlenmiş mikotoksin, bilinen konsantrasyonda antikor ve konsantrasyonu bilinmeyen mikotoksin içeren test örneği kullanılarak yapılır. Testin mekanizması yarışmalı ELISA testine benzer ancak oluşan reaksiyonun okunmasında ve buna bağlı olarak toksin miktarının belirlenmesinde özel radioaktif sayıcılara (Scintillation counter) gerek vardır. Bu alet sayesinde mikotoksin ve antikorun bağlanması radioaktif sayım sonucunda ortaya konulmaktadır. Test için radioaktif madde kullanılması dezavataj teşkil eder ve bu yüzden özel laboratuvarlar gereklidir.

2.3 HPLC SİSTEMİ

HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) analitik kimya alanında en hızlı gelişen tekniklerden birisidir. Yüksek basınç nedeniyle analiz süresinin azalması, kesin sonuca ulaşma, düşük oranlarda miktar saptama, analizlerin oda ısısında olması sistemin avantajlarıdır ve geniş kullanım alanı kazandırır. En çok kullanıldığı yerlerden biri olan gıda biliminde, katkı maddeleri, bulaşma, bozulma, karbohidratlar, reklendiriciler, yağ ve yağ asitleri, tatlandırıcı ve uçucu bileşikler, inorganikler, organik asitler, azotlu bileşikler, vitaminlerin analizlerinde uygun kolon ve dedektör seçilerek kullanılabilir.

Kromatografi, çağdaş analitik kimya laboratuvarlarının en çok benimsenmiş olan bir "ayırma" tekniğidir. Karışımların ayrımı, bileşenlerin tanısı ve miktarları, hassas bir şekilde, kısa zamanda yapılabilmektedir.

2.3.1 Prensip

Analizlenecek örneğin, kullanılan biri sabit, diğeri hareketli olmak üzere iki faz arasında "Paylaşım Katsayı" larının (partition coefficient) farklılığına göre bileşenlerine ayrılmalıdır. Sabit faz içeren bir kolon boyunca hareketli faz ile taşınan örnek, kolon içinde borular halinde değişik hızlarda yol alan bileşenlerine ayrılarak kolonu terketmektedir. "Alıkonma Süresi" (retention time) olarak tanımlanan bu kavram bileşenlerin ayrımında etkin bir faktördür. Kolon çıkışında dedektörce algılanan sinyal, elektrik sinyaline dönüştürülerek yazıcı veya entegratörde sonuçlar "peak" olarak alınarak, değerlendirilir. Bu prensip hem GC (Gaz kromatografisi) hem LC (Sıvı Kromatografisi) için aynıdır, ancak GC'de taşıyıcı faz gaz, LC de ise sıvıdır.

2.3.2 HPLC Sisteminin Teknik Özellikleri

Dizayn açısından sistem

- modüler
- entegre olmak üzere iki türlü olabilir.

2.3.2.1.1 Modüler Sistem

Birbirinden ayrılabilen çok parçalı sistemdir ve daha avantajlıdır. Taşıma, yerleştirme, cihazı tanıma kolaylığı vardır. Laboratuvar bütçesine göre zamanla yeni parçalar ilave edilerek sistem geliştirilebilir.

2.3.2.1.2 Entegre Sistem

Bir veya iki parçadan ibarettir ve zamanla sistem geliştirme şansı azdır, cihazı tanıma açısından ise “kapalı bir kutu” niteliğindedir.

Sistem operasyon şekline göre iki türlü olabilir;

1. İsookratik sistem
2. Gradient sistem

İsookratik Sistem: En basit ve ucuz olanıdır. Tek pompalıdır ve kullanılan sıvı (taşıyıcı faz) analiz boyunca aynı derişimde tutulur. Cihazın dengeye gelme süresi kısa, kullanılan kolon ömrü uzundur. Rutin analiz yapan laboratuvarlara önerilebilir. (Şekil 1-a)

Gradient Sistem : Birden fazla solvent karışımı kullanılır ve zamanla solvent oranlarının değiştirilebilme olanağı vardır. Bileşenlerine zor ayrılan örnekler için idealdir. İkinci bir pompa (hatta üçüncü), solventleri karıştırıcı ünite, karışım oranlarını kontrol eden bir programlayıcı ünite vardır. Ayrıca isokratik olarak da çalışabilir. (Şekil 1-b).

Bunların dışında bir de otomatik sistem vardır ki gradient sistem ünitelerine ilaveten Otomatik Enjeksiyon Mekanizması bulunur (Şekil 1-c)

2.3.3 HPLC Sistemi Üniteleri

HPLC sistemi üniteleri incelenecek olursa sırasıyla:

- solvent besleme ünitesi,
- pompa(lar),
- enjeksiyon bloku,
- kolon,
- dedektör,
- yazıcı.

2.3.3.1 Solvent Besleme Ünitesi

Sistemde taşıyıcı faz olarak kullanılan

- solventleri içeren şişe(ler)
- pompa(lar)
- Degasser : yeni sistemlerde solvent içerisinde kalabilecek hava kabarcıklarının akış yoluna gitmesini önlemek için degasser denilen sistemler bulunmaktadır.

Solvent cihaza pompa yardımıyla verilir, belirli zamanda belirli hacimde solvent geçecek şekilde (ml/dak.) akış hızı ayarlanabilir. Birbirinden bağımsız olarak çalışan 1, 2 veya 3 pompa olabilir.

2.3.3.2 Enjeksiyon Bloku

Analizlenen örneğin sisteme verildiği yerdir. Değişik firma ürünlerinde

- septumlu (manual),
- septumsuz otomatik enjeksiyon donanımlı olanları vardır.

RC FÖNEMİKÖRETİM KÜLTÜR
YATIRIM MENKUL DEĞERLER A.Ş.

2.3.3.3 Kolon

- Cihazın “kalbi” sayılır.
- Genellikle paslanmaz çelikten yapılır.
- Değişik boy ve çapta olabilir.
- 10-30cm boy
- 4.6-5mm iç çap
- 5 veya 10 μ m dolgu maddesi partikül büyüklüğü

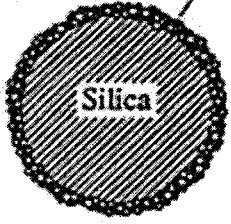
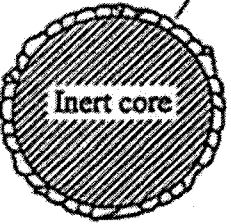
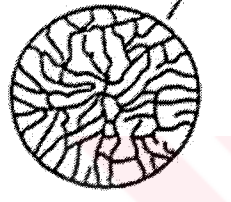
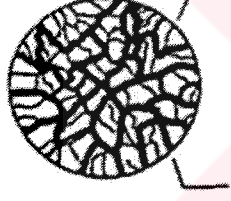
Son zamanlarda iç çapı 1-4,6mm arasında değişen, yüksek çözünürlükde ve daha kısa zamanda, daha az solvent harcayarak sonuç verebilme özelliği olan kolonlar geliştirilmiştir.

Kolon Dolgu Maddesi

Tipik bir dolgu maddesi

- iyi belirlenmiş partikül büyüklüğüne
- basınca karşı uygun mekanik kuvvete
- yüksek kimyasal stabiliteye sahip olmalıdır.

Şekil 2.5’de dolgu maddelerinin çeşitleri gösterilmiştir.

	<p>Bağlı Silika Faz</p> <ul style="list-style-type: none"> - hidrokarbon grupları ile bağlı silanol (Si-OH) içeren silica - the bonded phase'ın doğası kromatografik davranışı belirler
	<p>Peliküler Dolgu</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inert bir tabaka fiziksel desteği sağlar - Inert tabaka üzerindeki ince tabaka ayrılmayı sağlayan fonksiyonel grupları sağlar.
	<p>Mikro gözenekli</p> <ul style="list-style-type: none"> - Çapraz bağlı polimerler içeren jel-tipinde reçine
	<p>Makro gözenekli</p> <ul style="list-style-type: none"> - Yüksek derecede çapraz bağlı (>50%) reçine - pH 1 – 14 arasında stabil - Çeşitli partiküller ve gözenekler içerebilir

Şekil 2.5 Kolon dolgu maddeleri

2.3.3.4 Dedektör

HLC dedektörleri 2 ana başlık altında toplanabilir;

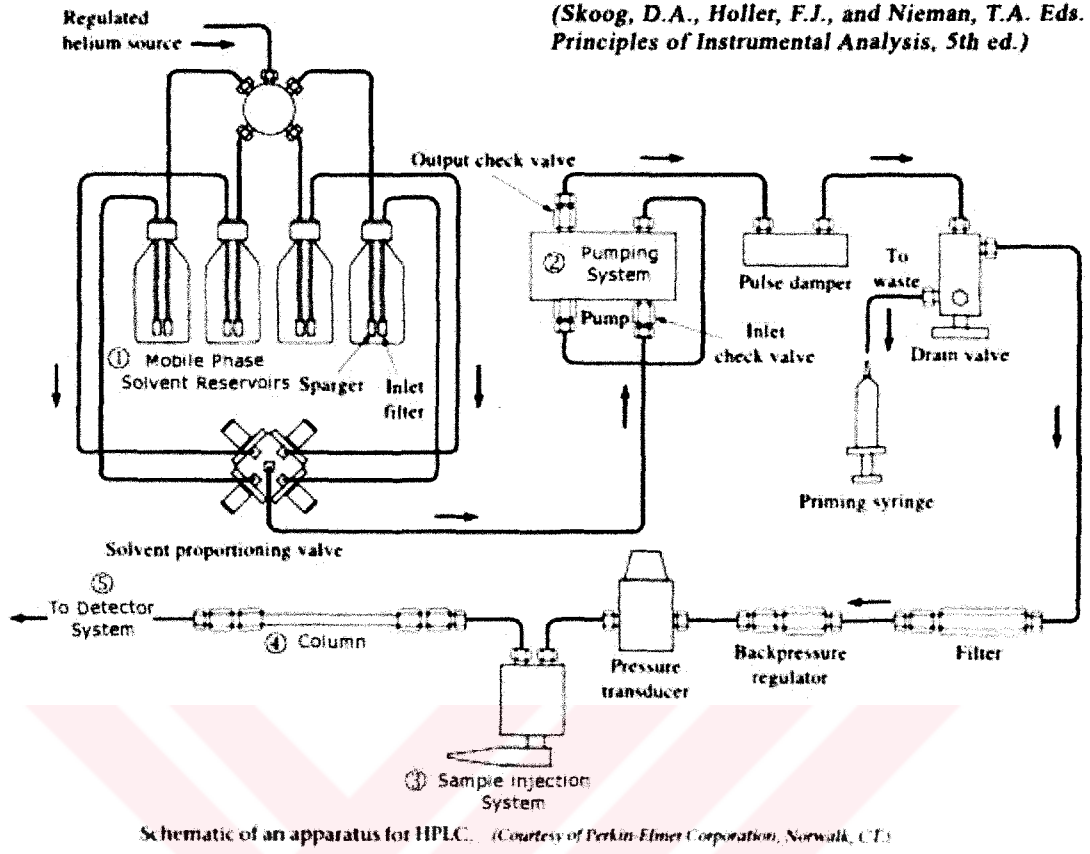
- *Mobil faz dedektörleri:* Analiz edilmek istenen maddenin varlığı nedeniyle mobil fazda meydana gelen değişikliklere cevap veren dedektörler
 - Refraktif İndeks
 - Dielektrik Sabiti
 - yoğunluk dedektörleri
- *Analiz edilmek istenen madde dedektörleri:* Analiz edilmek istenen maddenin varlığına cevap veren dedektörler
 - UV absorbans
 - Floresans dedektörler

Dedektörlerin seçimi

- Analiz edilecek maddeye
- Maddenin Konsantrasyonuna bağlıdır.

Hassasiyeti arttırmak için light scattering dedektör, radyoaktif dedektör, vizkozite dedektörleri gibi dedektörler geliştirilmiştir.

Ayrıca spesifikliğı ve hassasiyeti arttırmak için birden fazla çeşit dedektör kullanılabilir.



Şekil 2.6 Genel HPLC görünümü

1. Mobil-Faz / Solvent Şişeleri
2. Pompa Sistemi
3. Örnek Enjeksiyon Sistemi
4. Kolon
5. Dedektör Sistemi

3. FINDIK VE İNCİRLERDE AFLATOKSİN TAYİNİ YÖNTEMİ

3.1 Amaç ve Kapsam

Fındık ve incir numunelerinde aflatoksin B1 ve toplam aflatoksin tayini ve metod doğrulamasını amaçlamaktadır. Metodun saptama sınırı aflatoksin B1 için 0.2 ng/g toplam aflatoksin için 0.5 ng/g'dır. Çeşitli ülkelerde kolaboratif çalışmalar düzenleyen FAPAS'dan (Food Analysis Performance Assesment Scheme) Fıstık ve İncir numuneleri temin edilerek bu metodun koloboratif çalışmalarda ki performansını inceledik.

3.2 Uygulama Yöntemleri

3.2.1 Uyarılar

- Aflatoksinin toksik etkisi olduğundan, analize başlarken koruyucu önlemler alınmalı, uygun laboratuvar önlüğü ve plastik eldivenler kullanılmalıdır.
- Aflatoksinler ışıktan etkilendiği için analizler mümkün olduğunca gün ışığından uzakta yapılmalıdır. Standart çözeltiler koyu renkli şişelerde saklanmalıdır.
- Analiz bittikten sonra kullanılan tüm cam malzemeler bir gece sodyum hipoklorit çözeltisi (%1 w;w) içinde bekletilir. Daha sonra distile su ile iyice durulanır.
- Ucuçu kimyasalların hazırlanması sırasında çalışma çeker ocakta yapılmalıdır.

3.2.2 Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

Fosfat tamponlu tuz (PBS) : 0.2 g potasyum klörür, 0.2 g potasyum dihidrojen fosfat, 1.16 g disodyum hidrojen ortofosfat (veya 2.92 g hidrojen fosfat.12H₂O) ve 8 g sodyum klörür 0.9 L distile suda çözüldü. Tamamen çözüldükten sonra 0.1mol/L HCl veya 0.1 mol/L NaOH kullanarak pH 7.4'e ayarlandı. Distile su ile litreye tamamlandı.

Hazır olarak temin edilebilen PBS tabletleri de kullanılabilir. (1 tablet 100 ml su (2.2.7) içerisinde çözüldürülür. 25°C'nin altında saklanır)

Sodyum klörür

Asetonitril, HPLC için uygun kalitede

Metanol, teknik kalite

Metanol, HPLC için uygun kalitede

Benzen

Saf su, HPLC için uygun kalitede

Ekstraksiyon çözeltisi: Metanol / Su [8+2 (v+v)]

HPLC mobil fazı: Su / Asetonitril / Metanol [6+2+3 (v+v+v)] karışımı hazırlandı.

Çözeltinin 1 litresine 120 mg potasyum bromür ve 350 µl nitrik asit ilave edildi. Kullanmadan önce süzüldü.

Benzen/Asetonitril çözeltisi: Benzen / Asetonitril [98+2 (v+v)]

Potasyum bromür

Nitrik asit, 4 mol/L

Aflatoksin B1, B2, G1, G2 standartları, Kristal halde

İmmunoafinite kolon, 4-8°C'de muhafaza edildi. Kullanmadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

3.2.3 Alet Ekipman Tanımları

Sıvı Kromatografi Cihazı : SHIMADZU - HPLC 10Avp

Dedektör: RF-10AXL Floresans dedektör

HPLC kolonu: Macharey Nagel CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18 HD

Kobra cell türevlendirme cihazı: Rhone Diagnostis Technologies

Analitik terazi: 0.1 mg hassasiyetle ölçüm yapabilen

Laboratuvar terazisi: 0.1 g hassasiyetle ölçüm yapabilen

Yüksek devirli blender: 500ml blender kabı ile birlikte

Manyetik karıştırıcı

Rotary evaporatör

Whatman No.4 filtre kağıdı

Çeşitli hacimlerde balonjoje

El pompası

Mobil faz süzme aparatı

Otomatik pipet: 0-100 µl ve 100-1000 µl arası ayarlanabilen

3.2.4 HPLC Şartları

HPLC şartları aşağıda tanımlandığı şekilde ayarlandı:

Ex. :365nm, Em. :435nm, Sıcaklık : Oda sıcaklığı , Pompa akış hızı: 1 ml/dk

Basınç : Basınç değeri ortam sıcaklığına göre 155-175 bar arasında değişir.

3.2.5 Spektrofotometre Kalibrasyonu

- 9 mmol/L sülfürik asit çözeltisi hazırlandı. (1ml konsantre sülfürik asit 2L'ye saf su ile tamamlandı).
- Hazırlanan çözelti ile 0.25 mmol/L potasyum dikromat çözeltisi hazırlandı. (78mg potasyum dikromat 1L, 9 mmol/L sülfürik asit ile çözüldü).
- 25ml 0.25 mmol/L potasyum dikromat çözeltisi 9 mmol/L sülfürik asitle 50ml'ye tamamlanarak 0.125 mmol/L potasyum dikromat çözeltisi hazırlandı.
- 25ml 0.125 mmol/L potasyum dikromat çözeltisi 9 mmol/L sülfürik asitle 50ml'ye tamamlanarak 0.0625 mmol/L potasyum dikromat çözeltisi hazırlandı.
- Kör olarak kullanılan 9 mmol/L sülfürik asit çözeltisine karşın, değişik konsantrasyonlarda hazırlanan üç potasyum dikromat çözeltisinin 350nm'de maksimum absorpsiyonu (A) ölçüldü.
- Her konsantrasyonun molar absorptivitesi, ϵ , hesaplandı ($\epsilon=A/Lc$, c = konsantrasyon, mol/L, $L=1\text{cm}$).
- Hesaplanan üç ϵ değerinin ortalaması alındı, ve düzeltme faktörü F bulundu ($F=3160/\epsilon_{ort}$).
- $0.95 < F < 1.05$ şartı sağlanıyorsa bu spektrofotometre standart kalibrasyonu için kullanılabilir demektir.

3.2.6 Stok Standart Hazırlanması ve Kalibrasyonu

Kristal halde bulunan aflatoksin B1, B2, G1, G2 standartları, Benzen/Asetonitril çözeltisi içinde çözündürülerek 10µg/ml konsantrasyonda çözeltiler elde edildi.

Kör olarak kullanılan Benzen/Asetonitril çözeltisine karşın hazırlanan standartların 350nm'deki absorbansları (A) okundu. Her aflatoksinin konsantrasyonu C (mg/L), 1 nolu eşitlik ve Çizelge 3.1'deki veriler kullanılarak hesaplandı.

$$C = 1000 * F * A * M_i / E_i$$

A ; Absorbans değeri

M_i ; Her bir aflatoksinin molekül ağırlığı, (g/mol)

E_i ; Her bir aflatoksinin Benzen/Asetonitril içindeki molar absorbtivitesi, (m²/mol)

F ; Spektrofotometre faktörü

Çizelge 3.1 Aflatoksinlerin molekül ağırlığı (M_i) ve molar absorpsiviteleri (E_i)

Aflatoksin	M _i (g/mol)	E _i (m ² /mol)
B1	312	19800
B2	314	20900
G1	328	17100
G2	330	18200

Hazırlanan standartlardan Benzen/Asetonitril içerisinde 1000 ng/ml aflatoksin B1 ve G1, 200 ng/ml aflatoksin B2 ve G2 standartları hazırlandı.

Karışık stok standart hazırlamak için 10ml'lik balonjojeye seyreltik standartlardan 1'er ml alındı. Çözelti azot gazı altında uçuruldu. 4ml metanol eklendi. Aflatoksinlerin çözünmesi beklendi. Daha sonra 10ml'ye su ile tamamlandı. İyice karıştırıldı. (Karışık stok standardın son konsantrasyonu B1 ve G1 için 100ng/ml; B2 ve G2 için 20ng/ml oldu.)

Stok standartlar koyu renkli numune şişelerine koyuldu ve parafilm ile iyice kapatıldı. 4°C'nin altında muhafaza edildi. Tekrar kullanılacağı zaman önce oda sıcaklığına gelmesi beklenmeli daha sonra parafilm çıkarılmalıdır.

3.2.6.1 Çalışma Standardı Hazırlanması

Hazırlanan karışık stok standarttan Çizelge 3.2'deki miktarlar alındı ve 10 ml'lik balonjölere koyuldu. Metanol/su (40/60) ile çizgisine tamamlandı.

Çizelge 3.2 Çalışma standartlarının hazırlanması

Çalışma standardı	Ara standarttan alınan miktar (μ l)	Son konsantrasyonlar (ng/ml)			
		B1	B2	G1	G2
1	40	0.400	0.080	0.400	0.080
2	120	1.200	0.240	1.200	0.240
3	200	2.000	0.400	2.000	0.400
4	280	2.800	0.560	2.800	0.560
5	360	3.600	0.720	3.600	0.720

3.2.6.2 Örneğe İlave Edilecek Standart Çözeltisinin Hazırlanması

Seyreltik stok standartların her birinden 2ml alınarak 10ml'lik kalibreli balonjölere koyuldu. Benzen-Asetonitril çözeltisi oda sıcaklığında azot gazı altında kuruluğa yakın uçuruldu. Metanolle 10ml'ye tamamlandı ve iyice karıştırıldı. İlave edilecek standart çözelti konsantrasyonu aflatoksin B1 ve G1 için 200 ng/g aflatoksin B2 ve G2 için 40 ng/g oldu.

İlave edilecek standartlar koyu renkli numune şişelerine koyuldu ve parafilm ile iyice kapatıldı. 4°C'nin altında muhafaza edildi. Tekrar kullanılacağı zaman önce oda sıcaklığına gelmesi beklenmeli daha sonra parafilm çıkarılmalıdır.

Geri dönüşüm hesaplarırken standart ilaveli örnek konsantrasyonunun kalibrasyon eğrisi dışına çıkmamasına dikkat edildi. Bu yüzden ilave edilecek standarttan 2 ml'den fazla kullanılmadı. Örneğe standart eklendikten sonra 0.5-2 saat süreyle karanlık bir yerde muhafaza edildi.

3.2.6.3 Kalibrasyon Eğrisi

Her bir aflatoksin için en az beş ayrı noktadan oluşan bir kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisi için 3.2.6.1’de hazırlanan çalışma standartları kullanıldı. Hazırlanan her standarttan HPLC’ye 100µl enjekte edildi.

Her analizde kalibrasyon eğrisi bir standart enjeksiyonu ile kontrol edilmelidir.

3.2.7 Numune Hazırlanması

Numuneler homojen hale getirildikten sonra ekstraksiyona başlandı.

3.2.7.1 İncir

500 ml’lik blender kabına 50 gram numune 0,1 g hassasiyetle tartıldı. 5 gram sodyum klörür ve 300 ml ekstraksiyon çözeltisi ilave edildi ve 3 dakika yüksek devirde karıştırıldı. Filtre kağıdından süzüldü. Süzülen kısımdan 6 ml alınıp içinde 60 ml PBS çözeltisi bulunan behere koyuldu. Yavaşça karıştırıldı. Bölüm 3.2.8 uygulandı.

3.2.7.2 Fındık

500 ml’lik blender kabına 50 gram numune 0.1 g hassasiyetle tartıldı. 4 gram sodyum klörür, 100 ml su ve 150 ml metanol eklendi, 3 dakika yüksek devirde karıştırıldı. Filtre kağıdından süzüldü. Süzülen kısımdan 5 ml alınıp 5 ml PBS çözeltisi ile iyice karıştırıldı. Bölüm 3.2.8 uygulandı.

3.2.8 İmmunoafinite Safhası ve Enjeksiyon

İmmunoafinite kolonun başındaki mavi kısım çıkarıldı, ucu kesildi ve tekrar takıldı. Kolon bu kısımdan el pompasına sabitlendi. Ekstraksiyonu tamamlanmış numune el pompasındaki cam enjektöre koyuldu. Kolondan saniyede yaklaşık 1 damla akacak şekilde geçirildi. Daha sonra 2 kez 10 ml saf su geçirilerek yıkama yapıldı (akış hızı 5 ml/ dk’yı geçmemelidir) Kolondan birkaç saniye hava geçirilip su tamamen çıkarıldı. 1 ml metanol alındı ve kolondan yavaşça geçirildi. Bu sırada bir iki kez piston geri çekilerek geri yıkama yapıldı. Tüm metanol 5 ml’lik koyu renkli şişeye toplandı. 1 ml su ile işlem tekrarlandı ve su aynı şişeye alındı.

Toplam hacim 2 ml oldu. 100µl enjeksiyon yapıldı. Her numune için en az 2 enjeksiyon yapıldı. Her enjeksiyon için ayrı numune şişesi kullanıldı.

3.2.9 Hesaplamalar

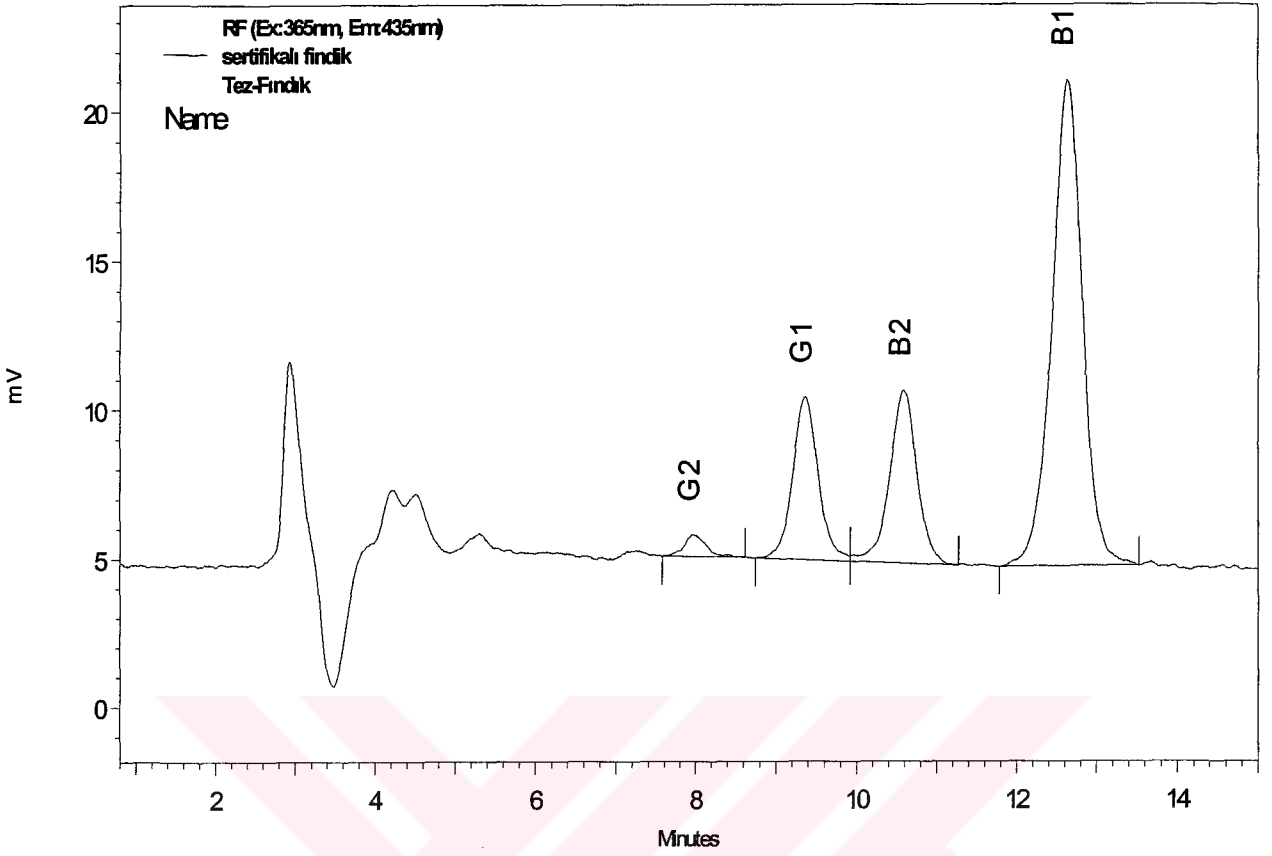
Analizin seyreltme faktörü 2'dir. Bu yüzden sonuç 2 ile çarpıldı.

Örnek: Analiz sonunda aflatoksin B1 2 ng/ml bulunsun.

$(50\text{gram}/250\text{ml}) * 5\text{ml}/2\text{ml} = 0.5\text{g/ml}$ 'dir. (veya $(50\text{gram}/300\text{ml}) * 6\text{ml}/2\text{ml} = 0.5\text{g/ml}$)

Örneğin 0.5g/ml'sinde 2ng/ml bulunursa 1 gramında 4ng olmalıdır.

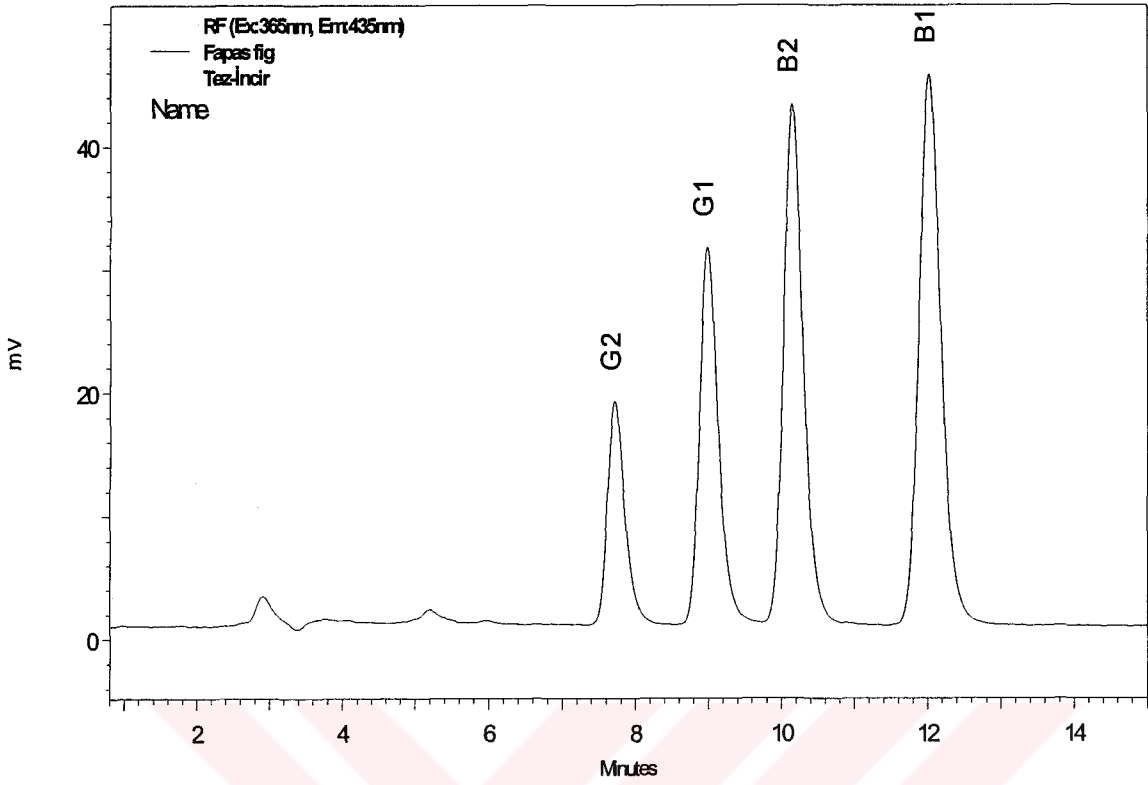
Sonuç: 4 ng/g aflatoksin B1



Şekil 3.1 Fındık numunesinin aflatoksin kromatogramı

RF (Ex:365nm,
Em:435nm)

İsim	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan	Konsantrasyon	Birim
G2	7.974	13933	0.16	ng/g
G1	9.364	120553	2.05	ng/g
B2	10.591	138176	0.79	ng/g
B1	12.642	435167	5.89	ng/g
Toplam		707829	8.89	ng/g

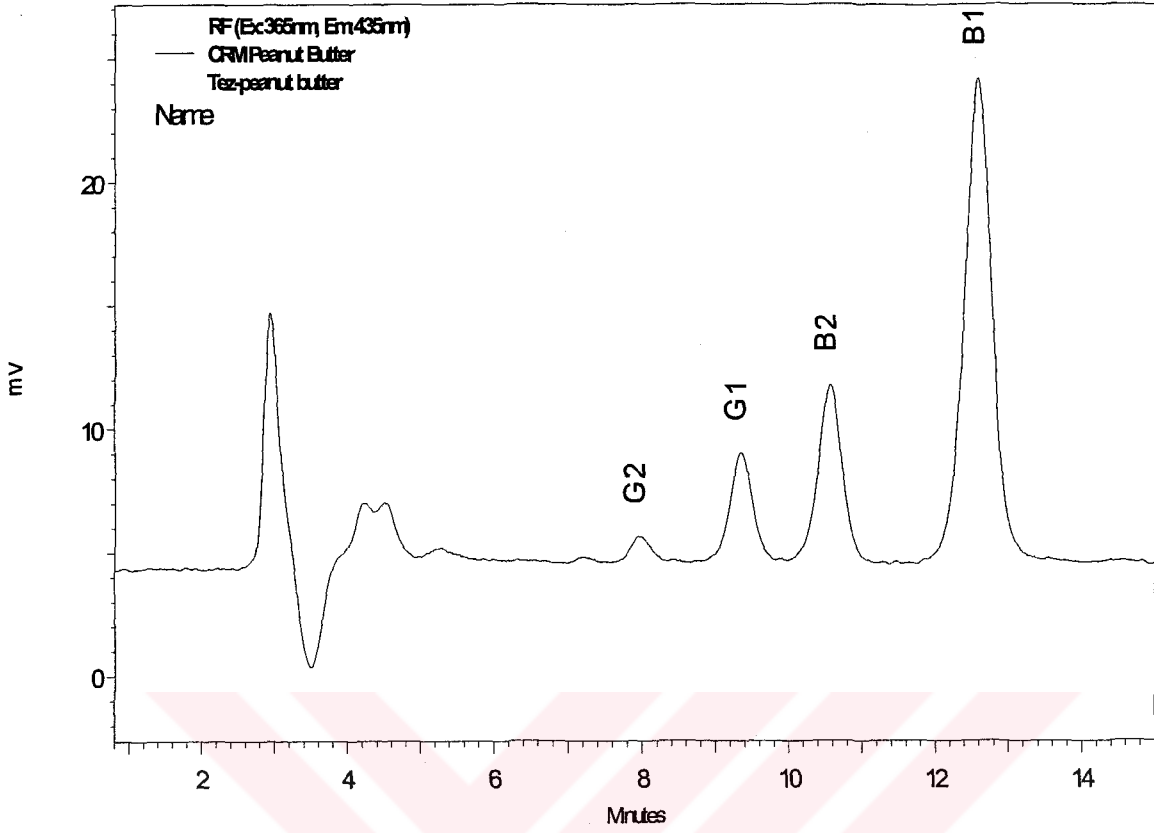


Şekil 3.2 İncir numunesinin aflatoksin kromatogramı

RF (Ex:365nm,
Em:435nm)

İsim	Alıkonma zamanı (dk)	Alan	Konsantrasyon	Birim
G2	7.719	305336	1.29	ng/g
G1	8.992	554274	3.46	ng/g
B2	10.149	810882	1.69	ng/g
B1	12.026	948430	4.71	ng/g

Toplam	2618922	11.15		ng/g
---------------	---------	-------	--	------



Şekil 3.3 Yerfistiği numunesinin aflatoksin kromatogramı

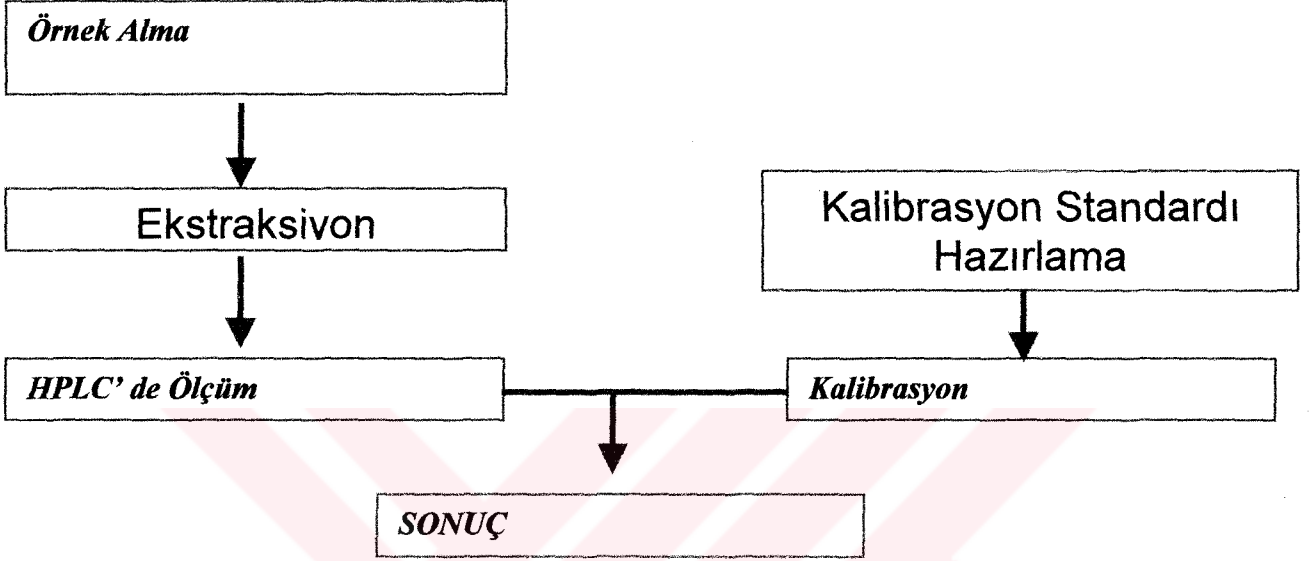
RF (Ex:365nm,
Em:435nm)

İsim	Alınma Zamanı (dk)	Alan	Konsantrasyon	Birim
G2	7.960	20905	0.09	ng/g
G1	9.339	99716	0.62	ng/g
B2	10.561	171362	0.36	ng/g
B1	12.594	526909	2.62	ng/g
Toplam		818893	3.69	ng/g

4. AFLATOKSİN ANALİZİ BELİRSİZLİK HESAPLANMASI

Bu bölümde fındık ve incir numunelerinde aflatoksin tayini belirsizlik hesabının yapılması amaçlanmıştır.

4.1 Deneysel İşlemler



Şekil 4.1 Deneysel İşlemler

4.1.1 Stok Standart Çözelti Hazırlanması (10µg/ml)

Kristal halde bulunan aflatoksin B1,B2,G1,G2 standartları Benzen/Asetonitril çözücüde çözülerek 10 µg/ml derişimde stok çözelti hazırlandı.

4.1.1.1 Stok Standart Çözelti Kalibrasyonu(10µg/ml)

Hazırlanan stok çözelti derişimi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$C_A (\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{M \cdot A \cdot F \cdot 1000}{E}$$

- C_A : Aflatoksin derişimi(µg/ml)
 A : Ölçülen absorbans (350 nm)
 M : Aflatoksinin molekül ağırlığı (g/mol)
 E : Aflatoksinin molar absorpsivitesi

İC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
 DOĞRUMANESYON MERKEZİ

F : Spektrofotometre kalibrasyonundan gelen faktör. Metod kısmında belirtildiği gibi hesaplandı.

Aflatoksinlerin molekül ağırlıkları ve molar absorptiviteyi Çizelge 3.1' de verilmiştir.

4.1.1.2 Ara Stok Standart Çözelti Hazırlanması

Hazırlanan ana stok çözeltiden 1000ng/ml B1, G1 ve 200 ng/ml B2, G2 aflatoksin içeren ara stok çözelti hazırlandı. 1000 ng/ml ara stok için ana stok çözeltilerden B1 ve G1 den 1 ml alındı, B2 ve G2 den 200 µl alınıp 10 ml lik balonda hacme tamamlandı.

4.1.1.3 Çalışma Çözeltileri Hazırlanması

Hazırlanan ara stok çözeltiden Çizelge 3.2' de verilen derişimlerde çalışma standart çözeltileri hazırlandı. Çizelge 3.2' de belirtilen miktarlar 10 ml lik balonjojede hacme tamamlanmıştır.

Hesaplama Formülü

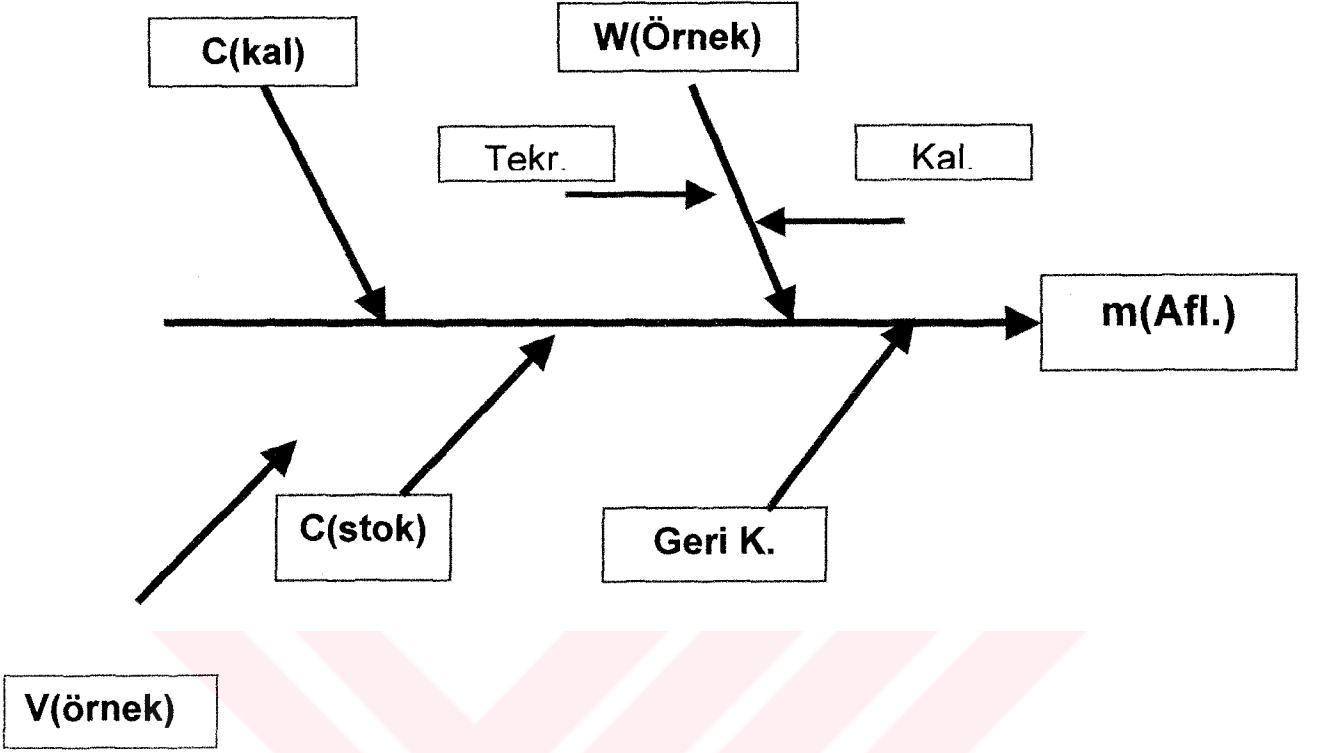
$$m (ng / g) = \frac{C_0 \cdot V}{F \cdot W}$$

- m : Aflatoksin miktarı (ng/g)
 C₀ : Örnekte bulunan miktarı oranı (ng/ml)
 W : Örnek tartımı (g)
 V : Örnek hacmi (ml)
 F : Derişim Faktörü

4.2 Belirsizlik Bileşenlerinin Hesaplanması

Aflatoksin miktarının analizindeki belirsizlik bileşenleri

- Aflatoksin standardından gelen belirsizlik
- Aflatoksin kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik
- Alınan örnek hacminden gelen belirsizlik
- Metot Geri kazanım belirsizliği
- Tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik



Şekil 4.2 Belirsizlik bileşenleri

Bu belirsizlik bileşenlerinin herbiri aşağıda hesaplanmıştır.

4.2.1 Aflatoksin Standardı Derişimi Belirsizliği

4.2.1.1 Stok Standart Çözelti Hacim Belirsizliği

Tekrarlanabilirlik: 10 ve 100 ml balonlar için yapılan bir seri doldur-boşalt test sonucu tekrarlanabilirlik standart sapma olarak 0.009 ml bulundu.

Kalibrasyon: 10ml balon için kalibrasyon sertifika değeri % 95 güvenilirlik düzeyinde ± 0.021 ml olarak verilmiştir. Dikdörtgen dağılımla $0.021/2=0.0105$ ml olarak hesaplandı.

100ml balon için kalibrasyon sertifika değeri % 95 güvenilirlik düzeyinde ± 0.309 ml olarak verilmiştir. Dikdörtgen dağılımla $0.309/2=0.155$ ml olarak hesaplandı.

1ml otomatik pipet için kalibrasyon sertifika değeri % 95 güvenilirlik düzeyinde ± 0.001 ml olarak verilmiştir. Dikdörtgen dağılımla $0.001/2=0.0005$ ml olarak hesaplandı.

Sıcaklık: Laboratuvardaki sıcaklık değişimi $\pm 5^{\circ}\text{C}$,olarak verilmiştir. Sıcaklıkla suyun hacimsel genişleme katsayısı $2.1 \times 10^{-4} /^{\circ}\text{C}$ dir. Standart belirsizlik dikdörtgen dağılıma göre

1 ml otomatik pipette $(1 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5) / \sqrt{3} = 0.00061$ ml

10ml balonda $(10 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5) / \sqrt{3} = 0.0061$ ml

100ml balonda $(100 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5) / \sqrt{3} = 0.061$ ml bulundu.

Bu belirsizlik bileşenleri birleştirilerek toplam hacim belirsizliği aşağıdaki şekilde hesaplandı ve Çizelge 4.1'de gösterildi

$u(V_{100\text{ml}})$;

$$\sqrt{0.009^2 + 0.155^2 + 0.061^2} = 0.167 \text{ ml}$$

$u(V_{10\text{ml}})$;

$$\sqrt{0.009^2 + 0.0105^2 + 0.0061^2} = 0.0151 \text{ ml}$$

$u(V_{1\text{ml}})$;

$$\sqrt{0.0005^2 + 0.00061^2} = 0.000789 \text{ ml}$$

Çizelge 4.1 Aflatoksin Stok Çözelti Hacim Belirsizlik Bileşenleri

Bileşen	Değer	Standart Bel	Rel. Std. Bel
Çözelti hacmi (ml)	100	0.167	0.00167
Çözelti hacmi (ml)	10	0.0151	0.00151
Çözelti hacmi (ml)	1	0.000789	0.000789
Toplam Belirsizlik			0.0024

Toplam stok çözelti hacim belirsizliği:

$$\sqrt{0.00167^2 + 0.00151^2 + 0.000789^2} = 0.0024 \text{ ml}$$

4.2.1.2 Stok Standart Çözelti Derişim Belirsizliği (10 $\mu\text{g/ml}$)

Aflatoksinin 350 nm deki molar absorptivitesi UV spektrometrede ölçülerek derişimi aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Çizelge 4.2'da toplam derişim belirsizliği değerleri

$$C_A (\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{M \cdot A \cdot F \cdot 1000}{E}$$

gösterildi.

Çizelge 4.2 Toplam derişim belirsizliği değerleri

Bileşen , B1	Değer	Standart Bel	Rel. Std. Bel
Faktör, F (birimsiz)	0.97	0.014	0.014
Molar Absorptivite, E(l/mol)	19800	200	0.010
Absorbans (birimsiz)	0.638	0.035	0.055
Derişim Belirsizliği, C(ug/ml)	9.75		0.058

Bileşen B2	Değer	Standart Bel	Rel. Std. Bel
Faktör, F (birimsiz)	0.97	0.014	0.014
Molar Absorptivite, E(l/mol)	20900	200	0.010
Absorbans (birimsiz)	0.687	0.0322	0.047
Derişim Belirsizliği, C(ug/ml)	10.01		0.050

Bileşen G1	Değer	Standart Bel	Rel. Std. Bel
Faktör, F (birimsiz)	0.97	0.014	0.014
Molar Absorptivite, E(l/mol)	17100	200	0.012
Absorbans (birimsiz)	0.528	0.0421	0.080
Derişim Belirsizliği, C(ug/ml)	9.82		0.082

Bileşen G2	Değer	Standart Bel	Rel. Std. Bel
Faktör, F (birimsiz)	0.97	0.014	0.014
Molar Absorptivite, E(l/mol)	18200	200	0.011
Absorbans (birimsiz)	0.529	0.0369	0.070
Derişim Belirsizliği, C(ug/ml)	9.30		0.072

Toplam stok çözelti derişim belirsizliği:

$$u(C) = \sqrt{0.058^2 + 0.050^2 + 0.082^2 + 0.072^2} = 0.13$$

Stok standart çözelti toplam belirsizlik

$$\frac{U(SK_{St})}{SK_{St}} = \sqrt{\left(\frac{0.0024}{10}\right)^2 + \left(\frac{0.13}{10}\right)^2} = 0.013$$

4.2.2 Örnek Tartım Belirsizliği (U_M)

Analiz örneği olarak 50 g örnek 0.1 g hassasiyetle tartıldı ve ekstraksiyon yapıldı. Daha sonra bu çözeltden bir miktar alınıp immünoafinite kolonundan geçirildikten sonra 2 ml'ye tamamlandı ve HPLC de analiz edildi.

4.2.2.1 Tartım Belirsizliği:

Kalibrasyon/Lineerlik: Kullanılan 0.1 g hassasiyetli terazinin toplam kalibrasyon belirsizliği, sertifikasında % 95 güvenilirlik düzeyinde ± 0.015 g dır. Standart belirsizlik $0.015/2 = 0.0075$ g'dır ve tartım farktan hesaplandığı için iki kere hesaba katıldı.

$$u(W) = \sqrt{2(0.0075^2)} = 0.011 \text{ g}$$

4.2.2.2 Hacim Belirsizliği

Tekrarlanabilirlik: 250 ml balon için yapılan bir seri doldur-boşalt test sonucu tekrarlanabilirlik standart sapma olarak 0.05 ml olarak bulundu.

Kalibrasyon: Kalibrasyon sertifika değeri % 95 güvenilirlik düzeyinde ± 0.08 ml olarak verilmiştir. Normal dağılımla $0.08/2=0.04$ ml olarak hesaplandı.

Bu belirsizlik bileşenleri birleştirilerek toplam hacim belirsizliği

$$u(V) = \sqrt{0.05^2 + 0.04^2}$$

$U(V) = 0.064$ ml bulundu.

6 ml 10 ml lik pipetle alındı.

Tekrarlanabilirlik : Standart sapma olarak 0.03 ml

Kalibrasyon: Standart sapma olarak 0,028 ml

$$u(V) = \sqrt{0.03^2 + 0.028^2}$$

$U(V) = 0.041$ ml bulundu.

2 ml hacim 1 ml ile iki kere ilave edilmiştir.

Tekrarlanabilirlik: Standart sapma olarak 0.01 ml

Kalibrasyon: Standart sapma olarak 0.01 ml

$$u(V) = \sqrt{4 (0.01)^2}$$

$U(V) = 0.02$ ml bulundu.

Bu üç belirsizlik bileşenleri birleştirilerek toplam hacim belirsizliği

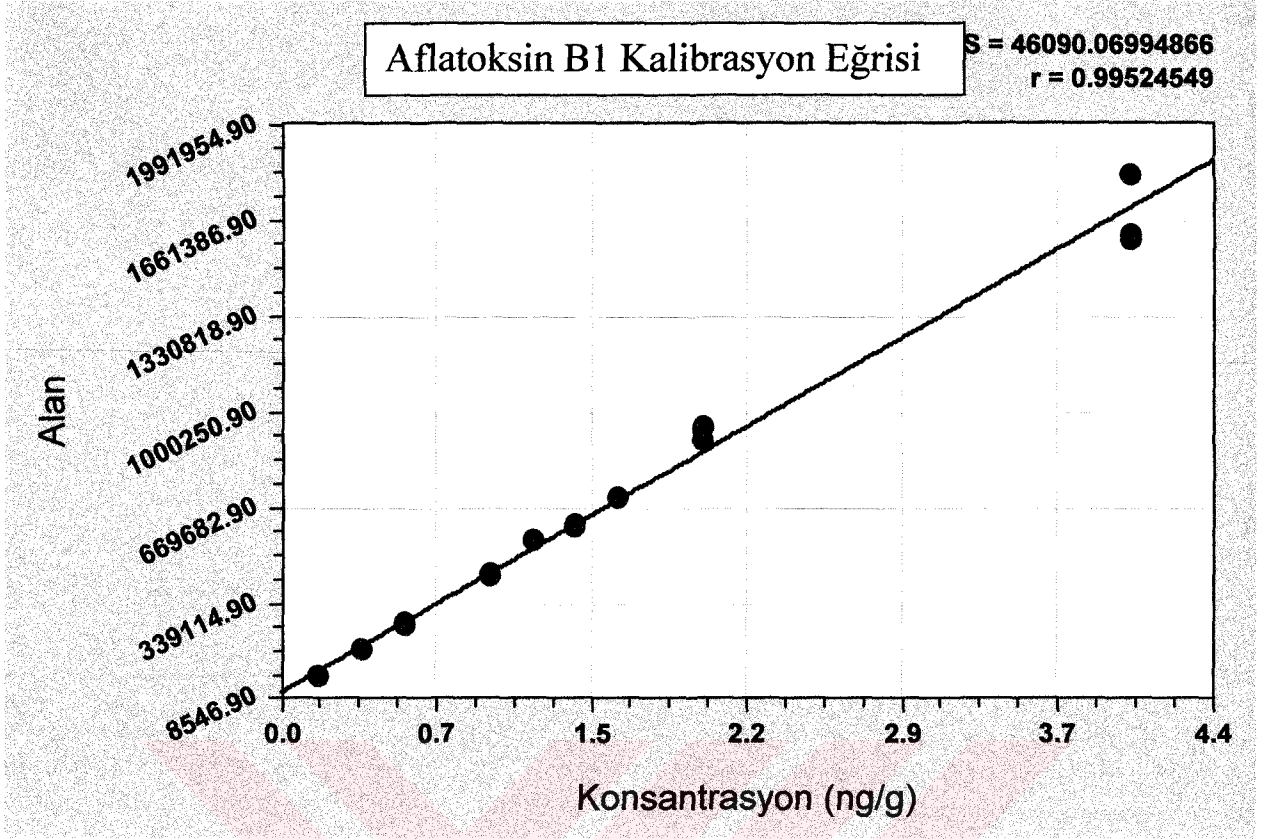
$$u(V) = \sqrt{0.064^2 + 0.041^2 + 0.02^2}$$

$U(V) = 0.079$ ml bulundu.

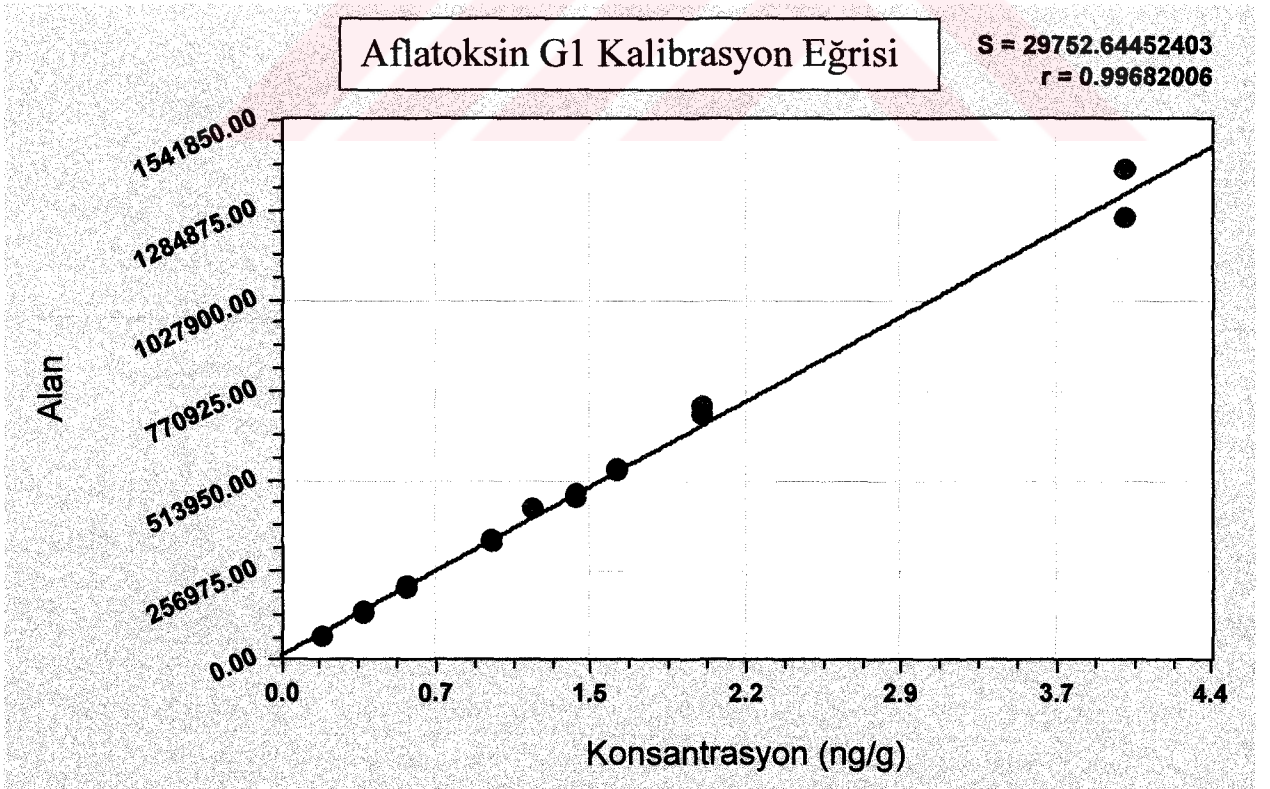
4.2.3 Kalibrasyon Eğrisinden Gelen Belirsizlik

Kalibrasyon için hazırlanan standartlar ve pik yükseklikleri Çizelge 4.6-4.7-4.8-4.9'da verilmiştir.

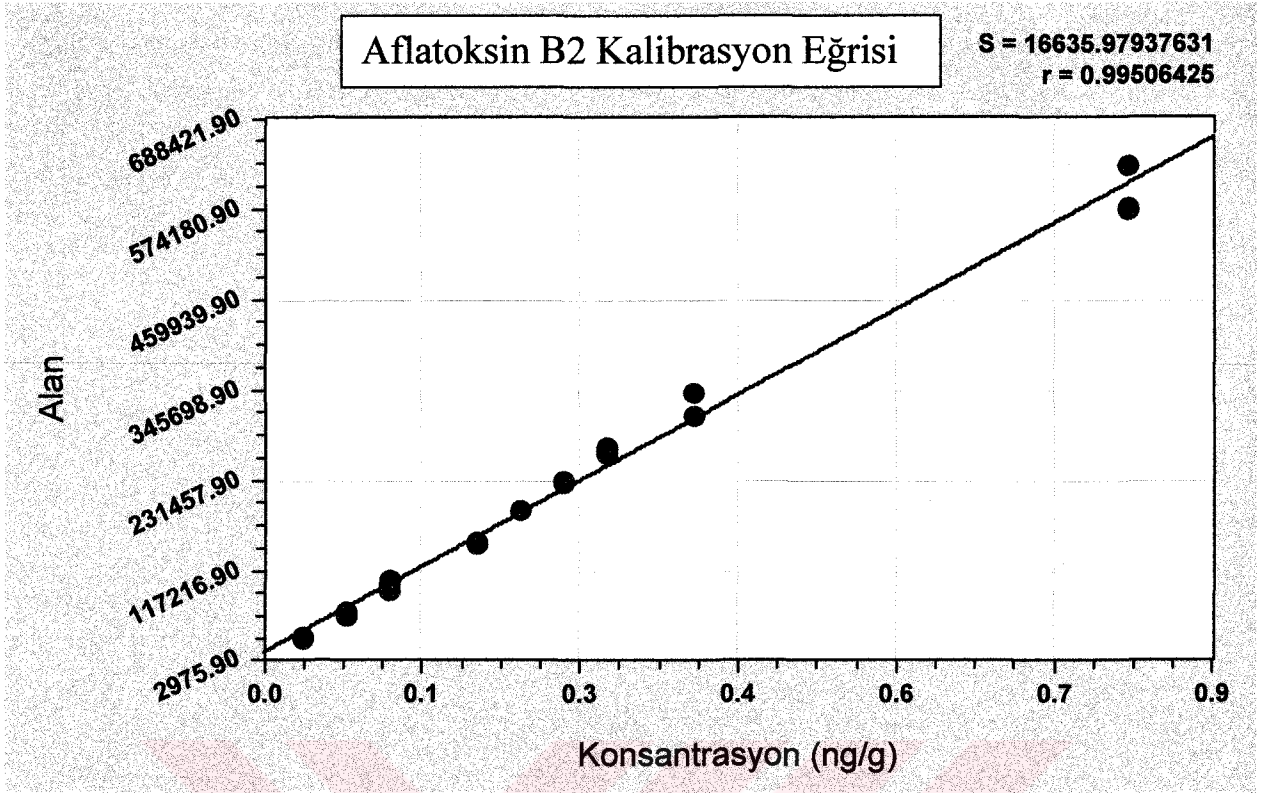
Aflatoksin B1 , B2, G1 ve G2 ye ait kalibrasyon eğrileri aşağıda verilmiştir.



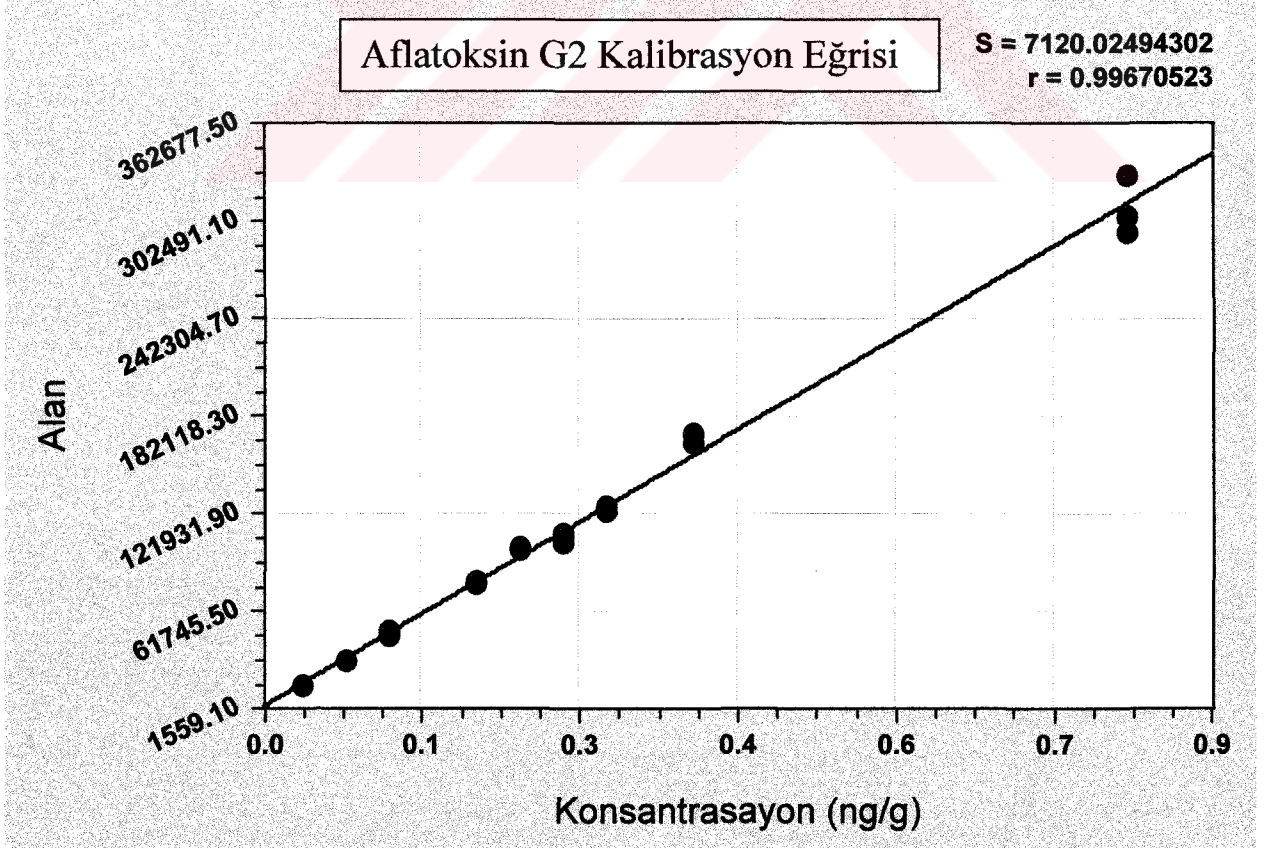
Şekil 4.3 Aflatoksin B1 Kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.4 Aflatoksin G1 Kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.5 Aflatoksin B2 Kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.6 Aflatoksin G2 Kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon Eğrisi Belirsizlik formülü

$$U(c_0) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$$

- S : Residual Standart Sapma
- B₁ : Eğim
- p : Örnek ölçümü için okuma sayısı
- n : Kalibrasyon için yapılan ölçüm sayısı
- c₀ :Tayin edilen çözelti derişimi
- c :farklı kalibrasyon standartlarının ortalaması
- S_{xx} :Aşağıdaki formüle göre hesaplanır.
- İ : Kalibrasyon standardını gösteren indis
- c_j : Kalibrasyon eğrisinden hesaplanan ölçüm sonucu

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2$$

Aflatoksin B1 , B2, G1 ve G2 ye ait kalibrasyon eğrileri belirsizlik hesaplama verileri ve hesaplanan belirsizlik Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Kalibrasyon eğrisi verileri ve belirsizlik hesaplama

Sembol	B1	B2	G1	G2
S	46090	16636	29753	7120
B1	420861	745360	329680	390931
P	3	3	3	3
N	27	27	27	27
Co	1.25	0.32	1.25	0.30
Cort	1.38	0.28	1.38	0.28
Sxx	31.61	1.26	31.43	1.26
U(C)	0.067	0.014	0.055	0.011

Kalibrasyon eğrisinden okunan örnek derişimi $C_0=1.25 \mu\text{g/L}$ dir.

4.2.4 Geri Kazanım Belirsizliği

Metot Doğrulama çalışmaları sonucunda elde edilen geri kazanım yüzdeleri ve geri kazanım belirsizliği , değişik örnek tipleri için aşağıda verilmiştir;

0.1 ppb ile 8 ppb aralığında

Fındık için geri kazanım ortalama olarak % 95 ve RSD olarak %2.52,

Maksimum standart sapma olarak 0.14 bulundu (Çizelge 5.2).

2 ppb ile 8 ppb aralığında

İncir için geri kazanım ortalama olarak % 93 ve RSD olarak %1.17,

Maksimum standart sapma olarak 0.21 bulundu (Çizelge 5.4).

4.3 Bileşik Belirsizliğin Hesaplanması

Belirsizlik bileşenleri aşağıdaki formüle göre her bir aflatoksin için hesaplandı ve değerler Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’da gösterildi.

$$\frac{U(m_{Afl})}{m_{Afl}} = \sqrt{\left(\frac{u(A_{Stok})}{A_{Stok}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{ör})}{V_{ör}}\right)^2 + \left(\frac{u(R_{ör})}{R_{ör}}\right)^2 + \left(\frac{u(C_{ör})}{C_{ör}}\right)^2}$$

Çizelge 4.4 Bileşik Belirsizlik (Fındık için)

Bileşen		Değer	Standart Bel	Rel. Std. Bel
Aflatoksin Stok Çözelti(ng/ml)		10	0.013	0.0013
Örnek Tartımı (g)		50	0.011	0.0002
Örnek Çözelti Hacmi(ml)		2	0.079	0.0395
Geri kazanım (R)		1	0.14	0.1400
Kalibrasyon Eğrisi belirsizliği	<i>B1</i>	1.25	0.067	0.0536
	<i>G1</i>	0.28	0.055	0.1964
	<i>B2</i>	1.25	0.014	0.0112
	<i>G2</i>	0.28	0.011	0.0393
Toplam Belirsizlik	<i>B1</i>			0.155
	<i>G1</i>			0.244
	<i>B2</i>			0.146
	<i>G2</i>			0.151

Çizelge 4.5 Bileşik Belirsizlik (İncir için)

Bileşen		Değer	Standart Bel	Rel. Std. Bel
Aflatoksin Stok Çözelti(ng/ml)		10	0.013	0.0013
Örnek Tartımı (g)		50	0.011	0.0002
Örnek Çözelti Hacmi(ml)		2	0.079	0.0395
Geri kazanım (R)		1	0.21	0.2100
Kalibrasyon Eğrisi belirsizliği	B1	1.25	0.067	0.0536
	G1	0.28	0.055	0.1964
	B2	1.25	0.014	0.0112
	G2	0.28	0.011	0.0393
Toplam Belirsizlik	B1			0.220
	G1			0.290
	B2			0.214
	G2			0.217

Aflatoksin miktarı hesaplama formülü:

$$m (ng / g) = \frac{C_0 \cdot V}{F \cdot W}$$

m : Aflatoksin miktarı (ng/g)

C₀ : Örnekte bulunan miktarı oranı (ng/ml)

W : Örnek tartımı (g)

V : Örnek hacmi (ml)

F : Derişim Faktörü

Örnek:

Fındık için;

Örnekte bulunan B1 miktarı $C_0 = 2 \text{ ng/ml}$

Örnek tartımı $W = 50 \text{ g}$

Örnek Hacmi $V = 50 \text{ ml}$

Derişim Faktörü $F = 5/2$

$$m(\text{ng} / \text{g}) = \frac{2 \times 250}{2.5 \times 50} = 4 \text{ ng} / \text{g}$$

B1 aflatoksin için standart belirsizlik $U(m) = 4 \times 0.155 = 0.62 \text{ ng/g}$

4.4 Genişletilmiş Belirsizlik

Genişletilmiş belirsizlik $k=2$ (%95 güvenilirlik sınırı için)

$U(m) = 0.62 \times 2 = 1.24$ ve yaklaşık olarak 1.2 ng/g bulunur.

4.5 Raporlama

Aflatoksin B1 miktarı $(4.0 \pm 1.2) \text{ ng/g}$ olarak raporlanır. ($k=2$ ve %95 güvenilirlik düzeyinde)

Çizelge 4.6 B1 Kalibrasyon Verileri

Derişim (ng/g)	Y	x(Ci)	(ci-Cort)	(ci-cort)2
0.2	87956	0.147056	-1.2307	1.5147
0.2	85469	0.141147	-1.2367	1.5293
0.2	87014	0.144818	-1.2330	1.5202
0.4	180829	0.36773	-1.0101	1.0202
0.4	179955	0.365654	-1.0121	1.0244
0.4	178294	0.361707	-1.0161	1.0324
0.6	273297	0.587442	-0.7904	0.6247
0.6	271360	0.582839	-0.7950	0.6320
0.6	265331	0.568514	-0.8093	0.6549
1	443657	0.992231	-0.3856	0.1487
1	433668	0.968497	-0.4093	0.1675
1	434118	0.969566	-0.4082	0.1667
1.2	559085	1.2665	-0.1113	0.0124
1.2	557263	1.26217	-0.1156	0.0134
1.2	558281	1.26459	-0.1132	0.0128
1.4	607817	1.38229	0.0045	0.0000
1.4	612823	1.39418	0.0164	0.0003
1.4	609835	1.38708	0.0093	0.0001
1.6	702249	1.60667	0.2289	0.0524
1.6	704154	1.61119	0.2334	0.0545
1.6	702886	1.60818	0.2304	0.0531
2	946138	2.18617	0.8084	0.6535
2	947840	2.19021	0.8124	0.6600
2	903096	2.0839	0.7061	0.4986
4	1609216	3.7617	2.3839	5.6830
4	1818641	4.25931	2.8815	8.3031
4	1599522	3.73866	2.3609	5.5737
Cort= 1.3778 ng/g			Sxx	31.61

Çizelge 4.7 B2 Kalibrasyon Verileri

Derişim (ng/g)	y	X(Ci)	(ci-Cort)	(ci-cort)2
0.04	32387	0.026626	-0.2490	0.0620
0.04	33177	0.0276859	-0.2479	0.0615
0.04	29759	0.0231002	-0.2525	0.0638
0.08	66573	0.0724911	-0.2031	0.0413
0.08	65351	0.0708516	-0.2047	0.0419
0.08	60686	0.0645929	-0.2110	0.0445
0.12	104574	0.123475	-0.1521	0.0231
0.12	100051	0.117406	-0.1582	0.0250
0.12	91862	0.10642	-0.1692	0.0286
0.2	152513	0.187791	-0.0878	0.0077
0.2	149788	0.184135	-0.0915	0.0084
0.2	150975	0.185728	-0.0899	0.0081
0.24	194026	0.243486	-0.0321	0.0010
0.24	192727	0.241744	-0.0339	0.0011
0.24	193093	0.242235	-0.0334	0.0011
0.28	228444	0.289663	0.0141	0.0002
0.28	230149	0.29195	0.0164	0.0003
0.28	227889	0.288918	0.0133	0.0002
0.32	265459	0.339323	0.0637	0.0041
0.32	273046	0.349502	0.0739	0.0055
0.32	271191	0.347013	0.0714	0.0051
0.4	340846	0.440465	0.1649	0.0272
0.4	340914	0.440556	0.1650	0.0272
0.4	311857	0.401572	0.1260	0.0159
0.8	571889	0.75044	0.4748	0.2255
0.8	628544	0.82645	0.5509	0.3034
0.8	576316	0.756379	0.4808	0.2311
Cort= 0.2756 ng/g			Sxx	1.26

Çizelge 4.8 G1 Kalibrasyon Verileri

Derişim (ng/g)	Y	x(Ci)	(ci-Cort)	(ci-cort) ²
0.2	67761	0.159362	-1.2184	1.4846
0.2	68403	0.16131	-1.2165	1.4798
0.2	69455	0.164501	-1.2133	1.4721
0.4	137472	0.370813	-1.0070	1.0140
0.4	137084	0.369636	-1.0082	1.0164
0.4	138667	0.374437	-1.0034	1.0067
0.6	211370	0.594963	-0.7828	0.6128
0.6	203844	0.572135	-0.8057	0.6491
0.6	207331	0.582712	-0.7951	0.6322
1	343055	0.944396	-0.4334	0.1878
1	338952	0.98195	-0.3959	0.1567
1	339733	0.984319	-0.3935	0.1548
1.2	432338	1.26521	-0.1126	0.0127
1.2	430745	1.26038	-0.1174	0.0138
1.2	430919	1.26091	-0.1169	0.0137
1.4	472340	1.38655	0.0088	0.0001
1.4	474171	1.3921	0.0143	0.0002
1.4	464576	1.363	-0.0148	0.0002
1.6	544249	1.60467	0.2269	0.0515
1.6	545575	1.60869	0.2309	0.0533
1.6	543391	1.60206	0.2243	0.0503
2	728139	2.16245	0.7847	0.6157
2	7726513	2.15752	0.7797	0.6080
2	702386	2.08433	0.7065	0.4992
4	1265059	3.79106	2.4133	5.8238
4	1401684	4.20547	2.8277	7.9957
4	1265119	3.79124	2.4134	5.8247
Cort= 1.3778 ng/g			Sxx	31.43

Çizelge 4.9 G2 Kalibrasyon Verileri

Derişim (ng/g)	Y	x(Ci)	(ci-Cort)	(ci-cort)2
0.04	16737	0.0361978	-0.2394	0.0573
0.04	15591	0.0332664	-0.2423	0.0587
0.04	15929	0.034131	-0.2415	0.0583
0.08	32165	0.0756626	-0.1999	0.0400
0.08	31691	0.0744501	-0.2011	0.0405
0.08	32247	0.0758723	-0.1997	0.0399
0.12	49997	0.121277	-0.1543	0.0238
0.12	46502	0.112337	-0.1633	0.0267
0.12	49348	0.119617	-0.1560	0.0243
0.2	79658	0.197149	-0.0785	0.0062
0.2	80200	0.198536	-0.0771	0.0059
0.2	79318	0.19628	-0.0793	0.0063
0.24	101448	0.252888	-0.0227	0.0005
0.24	100764	0.251138	-0.0245	0.0006
0.24	101343	0.252619	-0.0230	0.0005
0.28	109128	0.272533	-0.0031	0.0000
0.28	110700	0.276555	0.0010	0.0000
0.28	104255	0.260068	-0.0155	0.0002
0.32	124688	0.312336	0.0367	0.0013
0.32	127098	0.318501	0.0429	0.0018
0.32	126564	0.317135	0.0415	0.0017
0.4	171218	0.431359	0.1558	0.0243
0.4	172109	0.433638	0.1580	0.0250
0.4	166069	0.418188	0.1426	0.0203
0.8	295811	0.750067	0.4745	0.2251
0.8	331124	0.840398	0.5648	0.3190
0.8	306653	0.777801	0.5022	0.2522
Cort= 0.2756 ng/g			Sxx	1.26

5. AFLATOKSİN ANALİZİ METOT DOĞRULAMA

İmmunoafinite kolon kullanılarak ekstraksiyonu yapılan örneklerde HPLC yöntemi ile aflatoksin B1 ve toplam aflatoksin tayini metodudur.

Metot doğrulama en çok 20 ng/g toplam aflatoksin içeren fındık ve incir örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Avrupa birliği limit değerlerine göre kabul edilebilen en yüksek değer aflatoksin B1 için 2 ng/g, toplam aflatoksin için 4 ng/g'dır.

5.1 Metot Doğrulama Parametreleri

Bu metot için aşağıda belirtilen metot parametrelerinin Doğrulama çalışmaları yapılmıştır.

- Saptama Sınırı
- Hesaplama Sınırı
- Lineer ölçüm aralığı
- Geri kazanım

5.1.1 Saptama Sınırı (LOD) ve Hesaplama Sınırı (LOQ)

Saptama sınırı için HPLC cihazının saptayabileceği en düşük konsantrasyonda (0.02 ng/g B1, G1 ve 0.004 ng/g B2, G2) standart çözelti hazırlandı ve 6 kez okuma yapılarak standart sapması hesaplandı.

Buna göre;

$$\text{LOD} = \text{Ortalama} + 3 \times \text{Standart Sapma}$$

$$\text{LOQ} = \text{Ortalama} + 10 \times \text{Standart Sapma}$$

formülleri kullanılarak her bir aflatoksin için aşağıdaki değerler hesaplandı (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1 LOD ve LOQ hesaplama

	B1 (0.02 ng/g)	B2 (0.004 ng/g)	G1 (0.02 ng/g)	G2 (0.004ng/g)	Toplam (0.048ng/g)
1	0.018	0.003	0.019	0.004	0.050
2	0.021	0.004	0.018	0.005	0.043
3	0.018	0.004	0.020	0.004	0.042
4	0.019	0.003	0.019	0.003	0.046
5	0.018	0.004	0.019	0.005	0.047
6	0.020	0.005	0.020	0.004	0.051
ortalama	0.019	0.004	0.019	0.004	0.047
Std sapma	0.0012	0.0007	0.0007	0.0007	0.0033
2 std sapma	0.002	0.001	0.001	0.001	0.007
10 std sapma	0.023	0.014	0.014	0.014	0.066
LOD	0.02	0.005	0.02	0.006	0.053
LOQ	0.04	0.018	0.03	0.018	0.113

Kalibrasyon eğrisinde kullanılan en düşük konsantrasyonlar B1 için 0.2 ng/g ve toplam aflatoksin için 0.5ng/g olduğundan dolayı. Bu değerler ölçülebilen minimum değerler olarak kabul edildi.

5.1.2 Lineer Ölçüm Aralığı (Linearite)

Linearite için artan konsantrasyonlarda hazırlanan karışık aflatoksin standartlarından 3 tekrarlı enjeksiyonlar yapıldı ve her bir aflatoksin için kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. (Çizelge 4.6-7-8-9). Elde edilen kalibrasyon eğrilerine göre linearite değerleri aşağıdaki gibidir.

B1 için S=46090, r=0.995, Eğim=420861

B2 için S=16636, r= 0.995, Eğim=745360

G1 için S=29753, r=0.997, Eğim=329680

G2 için S=7120, r=0.997, Eğim=390931

5.1.3 Geri Kazanım

Geri kazanım hesapları alandan gidilerek yapıldı. Bunun için her çalışmadan sonra 1ng/g aflatoksin B1,G1 ve 0.2 ng/g aflatoksin B2, G2 karışık standardı enjekte edildi. (Analiz yönteminde örneğin 0.5 gramındaki aflatoksini bulduğumuz için standart konsantrasyonu da yarıya inmiştir. Kromatogramdaki standart 1 ng/g B1 G1 ve 0.2 ng/g B2 G2 olarak okunması gerekir.)

Geri Kazanım = $\frac{(A_{\text{standart ilaveli}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{standart}}} \times 100$ olarak hesaplandı.

A_{standart}

5.1.3.1 Fındık

Fındık için Sertifikalı Referans Örnek kullanıldı ve her gün 3 adet olmak üzere 5 gün boyunca geri kazanım çalışması yapıldı. Bulunan değerler ve geri kazanım sonuçları Çizelge 5.2'dedir.

Çizelge 5.2 Fındık için geri kazanım

FINDIK	Aflatoksin B1		Toplam Aflatoksin	
Sertifika değeri	5.88 ng/g		10.4 ng/g	
Tekrar	Sonuç (ng/g)	%GK	Sonuç (ng/g)	%GK
1	5.54	94	9.37	90
2	5.58	95	9.39	90
3	5.6	95	9.42	91
4	5.64	96	9.38	90
5	5.34	91	9.44	91
6	5.45	93	9.4	90
7	5.48	93	9.58	92
8	5.63	96	9.44	91
9	5.6	95	9.45	91
10	5.58	95	9.34	90
11	5.9	100	9.33	90
12	5.44	93	9.41	90
13	5.65	96	9.46	91
14	5.63	96	9.52	92
15	5.3	90	9.02	87
Ortalama	5.56	95	9.40	90
Std sapma	0.14	2.46	0.12	1.18
2 std sapma	0.29	4.92	0.25	2.36
3 std sapma	0.43	7.38	0.37	3.54

5.1.3.2 İncir

Doğrulama çalışmalarında kullanılan incir örneğinde aflatoksin bulunmadığı için tek paralel çalışılmasına karar verildi. Geri kazanım çalışmaları iki farklı konsantrasyonda yapıldı (Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4).

İlave edilecek standartların konsantrasyonu örnekte 2ng/g aflatoksin B1; 4.8 ng/g toplam aflatoksin bulunacak şekilde hazırlandı.

Daha sonra çalışmalar farklı konsantrasyonda, 8ng/g aflatoksin B1 ve 19.2ng/g toplam aflatoksin içerecek şekilde hazırlanan standart ilaveli örnek ile tekrarlandı.

Yapılan çalışmalar sonucunda en çok 20 ng/g aflatoksin içeren incir örneğinde geri kazanım değerleri aşağıdaki şekilde bulunmuştur:

Aflatoksin B1 = 87-101 %

Toplam Aflatoksin = 91-100 %

Ortalama sonuç % 94'tür.

Çizelge 5.3 İncir numunesi için düşük konsantrasyonda geri kazanım

İNCİR	Aflatoksin B1		Toplam Aflatoksin	
İlave Standart Konsantrasyonu	2 ng/g		4.8 ng/g	
Tekrar	Sonuç (ng/g)	%GK	Sonuç (ng/g)	%GK
1	1.85	93	4.78	100
2	1.89	95	4.58	95
3	1.78	89	4.62	96
4	1.86	93	4.48	93
5	1.91	95	4.41	92
6	1.75	88	4.70	98
7	1.88	94	4.65	97
8	2.02	101	4.63	97
9	1.96	98	4.82	100
10	1.84	92	4.53	94
11	1.86	93	4.59	96
12	1.88	94	4.64	97
13	1.96	98	4.59	96
14	1.74	87	4.76	99
15	1.99	100	4.44	93
Ortalama	1.88	94	4.61	96
Std sapma	0.08	3.98	0.12	3.90
2 std sapma	0.16	7.97	0.23	7.80
3 std sapma	0.32	11.95	0.35	11.70

Çizelge 5.4 İncir numunesi için yüksek konsantrasyonda geri kazanım

İNCİR	Aflatoksin B1		Toplam Aflatoksin	
İlave Standart Konsantrasyonu	8 ng/g		19.2 ng/g	
Tekrar	Sonuç (ng/g)	%GK	Sonuç (ng/g)	%GK
1	7.31	91	17.88	93
2	7.32	92	17.84	93
3	7.61	95	18.24	95
4	7.46	93	17.94	93
5	7.34	92	17.92	93
6	7.42	93	17.46	91
7	7.36	92	17.88	93
8	7.48	94	18.14	94
9	7.68	96	17.85	93
10	7.36	92	17.91	93
11	7.31	91	17.96	94
12	7.35	92	18.41	96
13	7.14	89	17.84	93
14	7.38	92	17.92	93
15	7.43	93	17.96	94
ortalama	7.40	92	17.94	93
std sapma	0.13	1.61	0.21	1.10
2 std sapma	0.26	3.23	0.42	2.19
3 std sapma	0.39	4.84	0.63	3.29

6. METODUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Metodun Doğrulama çalışmaları tamamlandıktan sonra uluslararası kolaboratif çalışmalara katılındı. Çeşitli ülkelerde kolaboratif çalışmalar düzenleyen FAPAS'dan (Food Analysis Performance Assessment Scheme) Fıstık ve İncir numuneleri temin edildi. Fıstık numunesi çeşitli metodlarla 129 ülkede analiz edildi. İncir numunesi de yine çeşitli metodlar ile 73 ülkede analiz edildi. FAPAS tarafından laboratuvarın elde ettikleri sonuçlar için bir z-skor değeri hesaplanarak ilgili laboratuvarlara bu sonuçlar gönderildi. FAPAS'ın hesaplarına göre metodun uygulanabilir olması için z-skor değerinin -2 ile +2 arasında (optimum 0) olması gerekir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz z-skor'lar aşağıda verilmiştir. Z-skor değerlerinden de görüldüğü gibi metodumuzun sonuçları uluslararası kolaboratif çalışma ile doğrulanmıştır.

Çizelge 6.1 İncir ve Yer fıstığı z-skor değerleri

Matriks	Olmaması		z-skor
	Gereken ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Bulunan ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
İncir			
<i>Aflatoksin B1</i>	16.1	14.65	-0.4
<i>Aflatoksin Toplam</i>	29.3	29.71	0.1
Yerfıstığı			
<i>Aflatoksin B1</i>	4.84	3.32	-1.4
<i>Aflatoksin Toplam</i>	9.43	6.15	-1.6

Bilindiği gibi yayınlanan her metodun her laboratuvar koşulunda benzer sonuçlar vermesi mümkün değildir. Metod uluslararası geçerliliğe sahip olsa bile verdiği sonuçlar temelde uygulandığı laboratuvarın şartlarında geçerlidir. Bu şartlar içerisinde sıcaklık, rakım gibi çevresel şartlar, metodu uygulayan kişi, kullanılan cihazlar, sarf malzemeler ve kimyasallar sayılabilir. Bu şartlar her laboratuvarında farklıdır. Bu yüzden her metodun, uygulandığı laboratuvar şartlarında doğrulanması (valide edilmesi) gerekir. Ancak bu şekilde her laboratuvarında metotdan benzer sonuçlar elde edilebilir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar göstermektedir ki kullandığım metod kendi çalışma ortamında valide edilmiştir ve uluslar arası düzeyde doğru sonuçlar vermiştir.

KAYNAKLAR

Alpderen İhsan, Karaali Artemis,(1990), Moulds and mycotoxins in Turkish foodstuffs Nat-tu-Mycotoxins

AOAC (1984) "Natural posions" (CH.26) in Official Methods of Analaysis (14 th ed.) Washington DC: Association of Official Analitical Chemists.

Anonymous, (1996), Food and Agriculture Organization of United Nations Rome

Armolik , N.and Dickson, J.G (1964) "Minimum humidity requirement for germination of conidia of fungi associated with stroge of grain", *Phytopathology* 46:462-465

Avari,G.P. and Allsopp, D. (1983) "The combined effect of pH, solutes , and water activity (a_w) on the growth of some xerophilic *Aspergillus* species", in Oxley ,T.A and Barry

Ayerst,G.(1969),"The effects of moisture and temparature on growth and spore germination in some fungi",*Lournal of Stored Product Research* 5:127-41

Bacon,C.W.,Sweeny , J.G ,Robbins ,J.D. and Burdick,D. (1973)"Production of penicillic and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ocraceus*:temparature and moisture requirements" *Applied Microbiology* 26:155-60

Beuchat,L.R. and Jhones ,W.K. (1978) "Effect of food preservatives and anti oxidants on colony formation by heated conidia of *Aspergillus flavus*".*Acta Alimentaria* 7:373-84

Beuchat,L.R.(1981 a) "Influence of potassium sorbate and sodium benzoate on heat inactivation of *Aspergillus flavus*,*Penicillium puberulum* and *Geotrichum candidum*" *Journal of Food Protection* 44:450-4

Beuchat,L.R.(1981 b) "Combinned efects of solutes and food preservatives on rates on inactivation of and colony formation by heatde spores and vegetative cells of moulds".*Applied and Environmental Microbiology*

Buchanan ,R.L. and Ayres ,J.C. (1976) "Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NNRL 2999" , *Journal of Foor Science* 41:128-32

Buchen, S.Y. and Marth, E.H. (1976b) "Sporicidal action of hydrogen peroxide on conidia from toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. 2.Effects of pH, sucrose, glucose, and sodium chloride", *Journal of Food Protection* 40: 698

Bullermann, L.B. (1983) "Effects of potassium sorbate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*", *Journal of Food Protection* 46: 940-2.

Bullermann, L.B. (1983) "Effects of potassium sorbate on growth and ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium specirs*", *Journal of Food Protection* 48: 162-5.

Campbell,T.C. (1983) "Mycotoxins "in E.E. Wynder (ed.) *Enviromental Aspects of Cancer : The Role of Macro and Micro Components of Foods* ,Westport ,Connecticut: Food and Nutrition Press:187-98

- Ciegler ,A.(1972) "Bioproduction of ochratoxin A and penicilic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group", Canadian Journal of Microbiology 18:631-6
- Cole,R.J. (1986) "Etiology of turkey "X" disease in retrospect : a case for the involvement of cyclopiazonic acid", Mycotin Research 2:3-7
- Cole,R.J. and Cox ,R.H. (1981) Handbook of Toxic Fungal Metabolites , New York : Academic Press
- Cole,R.J., Hill, R.A., Blankenship, P.D., Sanders, T.H. and Garren, H. (1982) "Influence of irrigation and drought stress on invasion of *Aspergillus flavus* in corn kernels and peanut pods", Developments in Industrial Microbiology 23: 299-326
- Cuero, R.G., Smith, J.E. and Lacey, J. (1987) "Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains", Transactions of the British Mycological Society 89: 221-6.
- Diener, U.L. and Davis, N.D. (1967) "(Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts", Journal of American Oil Chemists Society 44: 259-63.
- Doyle,M.P and Marth ,E.H. (1975 A) "Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* .1. Effects of moist heat, age of conidia , and sporulation medium" ,Journal of Milk and Food Technology 38: 678-82
- Doyle,M.P and Marth ,E.H. (1975 B) "Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* .2. Effects of pH and buffers ,glucose,sucrose and sodium chloride", Journal of Milk and Food Technology 38: 750-8
- Faizur-Rahman , A.T.M. and Idziak, E.S. (1977) "Gamma irradiation-recycling of *Aspergillus flavus* and its effect on radiation resistance and toxin production", Canadian Institute of Food Science and Technology Journal 10: 5-8.
- Farah, Z., Martins, M.J.R. and Bachmann, M.R. (1983) "Removal of aflatoxin in raw unshelled peanuts by a traditional salt boiling process practised in the North East of Brasil", Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie 16: 122-4.
- Frobish, R.A., Bradley, B.D., Wagner, D.D., Long-Bradley, P.E. and Hairston, H. (1986) "Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain", Journal of Food Protection 49: 781-5.
- Fujii, K., Kurata, H., Odashirna, S.and Hatsuda, Y.(1976) "Tumour induction by a single subcutaneous injection of sterigmatocystin in newborn mice", Cancer Research 36: 1615-18.
- Gams, W, Christensen, M., Onions, A.H.S., Pitt, J.I. and Samson, R.A. (1985) "Intragenetic taxa of *Aspergillus*", in Samson, R.A, and Pitt, J.I. (eds.), Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics, New York: Plenum Press: 55-62.

Gonzalez, H.H.L., Resnik, S.L. and Vaamonde, G. (1988) "Influence of temperature on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentina corn", *International Journal of Food Microbiology* 6:179-83

Gourama, H. and Bullermann, L.B. (1988) "Effects of potassium sorbate and natamycin on growth and penicilic acid production by *Aspergillus ochraceus*", *Journal of Food Protection* 51: 139-44.

Griffin, G.J. and Garren, K.H. (1976) "Colonization of rye green pasture and peanut fruits debris by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* group in field soils", *Applied and Environmental Microbiology* 32: 28-32.

Groopman, J.D., Cain, L.G. and Kensler, T.W. (1988) "Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relation to cancer", *CRC Critical Reviews in Toxicology* 19: 113-45.

Hendrickse, R.G., Coulter, J.B.S., Lamplugh, S.M., Macfarlane, S.B.J., Williams, T.E., Omer, M.I.A. and Suliman, G.I. (1982) "Aflatoxins and kwashiorkor: a study in Sudanese children", *British Medical Journal* 285: 843-6.

Hocking, A.D. and Pitt, J.I. (1980) "Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods", *Applied and Environmental Microbiology* 39: 488-92.

Jarvis, B. (1973) "Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in foods", *Journal of Applied Bacteriology* 36: 723-7.

Joffe, A.Z. (1978) "Fusarium poae and F. Sporotrichioides as principal causal agents of alimentary toxic aleukia", in Wyllie, T.D. and Morehouse, I.G. (eds.), *Mycotoxins Fungi, Mycotoxicoses: An Encyclopedic Handbook (Vol.3)*, New York: Marcel Dekker: 21-86.

Journal of AOAC Vol 83. (1999.07)

King, A.D., Hocking, A.D. and Pitt, J.I. (1979) "Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods", *Applied and Environmental Microbiology* 37: 959-64.

King, A.D., Pitt, J.I., Beuchat, L.R. and Corry, J.E.L. (eds), (1986), *Methods for the Mycological Examination of Food*, New York: Plenum Press.

Klich, M.A. and Chmielewski, M.A. (1985) "Nectaries as entry sites for *Aspergillus flavus* in developing cotton balls", *Applied and Environmental Microbiology* 50: 602-4.

Klich, M.A., Thomas, S.H. and Mellon, J.E. (1984) "Field studies on the mode of entry of *Aspergillus flavus* into cotton seeds", *Mycologia* 76: 665-9.

Koehler, P.E., Beuchat, L.R. and Chinnan, M.S. (1985) "Influence of temperature and water activity on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds and meal", *Journal of Food Protection* 48: 1040-3.

- Kozakiewicz, Z. (1989) "*Aspergillus* species on stored products", *Mycological Papers* 161: 1-188.
- Krishnamachari, K.A.V.R., Bhat, R.V., Nagarajan, V. And Tilak, T.B.G, (1975), "Investigations into an outbreak of hepatitis in parts of Western India", *Indian Journal of Medical Research* 63: 1036-48.
- Kume, T., Ito, H., Soedarman, H. And Ishigaki, I. (1989) "Radiosensitivity of toxigenic *Aspergillus* isolated from spices and destruction of aflatoxin by gamma-irradiation", *Radiation Physics and Chemistry* 34: 973-8.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C.W. (1986a) "*Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*", *Antonie van Leeuwenhoek* 53: 147-58.
- Kurtzman, C.P., Smiley, M.J., Robnett, C.J. and Wicklow, D.T. (1986b) "DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group", *Mycologia* 78: 955-9.
- Liewen, M.B. and Marth, E.H. (1984) "Inhibition of *Penicillia* and *Aspergilli* by potassium sorbate", *Journal of Food Protection* 47: 554-6.
- Lillehoj, E.B. and Goransson, B. (1980) "Occurrence of ochratoxin and citrinin-producing fungi on developing Danish barley grain", *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, Sect. B, 88: 133-7.
- Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F., Horner, E.S., Widstrom, N.W., Josephson, L.M., Franz, A.O. and Catalano, E.A. (1980) "Aflatoxin contamination of preharvest corn: role of *Aspergillus flavus* inoculum and insect damage", *Cereal Chemistry* 57: 255-7.
- Luter, L., Yslouzil, W. And Kashyap, S.C. (1982) "The destruction of aflatoxins in peanuts by microwavw roasting", *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 15: 236-8.
- Magan, N. and Lacey J. (1984a) "Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi", *Transactions of the British Mycological Society* 82: 71-81.
- Magan, N. and Lacey J. (1984a) "Effect of gas composition and water activity on growth offield and storage fungi and their interactions", *Transactions of the British Mycological Society* 82: 305-14.
- Mahoney Noreen and Molyneux J. Russell ,(1998), *J. Agric Food Chem.*, "Contamination of Tree Nuts by Aflotoxigenic Fungi : Aflatoxin Content of Closed-Shell Pistachios
- Mann, G.E., Codifer, L.P. and Dollear, F.G. (1967) "Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals", *Agricultural and Food Chemistry* 15: 1090-2.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Tousson, T.A. (1984) *Toxigenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology*, University Park, PA: Pennsylvania State University Press.
- Marsh, S.F. and Payne, G.A. (1984) "Scanning electron microscopy of *Aspergillus flavus* invasion of corn silks, *Phytopathology* 71: 893.

Matossian ,M.K. (1989) *Poisons of the Past.Molds,Epidemics and History* ,New Haven ,Ct: Yale University Press.

McNair, HM., and Bonelli, E.J., (1965), *Basic Gas Chromatography*, Varian Aerograph

Mirocha, C.J., and Christensen ,C.M, (1974), Oestrogenic mycotoxins syththesized by *Fusarium*. In *Mycotoxins* (I.F.H. Purchase,ED.) 129-1448

Mislivec ,P.B.,Dieter,C.T. and Bruce ,V.R. (1975) “Effect of the temparature and relative humidity on spore germination of mycotoxic species of *Aspergillus* and *Pencillium*”,*Mycologia* 67:1187-9

Montani.M.,Vaamonde,G.,Resnik ,S.L. and Beura ,P. .(1988) “Wter activity influence on aflatoxin accumulation in corn” ,*International Journal of Food Microbiology* 6:349-53

Moreau,C.(1979) *Molds ,Toxins and Food* ,Chichester :John Wiley
91:631-7

Moreu.C., (1979), *Moulds , Toxins and food*. 2nd Ed. John Wiley & Sons.London,477s

Nordic committee on food analysis,February 1997,”Control chart and control materials in internal quality control in food chemical laboratories”

Northolt , M.D. , van Egmond ,H.P. AND Paulsch ,W.E. (1977) “Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxin B1 production in relation to water activity and temperature”, *Journal of Food Protection* 40:778-81

Özay Güner 1986 E.Ü.Mühendislik Fakültesi Dergisi Cilt : 4 Sayı: 2 “Antep Fıstıklarında (*pistacia vera*) Aflatoksinler 41-49 s

Özdemir Murat ,Özay Güner, Seyhan Gürtaş Ferda (1998) Hasattan ambalaja fındık işlemenin kritik kontrol noktalarında tehlike analizi

Pitt,J.I. and Christian J.H.B. (1968) “Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes” ,*Applied Microbiology* 16: 1853-8

Pitt,J.I. and Miscamble ,B.F. (1995) “Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species”, *Journal of Food Protection* 58:86-90

Rhine-Diagnostics Technologies Instructions

Aflatoxin Extraction Methods ; Application note for analysis aflatoxins in hazelnuts using Aflaprep

Samarajeewa,U. (1988) “A process for the detoxification of aflatoxins in vegetable oils using solar radiotion2 ,*Chemistry Sri Lanka* 5:26

Stoloff, I. And Trucksess , M.W (1981) “Effect of boiling ,frying, and baking on recovery of aflotoxin from naturally contaminated corn grits or cornmeal” ,*Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 64:678-80

Schatzki F. Thomas and Pan. L. James,1996, J. Agric Food Chem “Distiribution of Aflatoxin in Pistachios. 3. Distribution in Pistachio Process Streams” Vol: 44 1076-1084

Schatzki F. Thomas and Pan. L. James,1997, J. Agric Food Chem “Distiribution of Aflatoxin in Pistachios. 4. Distribution in Small Pistachios “ Vol: 45 205-207

Topal Şeminur .1987. Bazı önemli mikotoksinler ve özellikleri . Gıda 12,(5),283-291

Topal Şeminur. 1995. Gıda Sanayiinde Mikrobiyoloji ve Uygulamaları “Gıdalarda küf ve kontaminasyon riskleri ve önemleri” 174-187s

Topal Şeminur,1996,Gıda Güvenliği ve Kalite Yönetim Sistemleri

Waltking ,A.E. (1971) “Fate of aflotoxins during roasting and storage of contaminated peanut products”, Journal of the Association of Official Analytical Chemists54:533-9

Wilson .D.M. and Jay ,E. (1975) “Influence of modified atmosphere storage of aflatoxin production in high moisture corn”, Applied Microbiology 29:224-8

Wheeler ,K.A.,Hurdman ,B.F, and Pitt ,J.I. (1991)”Influence of pH on the growth of some toxigenic species of Aspergillus ,Penicillium and Fusarium” ,International Journal of Food Microbiology 12:141-50

Wheeler ,K.A.,Hocking ,A.D. and Pitt ,J.I. (1988) “Water relations of some Aspergillus species isolated from dried fish” , Transactions of the British Mycological Society

Ünlütürk Adnan ve Turantaş Fulya 1998 Gıda Mikrobiyolojisi “ Gıdalarda önemli mikroorganizmalar “ 11-45s

Yaşar Hışıl 1999 Enstrümental Gıda Analizleri –I 1-130s

ÖZ GEÇMİŞ

Doğum Tarihi 07.02.1978

Doğum Yeri İstanbul

Lise 1991-1994 Otakçılar Lisesi, İstanbul

Lisans 1994-1998 Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fak.
Kimya Bölümü, İstanbul

Yüksek Lisans 1999-Devam ediyor Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Ens.
Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Prog.

Çalıştığı Kurumlar

1999-Devam ediyor Tübitak Marmara Araştırma Merkezi
GBTAE-MegaLab



**Z.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DÜZENLEME VE YERLEŞTİRME BÜYÜK BÜYÜK**