

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİM-YL-2006-001**

**AYDIN YÖRESİ KURU İNCİRLERİNDE**  
**AFLATOKSİN TAYİNİ**  
**VE**  
**YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**HAZIRLAYAN:**  
**Ali ÖZPALA**

**DANIŞMAN:**  
**Prof. Dr. Mustafa DEMİR**

**AYDIN-2006**

## **ÖZ**

Bu çalışmada Aydın ilinde üretilen incirlerde farklı yöntemler kullanılarak, aflatoksin analizi yapılmış ve yöntemlerin birbirlerine göre zaman, duyarlılık, maliyet, hata olasılığı, analiz aşamasının zorluğu-kolaylığı ve yöntemin incir numunelerine uygulanabilirliği gibi kıstaslar ele alınarak karşılaştırılmaları yapılmıştır.

Homojenize hale getirilen 38 adet incir pastası, HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) , TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) ve Florimetrik Yöntem gibi üç farklı yöntem kullanılarak analiz edilmiş ve yöntemler birbirleriyle kıyaslanmıştır. Bu yöntemler birbirleriyle kıyaslanırken, deney aşaması gerçekleştirilemeyen diğer aflatoksin analiz yöntemlerinden bazıları da (ELISA, RIA, UV lamba kullanımı) teorik olarak ele alınmıştır.

### **ANAHTAR KELİMELER**

Aflatoksinler, İnce Tabaka Kromatografisi, HPLC, Kromatografi, Flüorimetrik Yöntem

### **ABSTRACT**

In this study, aflatoxin analysis were made by various methods on figs produced in Aydın Region. These methods were compared according to their experimental time, sensitivity, cost, error rate, difficulties of analysis level and their applicability on fig samples.

Homogenized 38 fig pastes were analysed by three different methods as HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), TLC (Thin Layer Chromatography) and Fluorimetric Analysis. These methods were compared to each other. Also, some of the methods used to analyse aflatoxin such as ELISA, RIA and UV light usage were approached theoretically.

### **KEY WORDS**

Aflatoxins, Thin Layer Chromatography, HPLC, Fluorimetric Determination, Liquid Chromatography

## İÇİNDEKİLER

ÖZ-ABSTRACT	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
ÇİZELGELER LİSTESİ	VI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	VII
1. GİRİŞ	1
2. İNCİR	7
2.1. Aflatoksin Oluşumu	9
2.2. İncirde Aflatoksin'in İlk Ortaya Çıkışı	10
2.3. Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı	11
2.4. Aflatoksin Analiz Metotları	16
2.4.1. Analiz Öncesi	16
2.4.2. BGYF Metodu	17
2.4.3. Florimetrik Metot	19
2.4.4. İnce Tabaka Kromatografisi Metodu (TLC)	22
2.4.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Metodu (HPLC)	27
2.4.5.1. HPLC Cihazı	29
2.4.5.2. HPLC Metodunda Türevlendirme	33
2.4.6. İmmuno kimyasal Metotlar	38
2.4.6.1. ELISA	38
2.4.6.2. RIA	42
3. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	43
4. MATERYAL VE YÖNTEM	48
4.1. Araştırma Materyali	48
4.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	49
4.3. Kullanılan Yöntemler	51
4.3.1. Florimetrik yöntem ile aflatoksin analizi	51
4.3.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Aflatoksin Analizi	55
4.3.3. HPLC ile Aflatoksin Analizi	58
5. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	72
6. SONUÇLAR	77

ÖZET	83
SUMMARY	84
TEŞEKKÜR	85
EKLER	86
EK 1. CB metodu (AOAC 17th edn , 2000 Official Method 968.22)	
EK 2. BF metodu (AOAC 17th edn , 2000 Official Method 970.45)	
EK 3. ROMER metodu (AOAC 17th edn, 2000 Official Method 975. 36)	
EK 4. Roberts ve Patterson’a ait “Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs using a novel membrane cleanup procedure” adlı yöntemin deney aşamaları	
EK 5. Çizelge 41. Yiyeceklerdeki Aflatoksinler için Kullanılan TLC ve HPLC Metotları	
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	99

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. <i>Aspergillus flavus</i>	1
Şekil 2. Bazı aflatoksin bileşikleri	3
Şekil 3. Ükelere Göre Dünya İncir Üretimi	8
Şekil 4. Ükelere Göre Dünya Kuru İncir Üretimi	8
Şekil 5. Afla B <sub>1</sub> ve B <sub>2</sub> ye ait Biyosentez Şeması	12
Şekil 6. Bazı aflatoksin bileşiklerinin kimyasal yapıları	13
Şekil 7. Afla B <sub>2</sub> ve G <sub>2</sub> için floresans özellik gösterdikleri dalga boyları	15
Şekil 8. Kojik asit	17
Şekil 9. UV Lamba	18
Şekil 10. Bir spektrofiorimetrenin başlıca kısımları	20
Şekil 11. Spektrofiorimetre cihazı	21
Şekil 12. Çözücü buharı ve kromatogram netliği	23
Şekil 13. Kromatografi tankında yürütme işlemi	24
Şekil 14. AlCl <sub>3</sub> çözeltisi püskürtülmüş TLC plakası	25
Şekil 15. HPLC cihazı	29
Şekil 16. HPLC cihazının şematik görünümü	29
Şekil 17. HPLC için bir pistonlu pompa örneği	30
Şekil 18. HPLC analitik kolonu (ODS-3)	31
Şekil 19. İki farklı dalga boyunda aflatoksin analizi	33
Şekil 20. Afla B <sub>1</sub> ' i TFA çözeltisi ile türevlendirme	34
Şekil 21. Afla B <sub>1</sub> ' i iyot çözeltisi ile türevlendirme	35
Şekil 22. Afla B <sub>1</sub> ' i PBPB çözeltisi ile türevlendirme	35
Şekil 23. Afla B <sub>1</sub> -G <sub>1</sub> ve Afla B <sub>2a</sub> -G <sub>2a</sub>	36
Şekil 24. Kobra Cell	37
Şekil 25. Yarışmalı Metot	39
Şekil 26. İndirekt Metot	39
Şekil 27. Microfluor black plate	52
Şekil 28. Florimetrik yöntemde Kalibrasyon Grafiği	52
Şekil 29. Afla B <sub>1</sub> için Kalibrasyon Grafiği (HPLC)	60
Şekil 30. Afla B <sub>2</sub> için Kalibrasyon Grafiği (HPLC)	61
Şekil 31. Afla G <sub>1</sub> için Kalibrasyon Grafiği (HPLC)	62

Şekil 32. Afla G <sub>2</sub> için Kalibrasyon Grafiği (HPLC)	63
Şekil 33. Tween-20 kullanılmış ve kullanılmamış biber tozu ve mısır numunelerinin ince tabaka kromatogramı	75
Şekil 34. Bazık ortamda aflatoksinlerin yapısal bozunması	77
Şekil 35. HPLC ve Florimetrik yöntemlerle ölçülen toplam aflatoksin miktarları	82

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1. Gıda Maddelerindeki Maksimum Mikotoksin Seviyeleri	4
Çizelge 2. AB Ülkelerinde Aflatoksinlere Ait Yürürlükteki Limitler	5
Çizelge 3. Bazı Ülkelerin Aflatoksin Tolerans Sınırları	6
Çizelge 4. Kuru İncirin Besin Değeri İçerikleri	7
Çizelge 5. Dünya Kuru İncir Üretimi	9
Çizelge 6. Aflatoksinlerin yapısal özellikleri	14
Çizelge 7. LC Dedektörlerin Performansı	32
Çizelge 8. Türevlendirme yöntemlerinin kıyaslanması	37
Çizelge 9. Analizlerde kullanılan cihazlar	49
Çizelge 10. Deneyleerde kullanılan kimyasal maddeler	49
Çizelge 11. Spektroflorimetrede Kalibrasyon Değerler Tablosu	52
Çizelge 12. Numunelerde toplam Aflatoksin değerleri (Spektroflorimetre)	53
Çizelge 13. HPLC parametreleri	58
Çizelge 14. Aflatoksin Standartları Hazırlanışı	59
Çizelge 15. Afla B <sub>1</sub> için Kalibrasyon Değerler Tablosu (HPLC)	60
Çizelge 16. Afla B <sub>2</sub> için Kalibrasyon Değerler Tablosu (HPLC)	61
Çizelge 17. Afla G <sub>1</sub> için Kalibrasyon Değerler Tablosu (HPLC)	62
Çizelge 18. Afla G <sub>2</sub> için Kalibrasyon Değerler Tablosu (HPLC)	63
Çizelge 19. Numunelere ait Afla B <sub>1</sub> Değerleri (HPLC)	64
Çizelge 20. Numunelere ait Afla B <sub>2</sub> Değerleri (HPLC)	65
Çizelge 21. Numunelere ait Afla G <sub>1</sub> Değerleri (HPLC)	67
Çizelge 22. Numunelere ait Afla G <sub>2</sub> Değerleri (HPLC)	68
Çizelge 23. Numunelerde toplam Aflatoksin değerleri (HPLC)	70
Çizelge 24. HPLC ve Florimetrik yöntem ile ölçülen toplam Aflatoksin değerleri	80
Çizelge 25. Yiyeceklerdeki Aflatoksinler için Kullanılan TLC ve HPLC Metotları	89

**SEMBOLLER VE KISALTMALAR**

$\mu$ l	mikrolitre
nm	nanometre
ppb	ng/ml
Afla	Aflatoksin
Ast	Aseton
ACN	Asetonitril
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AVF	Averufin
AVN	Averantin
AVNN	Averufanin
aw	Su aktivitesi
BF	Best Food metodu
BGYF	Parlak yeşilimsi sarı floresans
But	Bütanol
CB	Contaminant Branch metodu
CPA	Siklopiazonik asit
DHOMST	Dihidro-O-metilsterigmatosistin
DHST	Dihidrosterigmatosistin
DMDHST	Dimetildihidrosterigmatosistin
DMST	Dimetilsterigmatosistin
Diet	Dietileter
Diklom	Diklormetan
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Em	Salınım
EMAN	European Mycotoxin Awareness Network
EtOH	Etanol
Ex	Uyarılma
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FGIS	ABD Tahıl Kontrol Servisi
HAVN	5-hidroksiaverantin
HCl	Hidroklorik asit



## VIII

HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	Yüksek Basınçlı İnce Tabaka Kromatografisi
IAC	İmuno Affinite Kolonu
IR	Kızılötesi
İzop	İzopropanol
Klo	Kloroform
MeOH	Metanol
NA	Norsolorinik asit
OMST	O-metil sterigmatosistin
PBS	Fosfat bazlı tampon çözelti
PTFE	Politetrafloretillen
PBPB	Pridinyumbromürperbromür
RIA	Radio Immuno Assay
Sheg	Siklohegzan
SPE	Katıfaz Ekstraksiyon Kolonu
ST	Sterigmatosistin
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
TFA	Triflorasetik asit
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TKB	Türkiye Kalkınma Bankası
TZOB	Türkiye Ziraat Odaları Birliği
VAL	Versikonol
VER A	Versikolorin A
VER B	Versikolorin B
VHA	Versikonol hemiasetal asetat
UV	Ultraviyole

## 1. GİRİŞ

Günümüzde gıda maddelerinde adını en fazla duyduğumuz ve sağlığımızı tehdit eden etmenlerden biri olan aflatoksinler, ,“*aspergillus flavus link ex fries*” ve “*aspergillus parasiticus speare*” mantar türüne ait bazı ırkların oluşturduğu mikotoksinlerdir. Mikotoksin, fungus (mantar) anlamındaki Yunanca “mykes” sözcüğü ile Latince’de zehirin karşıtı olan “toxicum” sözcüklerinden oluşan ve bugün belirli mantarların bazı ırklarınca oluşturulan, insan ve hayvanlarca tüketildiğinde ölümlere neden olan bir grup zehirli bileşiği tanımlayan bir terimdir. Şekil 1’de *A.flavus* mantar türünün fotoğrafı verilmiştir.



Şekil 1. *Aspergillus flavus*

Aflatoksinler ilk olarak İngiltere’de 1960 yılında meydana gelen salgın sonucunda fark edilmiştir. Bu olayda yemlerinde yer fıstığı küspesi bulunan yüz binden fazla hindi palazı birkaç ay içinde ölmüş ve sebebi bilinmediği için bu hastalığa “x hastalığı” ( turkey X disease) denilmiştir (Goldblatt and Amer, 1971).

O yıllarda bu olaydan aflatoksin denilen toksik metabolitler (Afla  $B_1, B_2, G_1$  ve  $G_2$ ) sorumlu tutulmuş, ancak son yıllarda 1960’taki bu zehirlenmelerin başlıca nedeninin *Aspergillus flavus*’un ürettiği siklopiazonik asit (CPA) olduğu anlaşılmıştır (Stroka and Anklam, 2000).

Yine bu tarihlerde İngiltere’de on dört bin ördek ve beş bin sülün yavrusu ve Doğu Afrika’nın bazı çiftliklerinde ördek yavruları aynı hastalık belirtileri ile ölmüştür. Bu olaylar üzerine araştırmalar yoğunlaştırılmış ve nedeni bilinmeyen bu hastalığın hayvanların yemlerinde bulunan ve *A.flavus* küf türü tarafından oluşturulan bir mikotoksinde ileri geldiği anlaşılmıştır ve bu küfün ismine ithafen, bulunan mikotoksine, “aflatoksin” adı verilmiştir. Daha sonraları *A.parasiticus*’unda aflatoksin ürettiği tespit edilmiştir.

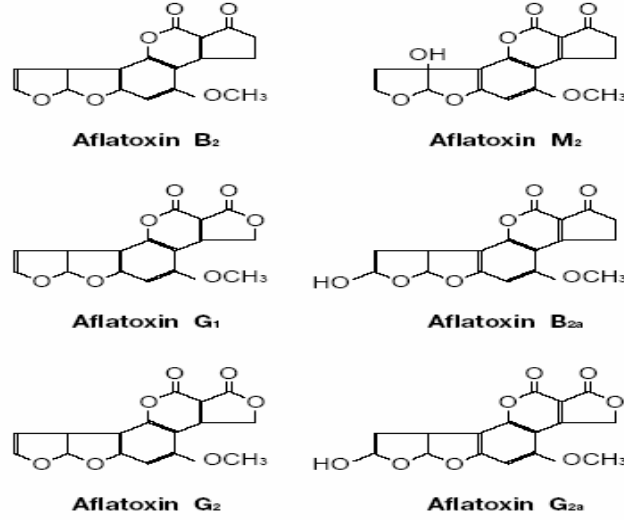
*A.flavus*'un birçok ırkı aflatoksin meydana getirmediği halde yaygın olarak bulunması ve karbonhidratça zengin substratlar üzerinde çok geniş sıcaklık sınırları içinde gelişebilmesi, doğada aflatoksin oluşumunu teşvik edici öğelerdir. Arpa, fasulye, mısır, pamuk tohumu, pirinç, buğday, yer fıstığı,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

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

Laboratuar koşullarında aflatoksin oluşumu, havalanma, atmosfer bileşimi, sıcaklık, ürünün su miktarı ve hava neminden etkilenmektedir. Magnezyum, molibden, demir ve çinko aflatoksin oluşumu için gerekli mineral maddeleri olarak dikkati çekmektedir. Ortamdan magnezyum veya çinkonun uzaklaştırılması ile aflatoksin oluşumu durmaktadır (Çelik, 2001).

Aflatoksinler ultraviyole ışık altında ışımaya yaptıkları renge göre isimlendirilmekte ve mavi ışımaya yapanlar B, yeşilimsi mavi ışımaya yapanlar da G ile gösterilmektedir. Daha çok sayıda aflatoksin olmasına rağmen en önemlileri B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2n</sub>, G<sub>2n</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, GM<sub>1</sub>, GM<sub>2</sub>, M<sub>2n</sub>, GM<sub>2n</sub>, P<sub>1</sub>, aflatoksikol ve dihidroaflatoksikol'dur.

Bunlar içinde ilk dördü ( B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> ) diğerlerine göre çok daha yaygın bulunur. B<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>), B<sub>1</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) in; G<sub>2</sub> (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>) ise G<sub>1</sub> (C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>) in dihidro türevidir. M grubu aflatoksinler ise ilk olarak sütte belirlenmiş olmaları nedeni ile M ile isimlendirilmişlerdir. Ancak sütten başka, vücutta safra salgısında, idrarda da saptanmıştır. Aflatoksin M'lerin ortak özelliği, hidroksil grubunun son furan halkasında C-2 pozisyonunda olmayıp C-4 pozisyonunda olmasıdır. Görüldüğü gibi, aflatoksinlerin temel yapıları benzemekle birlikte bileşimlerindeki küçük farklılıklar toksisiteleri üzerinde etkili olabilmektedir. Şekil 2'de bazı aflatoksin bileşiklerinin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2. Bazı aflatoksin bileşikleri

Ülkemiz açısından aflatoksin sorunu, 1960'lı yıllarda gündeme gelmiştir. Aflatoksin sorunu 1967 yılında Kanada'ya gönderilen 10 ton iç fındığın, 1971 yılında da ABD'ye ihraç edilen 45 parti antepfıstığının 31 partisinin, aflatoksin içerdiği gerekçesiyle geri çevrilmesi sonucu ortaya çıkmıştır (Akpınar, 2003).

Yapılan çalışmalar sonucunda birçok ülkede olduğu gibi Türkiye'de de gıdalardaki aflatoksin miktarlarını belli bir düzeye çekebilmek için sınır değerler kabul edilmiştir. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, 16.11.1997 tarihinde, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde, bazı gıdalar için sınır değerleri tespit etmiştir.

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nca 560 sayılı Gıdaların Üretimi Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararname gereğince hazırlanan, 16 Temmuz 1997 tarih ve 23172 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan, gıda maddelerinin asgari hijyen ve kalite kriterleri, katkı maddeleri, bulaşanlar, pestisit kalıntıları, gıda aroma maddeleri, numune alma, ambalajlama, etiketleme, nakliye, depolama esasları ve analiz metotlarını ihtiva eden Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne istinaden hazırlanan, ***Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ*** e göre, gıdalarda bulunabilecek mikrobiyal toksinler ve kabul edilebilir değerleri çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Gıda Maddelerindeki Maksimum Mikotoksin Seviyeleri (TGK 2002/63)

Gıda Maddesi	Maksimum Seviye (ppb= $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
	Aflatoksin			Okratoksin A	Patulin
	B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>		
Fındık, yer fıstığı ve diğer yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, incir, üzüm ve kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5	10			
Tahıllar ve tahıl ürünleri	2	4			
Süt			0.05		
Süt tozu			0.5		
Peynir			0.25		
Bebek mamaları ve devam formülleri (süt bazlı)			0.05		
Bebek mamaları ve bebek gıdaları	1	2			
Baharat	5	10			
Diğer gıda maddeleri *	5	10			
İşlenmemiş tahıl taneleri (çeltik ve karabuğday dahil)				5	
Tahıllardan elde edilen bütün ürünler (tahıl bazlı işlenmiş ürünler ve doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl taneleri)				3	
Kuru üzüm				10	
Elma suyu ve elma suyu içeren içecekler ve sirkeler **					50

\* Bulunması muhtemel riskli gıdalar

\*\* Konsantr ürünlerde tarifine uygun hazırlama sonucundaki üründe bakılır.

Türkiye’de 2002 yılında yayınlanan TGK’da, gıdalardaki aflatoksin miktarları için uygulanan bu limit değerler, son yıllarda mümkün olduğu kadar, Avrupa Birliği ülkelerinde uygulanan limitlere uygun hale getirilmeye çalışılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. AB Ülkelerinde Aflatoksinlere Ait Yürürlükteki Limitler (Akpınar, 2003 )

Aflatoksin	Tipi	Gıda Maddesi	Kabul Edilebilir En Yüksek Değer (ppb= µg/kg)
B <sub>1</sub>	M	Baharat	5
B <sub>1</sub>	M	Tahıl ve tahıl ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya bir gıda maddesinin üretiminde bileşen olarak kullanılan)	2
B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	M	Tahıl ve tahıl ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya bir gıda maddesinin üretiminde bileşen olarak kullanılan)	4
B <sub>1</sub>	M	Tüm gıda maddeleri (diğer)*	5
B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	M	Tüm gıda maddeleri (diğer)*	10
B <sub>1</sub>	M	Bebek mamaları ve bebek gıdaları	1
B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	M	Bebek mamaları ve bebek gıdaları	2
B <sub>1</sub>	M	Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya benzeri fiziksel işlemler görececek olan yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar ve kurutulmuş meyveler	5
B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	M	Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya benzeri fiziksel işlemler görececek olan yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar ve kurutulmuş meyveler	10
B <sub>1</sub>	M	Doğrudan tüketime sunulacak veya bir gıda maddesinin üretiminde bileşen olarak kullanılacak yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	2
B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	M	Doğrudan tüketime sunulacak veya bir gıda maddesinin üretiminde bileşen olarak kullanılacak yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	4
M <sub>1</sub>	M	Peynir	0.25
M <sub>1</sub>	M	Süt, Bebek mamaları ve devam formülleri	0.05
M <sub>1</sub>	M	Süt tozu	0.5

\* : Bulunması muhtemel gıdalar

Türkiye dışındaki ülkelerde gıdalarda bulunan aflatoksine karşı kabul edilebilir değerler çizelge 3’de sıralanmıştır.

Çizelge 3. Bazı Ülkelerin Aflatoksin Tolerans Sınırları (Çelik, 2001)

ÜLKELER	ARANILAN GIDA	TOLERANS SINIRI (ng/kg)	
		B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>
Avustralya	tüm yiyecekler fıstık, fıstıklı ürünler		5 15
Avusturya	tüm yemler	1	5
Belçika	tüm yiyecekler	5	
Kanada	fındık, fındıklı ürünler		5
Danimarka	yerfıstığı, fıstıklı ürünler, fındık	10	
Almanya	fıstık, fıstıklı ürünler, fındık, kayısı, şeftali çekirdeği, haşhaş, susam	2,5	4
Finlandiya	badem, fındık, fındıklı ürünler	5 ng/g	
Fransa	tüm yiyecekler, bebek besinleri	10 5	
İrlanda	yiyecek	5	30
İtalya	fıstık	50 ng/g	
Japonya	tüm yiyecekler	50 ng/g	
Hollanda	fıstık, fıstıklı ürünler	5	
Norveç	fıstık, Brezilya fındığı		5
Portekiz	fıstık	0	30
İsveç	tüm yiyecekler, fıstık, fındık	5	
İsviçre	Badem, bademli yiyecekler, Fıstık, fıstıklı ürünler, fındık, fındıklı ürünler, kayısı, şeftali çekirdeği, haşhaş, susam	1	5
ABD	Tüm yiyecekler, yemler		20
Yugoslavya	Buğday, mısır, pirinç, arpa, diğer tahıllar Baklagiller, bezelye, fındık, ceviz, kahve, çay		1(G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> ) 5(G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> )

Çizelge 3’de görüldüğü gibi tüm ülkelerin sınır değerlerinde farklılıklar bulunmaktadır. Bu ülkelerin bir kısmı sınır değerleri tüm gıdalar için verirken, bir kısmı da gıdaları gruplandırarak sınır değerleri belirlemiştir. Sınır değerleri en düşük ülkelerin başında Almanya, Avusturya, İsviçre gelmektedir.

## 2. İNCİR

İncir meyvesi, Anadolu’da insanlık tarihi kadar eski devrelere dayanan kültür meyveleri içinde, en eski gelişme tarihine sahip meyvelerden biridir. İncirin anavatanı Türkiye olup, buradan Suriye, Filistin ve daha sonra da Ortadoğu üzerinden Çin ve Hindistan'a yayılmıştır. İncirin özel dölllenme ve kendine özgü kurutma şartları isteyen bir meyve olması yetiştiği bölgeleri sınırlı kılmaktadır.

İncir, her ne kadar subtropik bir meyve olsa da geniş ekolojik uyum kabiliyeti nedeniyle yurdumuzun tüm sahil kuşağında ticari olarak yetiştirilmekte olup, kuru ve taze incir üretim amacı ile Büyük ve Küçük Menderes havzalarında belirgin bir yoğunlaşma görülmektedir.

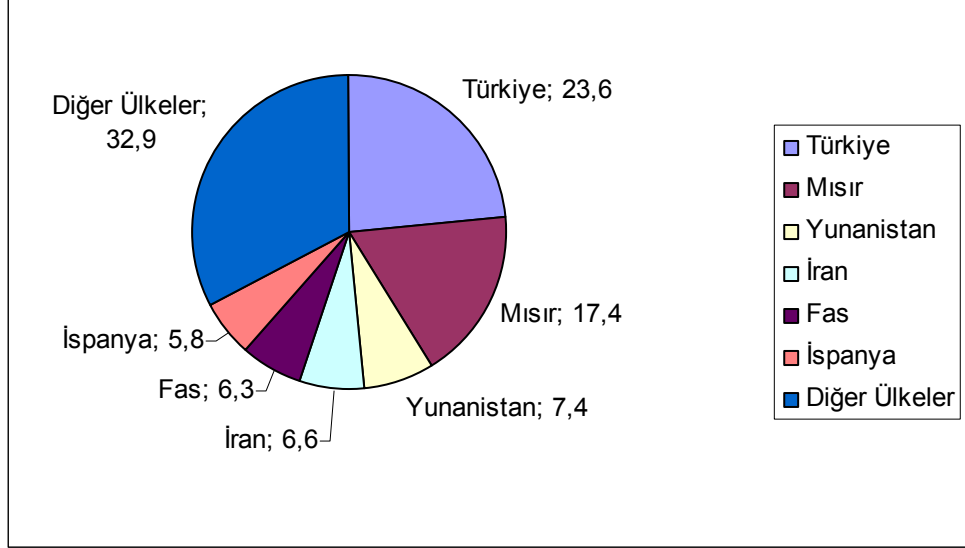
İnsan sağlığı açısından, yüksek kalori değeri, içerdiği mineral maddeler ve besin maddeleri ile özel bir yere sahip olan kuru incirin, 100 gramında 217 (kcal)’lik enerji, 138 mg kalsiyum, 163 mg fosfor, 4,2 mg demir, 91,5 mg magnezyum, 0,073 mg B<sub>1</sub> ve 0,072 mg B<sub>2</sub> vitamini bulunmaktadır (Çizelge 4).

Çizelge 4. Kuru İncirin Besin Değeri İçerikleri ([www.tzob.org.tr](http://www.tzob.org.tr))

<b>Enerji (kcal)</b>	217
<b>P rotein (gr)</b>	4
<b>Şeker (gr)</b>	55.3
<b>Yağ (gr)</b>	1.2
<b>Diyet Lifi (gr)</b>	6.7
<b>Kalsiyum (mg)</b>	138
<b>Fosfor (mg)</b>	163
<b>Demir (mg)</b>	4.2
<b>Magnezyum (mg)</b>	91.5
<b>Vitamin B1 (mg)</b>	0.073
<b>Vitamin B2 (mg)</b>	0.072

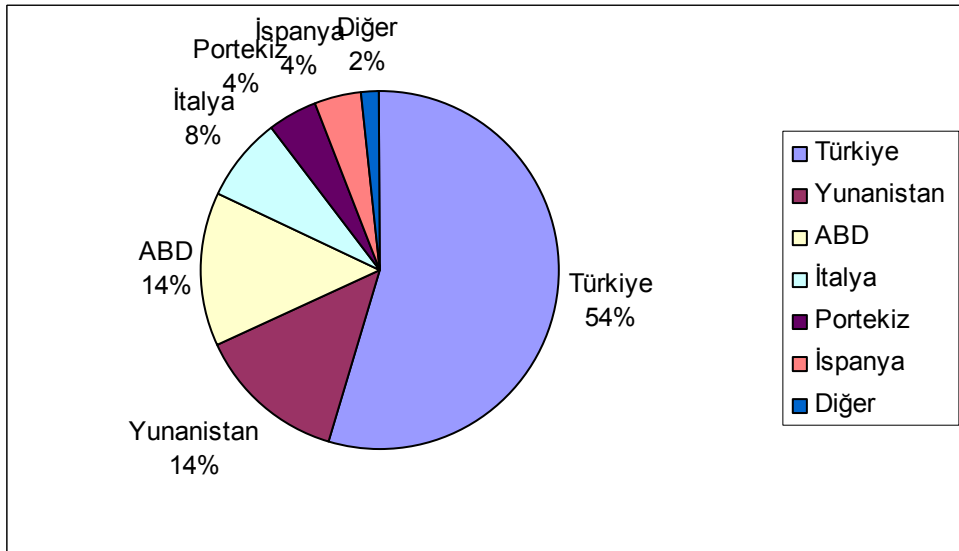


FAO (Food and Agriculture Organization) verilerine göre, 2002 yılı itibarıyla, dünyada 419 bin hektar alanda incir üretimi yapılmakta olup, elde edilen incir miktarı ise 1,1 milyon tondur. Ülkemiz, dünya incir üretiminden aldığı, % 23,6'lık payla ilk sırada yer almaktadır.



Şekil 3. Ülkelere Göre Dünya İncir Üretimi (%) (TZOB)

Dünyada kuru incir üretiminde Türkiye % 54 lük payla ilk sırada yer almaktadır.



Şekil 4. Ülkelere Göre Dünya Kuru İncir Üretimi (TZOB)

Çizelge 5. Dünya Kuru İncir Üretimi(Ton) (TKB, 2000)

Ülkeler	1998	1999	2000
Türkiye	50.981	52.684	49.001
Yunanistan	12.250	12.400	12.500
ABD	12.400	12.650	12.500
İtalya	7.200	6.475	7.000
Portekiz	4.200	4.200	4.000
İspanya	3.600	3.500	3.700
Diğer	1.300	1.450	1.500
Dünya	91.931	93.539	90.201

Şekil 3, Şekil 4 ve Çizelge 6'dan anlaşılacağı gibi, incir ülkemiz ekonomisi açısından önemli bir gelir kaynağıdır. İncirin son yıllardaki en önemli sorunu aflatoksin oluşumudur. İhracatta aflatoksin düzeyinin yüksek olması, Türkiye için büyük maddi zarar, insan sağlığı açısından da büyük bir tehlikedir.

## 2.1. Aflatoksin Oluşumu:

Mantarlar, enerji ihtiyaçları ve makro-moleküllerini ( protein, DNA gibi ) sentezlemek için çeşitli besin elementlerine gereksinim duyarlar:

- Karbonhidratları sentezleyemedikleri için ortamda karbonhidrat bulunmalıdır. Ancak, proteince zengin ortamlarda, karbon kaynağı olarak amino asitleri de kullanabilirler.
- Organik azot bileşikleri, bütün mantarlar tarafından kullanılır, inorganik bileşikleri ise az sayıda mantar kullanabilir.
- Ortamda belirli vitaminler bulunmalıdır. Bir kısmı ise türlere bağlı olarak sentezlenebilir.

Hemen bütün gıdalar bu besin elementlerini içermektedir. Bu nedenle de mantar gelişimine uygundur.

Burada yaygın bir yanlışın düzeltilmesi için önemli bir bilginin verilmesi yerinde olacaktır. Gıda maddesine, toksin üreten mantarın bulaşması toksin oluşumu için yeterli değildir. Yani gıda maddesinde mantara rastlandığında mutlaka toksin vardır demek yanlıştır.

Mantarın varlığının yanında, mantarın gelişmesi ve mikotoksin üretebilmesi için uygun koşullarında bulunması gerekir. Bu koşullar: O<sub>2</sub>, sıcaklık ve su aktivitesidir.

*O<sub>2</sub> (Oksijen)* : Toksin üreten mantarların hepsi aerobiktir. Bu nedenle yeterince oksijen bulunmayan ortamlarda küf gelişemez ve toksin oluşamaz. Yapılan çalışmalarda ortamda CO<sub>2</sub> oranı % 15'e çıkartıldığında küf gelişmesi artmakta ancak bunun üzerinde önlenmektedir.

*Sıcaklık* : Mantarların sıcaklık aralığı çok değişkendir. Bazı türler 0°C sıcaklıkta gelişebilirken, bazıları için minimum sıcaklık 10°C olmalıdır. *Aspergillus flavus*'un optimum gelişme sıcaklığı 25°-35°C, min. 12°C ve max. 43°C dir.

*Su Aktivitesi* : Mikotoksin oluşumunu önlemek yönünden ele alındığında belki de en önemli etmendir. Su aktivitesi, mikroorganizmaların yararlanabileceği suyun ifadesidir. Gıdanın nemi, bu açıdan çok önemli değildir. Çünkü % 90 ların üzerinde nem içeren reçel, turşu gibi gıdalarda küflerin gelişmemesi ancak bu gıdalardaki su aktivitesinin düşüklüğü ile açıklanabilir.

Mantarlar, bakterilere göre daha düşük nem ve su aktivitesinde gelişebildiklerinden kurutularak muhafaza edilen gıdalarda bozulma daha çok mantarlar tarafından oluşur.

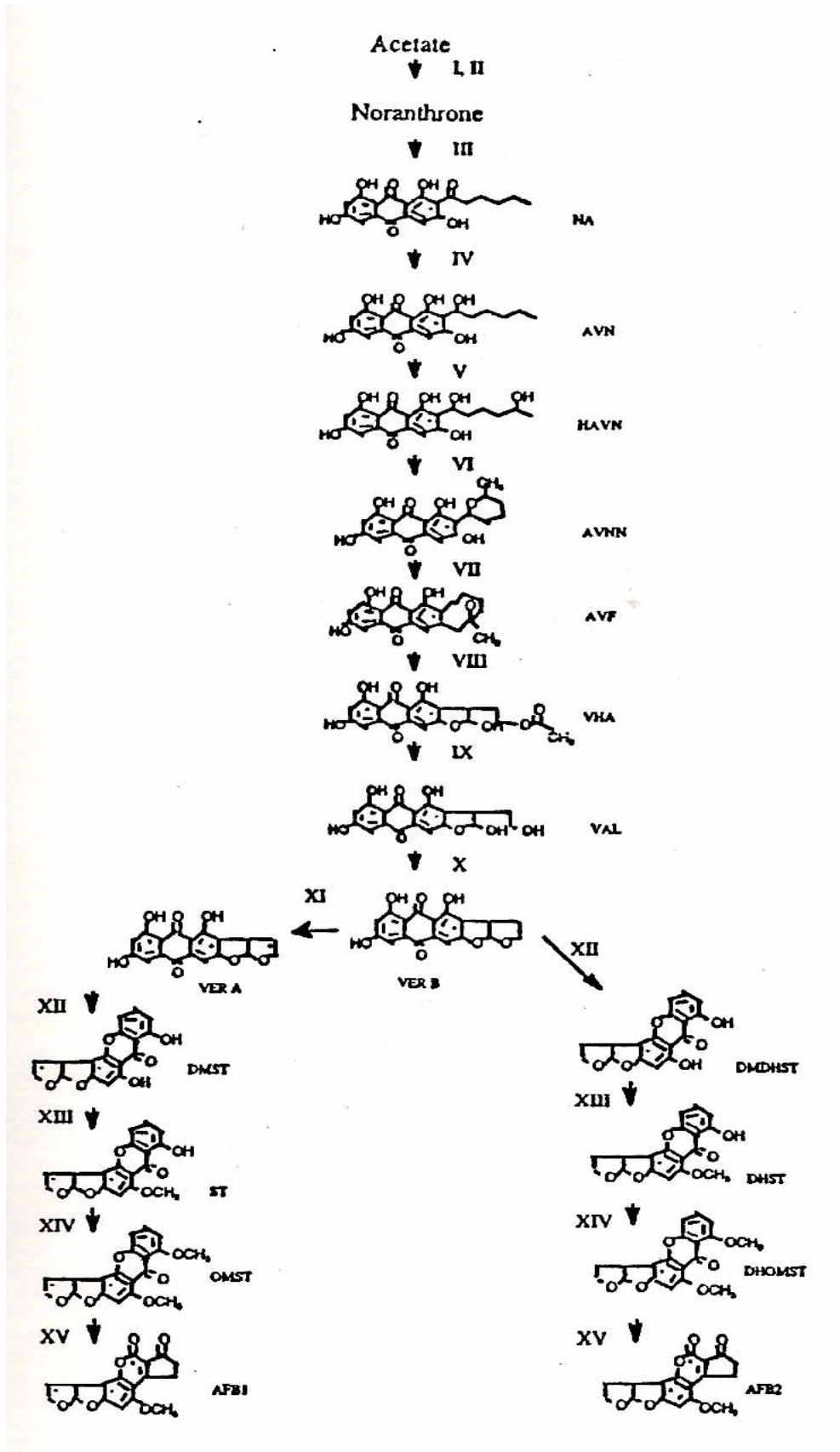
## **2.2. İncirde Aflatoksinin İlk Ortaya Çıkışı :**

Bu sorun ilk kez 1972 yılında Danimarka'ya ihraç edilen Türk kuru incirlerinde yüksek miktarda (938 ppb) aflatoksin saptanması ile başlamış, ancak ilgili ülke tarafından söz konusu incirlerin, Noel nedeniyle tüketilmiş olmalarından dolayı iade edilmedikleri ve Türkiye'den ihraç edilecek incirlerde aflatoksin kontrolü yapılması gerektiği belirtilmiştir (Stroka, 2000).

1973-74 yıllarında ABD'ye gönderilen kuru incirlerde, Gıda ve İlaç örgütü (FDA) tarafından yapılan taramada 38 partinin 3 partisinde aflatoksin saptanmış ve bu partiler geri gönderilmiştir. 1986 yılında ise İsviçre'ye gönderilen 1985 yılı kuru incirlerde, sözkonusu ülke tarafından tolerans sınırlarının üzerinde aflatoksin belirlendiğinin bildirilmesi ile konu yeniden güncellik kazanmıştır (Gül, 1992). İncirlerde aflatoksin sorununun varlığının 1973-74 yıllarında çıkması ile birlikte aflatoksin oluşumunun hangi aşamalarda yoğunlaştığı konusu üzerinde çalışmalar başlamıştır.

### **2.3. Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı :**

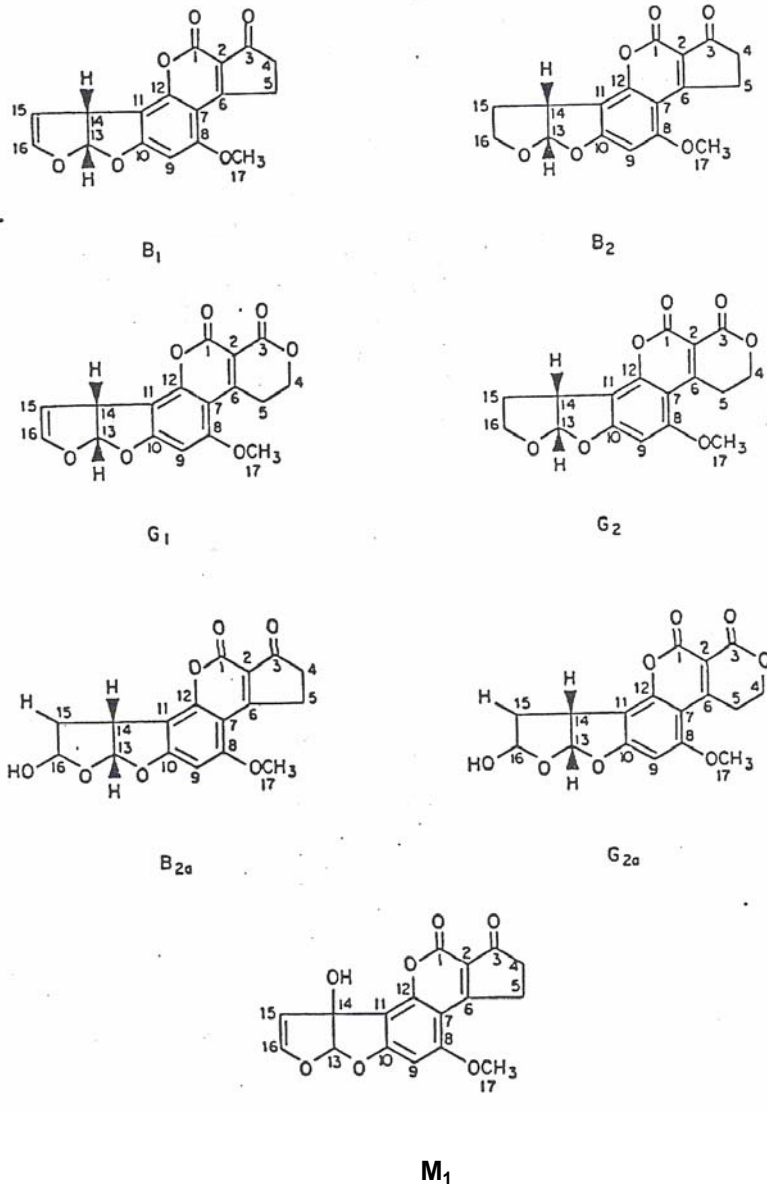
Aflatoksinlerin kimyasal yapılarının aydınlatılması amacıyla yapılan çalışmalarda, bu maddelerin bifuran halkasına sahip heterosiklik bileşikler olduğu belirlenmiştir. Aflatoksinlerin biyosentez basamakları şu şekildedir: norsolorinik asit-averufin-versikonalasetat-versikolorinA-sterigmatosistin-Afla B<sub>1</sub>-Afla B<sub>2</sub>.



Şekil 5. Afla B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> ye ait Biyosentez Şeması (Çelik, 2001)

Aflatoksinler kimyasal yapılarına göre iki ana grupta toplanırlar. Birinci gruptaki bileşikler difurankumarinsiklopentanon yapısında olup, bu grup içinde B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>2a</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>2a</sub> ve Aflatoksikol bulunmaktadır.

İkinci gruptaki bileşikler difuranokumarinlakton yapısında olup bu grup içinde ise G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>2a</sub>, GM<sub>1</sub>, GM<sub>2</sub>, GM<sub>2a</sub>, B<sub>3</sub> komponentlerini içermektedir. Bu bileşikler içinde B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ye gıdalarda daha sık rastlanmaktadır. M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> bileşikleri ise B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> nin sütteki hidroksil formları olarak belirlenmiştir. Şekil 6 da bazı aflatoksin bileşiklerinin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 6. Bazı aflatoksin bileşiklerinin kimyasal yapıları

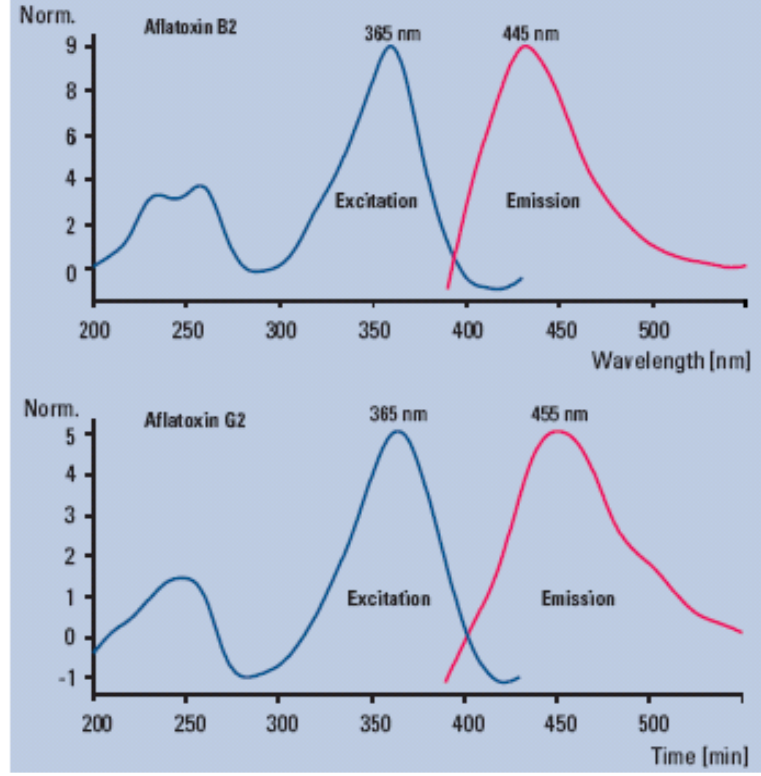
Aflatoksinler ısıya karşı dayanıklı bileşiklerdir. Bu yüzden pastörizasyon veya pişirme gibi yöntemlerle yapıları bozulmaz. Erime noktaları ve molekül ağırlıkları UV absorpsiyonları gibi bilgiler çizelge 7’de verilmiştir.

Çizelge 6. Aflatoksinlerin yapısal özellikleri (EMAN)

Aflatoksin	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Erime Noktası	UV Absorpsiyonu (metanol)	
				265 nm	360-362 nm
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269	12.400	21.800
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289	12,100	24,000
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244 -246	9,600	17,700
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240	8,200	17,100
M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299	14,150	21,250
M <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	293	12,100	22,900

B grubu aflatoksinler ile G grubu aflatoksinler, floresans dedektörde hemen hemen aynı dalga boylarında pik verirler. İki grubun da uyarıldıkları dalga boyu (ex. wavelenght) 365 nm dir. Ancak yayınım yaptıkları dalga boyu (em. wavelenght) farklıdır. Afla B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub>, yaklaşık 445 nm de ışın yayınımlı yaparken, Afla G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> yaklaşık 455 nm de yayınımlı yapmaktadır.

Şekil 7, metanolde çözülen referans standartları kullanılarak Afla B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub> için tespit edilen uyarılma ve yayınım dalga boylarını göstermektedir.



Şekil 7. Afla B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub> için floresans özellik gösterdikleri dalga boyları (Schuster et al, 2000)



## 2.4. Aflatoksin Analiz Metotları

Aflatoksinin incirde ilk tespit edildiği 1960'lı yıllardan bu yana çeşitli tayin metotları üzerinde çalışılmış ve geliştirilmiştir. Bu metotlardan bazıları: İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) , Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Florimetri, ELISA (EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay) ve RIA (RadioImmunoAssay)' dir.

Bu yöntemlerden aflatoksin tayini için en çok kullanılanları TLC ve HPLC' dir. TLC HPLC ye göre daha ucuz ve daha basittir. Ancak çok küçük miktarlarda güvenilir olmaması (2ng/g'ın altında), kullanılan kimyasalların ekolojik dengeye zararlı olması ve HPLC' ye göre analizin uzun zamanda yapılması dezavantajlarıdır (Stroka, 2000).

HPLC ise, ekipman açısından çok pahalı bir metot olmasına rağmen, analizi kısa sürede gerçekleştirmesi, hata payının TLC ye göre daha düşük olması ve dedeksiyon limitinin TLC ye göre daha hassas olması açısından tercih edilen bir yöntemdir.

ELISA ve RIA, immunokimyasal yöntemlerdir. ELISA, antikor moleküllerini bağlamak için test çözeltisindeki işaretlenmemiş aflatoksin ile, tayin için kullanılan işaretlenmiş aflatoksinler arasındaki yarışa dayanır. ELISA yöntemi, diğer yöntemlere göre daha basit, hızlı ve kolaydır.

RIA da, aynı ELISA gibi uygulanır. Ancak işaretleme işleminde radyoaktif bir izotop kullanılır. Genellikle kullanılan izotop <sup>125</sup>I'dır. RIA yönteminin en büyük problemi, işlem sonunda açığa çıkan atıkların radyoaktif özellikte olmasıdır. Bu yüzden pek tercih edilmez.

Bu metotları tek tek incelemeden önce, analizi yapılacak numunelerle ilgili, analiz öncesi yapılması gereken bazı işlemleri incelemek gerekmektedir.

### 2.4.1 Analiz öncesi

**Numunelerin taşınması ve muhafazası :** Numunede meydana gelebilecek küf ve teşekkül edecek toksin, numunenin partiyi temsil etme niteliğini ortadan kaldıracığından, numunenin analize kadar geçen bekleme süresi mümkün olduğu kadar kısa olmalıdır. Ürün kuru olmadığı sürece plastik torbaya konulmamalı, kağıt veya bez torba tercih edilmelidir.

Yaş numuneler ya hemen kurutulmalı veya 5°C de saklanmalıdır. Yeterli bir kurutma, etüvde 90°C de 3 saat tutmakla yapılabilir.

**Numunelerin deneye hazırlanması :** Numunenin tamamı göz açıklığı 0,85 mm olan süzgeçten geçecek şekilde öğütülür ve uygun karıştırıcılar ile homojen hale getirilir.

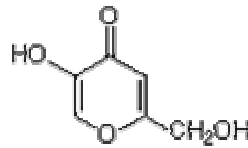
**Kaplar :** Aflatoksinle temas eden bütün kaplar sırası ile, seyreltik asit, su ve asetonla yıkanmalı ve kurutulmalıdır. Bu işlem şöyle yapılır:

Toksin ile bulaşmış cam malzemeler % 5'lik hipoklorit çözeltisi içinde 30 dk bekletilir, daha sonra % 5'lik metanol çözeltisinde 30 dk bekletilir. Hipoklorit kalıntısı kalmayacak şekilde bol su ile durulanır (Usta, 2003).

Ayrıca, stok veya uygulama standartları alüminyum kağıda sarılı olarak 0°C de muhafaza edilmelidir. Bu standartlar kullanıldığı zaman oda sıcaklığına gelene kadar beklenmelidir. Böylece yoğunlaşma yoluyla standardın içine rutubet girmesi önlenmelidir. Bu şartlarda standart çözeltiler en az bir yıl dayanır.

#### 2.4.2 BGYF (Bright Greenish-Yellow Florescence) metodu

BGYF metodu, uzun-dalga ultraviyole ışık altında (365 nm) kojik asitin varlığı gözlenerek yapılan bir testtir. Çünkü kojik asit (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>), *A.flavus* ya da *A.parasiticus* tarafından üretilir.



Şekil 8. Kojik asit (2-hidroksimetil 5 hidroksi-4-piron)

Bu metodu ilk Steiner ve ark. 1988 yılında uygulamışlardır. İncirde karşılaşılan aflatoksin problemine çözüm aramak amacıyla yapılan bir çalışmada, kuru incirlerde aflatoksin kirliliği ile BGY (Mavi, Yeşilimsi, Sarı) floresans gösterme özelliği arasındaki ilişki incelenmiştir.

BGYF metodunda önce numune UV 365 nm uzun dalga boylu ışık altında incelenir ve yeşilimsi sarı renk verenler belirlenir. Daha sonra numune, ağırlığının 0.6 misli su ile havanda ezilir ve ekstraksiyon için metanol, asetonitril gibi uygun çözümlerle Waring blender da 3 dk karıştırılır. Ölçüm aşamasında da, UV spektrofotometresi ya da spektroflorimetre cihazları kullanılır.

Bu şekilde yapılan ilk çalışmada, BGY floresansı ile aflatoksin varlığı arasında kalitatif bir ilişki bulunduğunu, ancak floresans şiddeti ile aflatoksin miktarı arasında bir ilişki olmadığını belirlemişlerdir. Çalışmada ayrıca BGY floresansı gösteren incirlerin yığından uzaklaştırılması ile 56 kg'lık numunedeki aflatoksin B<sub>1</sub> düzeyinin 22.6 ppb'den 6.3 ppb'ye düşürüldüğü de bildirilmiştir. Söz konusu araştırmacılar ayrıca, BGY floresanslı incirlerin UV lamba altında ayıklanması ile yığının tamamıyla temiz kabul edilebilme olasılığının bulunabileceğini de belirtmişlerdir (Çelik, 2001).

UV lambanın fonksiyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, UV altında sarı-yeşil floresans veren 92 adet kuru incir örneğinden 54 tanesinde aflatoksin varlığı saptanamamış, floresans vermeyen 74 adet incirden 1 tanesinde aflatoksin gözlenmiştir. Buna göre UV lambanın işletmelerde fonksiyonel olarak kullanılmasının yararlı olacağı belirtilmiştir (Konca ve Gülseri, 1990).

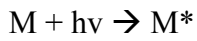
İzmir İl Kontrol Laboratuvarı'nın yaptığı başka bir çalışmada, UV ışık altında sarı-yeşil floresans veren numunelerin % 58.7'sinde aflatoksin saptanamamıştır. Işıma vermeyen numunelerden % 1.56'sında ise aflatoksin belirlenmiştir. Bu bulgulara göre UV lamba kullanımı aflatoksinli incirleri ayırmada fonksiyoneldir ve işletme girişlerinde kullanılması zorunlu olmalıdır (İLKL-ML, 2002).



Şekil 9. UV Lamba (254-362 nm)

### 2.4.3 Florimetrik metot

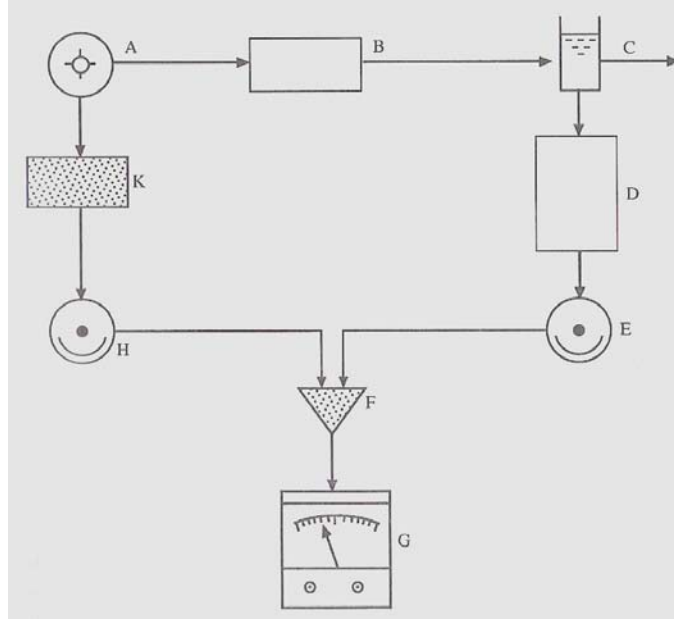
Floresans metodunda, maddenin çözeltilisine ışın enerjisi gönderilerek madde uyarılır. Uyarılan maddenin aldığı enerjiyi geri vererek ilk haline dönmesi esnasındaki davranışları incelenir. Madde üzerine gönderilen ışınlar, ultraviyole, görünür alan nadiren de infrared olabilir. Bu ışınlar madde tarafından önce çok kısa bir süre absorblanır ve ondan sonra floresans ışınları olarak etrafa yayılır.



Floresans yayan maddelerin ışın yayma ömrü genel olarak  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  saniyedir. Floresans ışınları sadece madde üzerine ışın gönderildiği sürece görülür. Işın gönderme durduğu anda durur. Genellikle madde üzerine UV ışınları gönderilir, bu nedenle floresans ışınlarının dalga boyları 380-720 nm arasında değişir. Çünkü daha küçük dalga boylu ışınlar molekülde bozunma ve hatta parçalanmalara neden olurlar.

Floresans metodu çok hassastır. Milyarda bir gibi çok düşük konsantrasyonlara uygulanabilir (Gündüz, 2002).

Floresans ölçme cihazlarının kısımları UV ve görünür bölge cihazlarınınkilere benzer. Bu tip cihazlarda güç kaynağındaki dalgalanmaları önlemek için çift ışın yollu spektrofluorimetreler kullanılır.



- A. Işın kaynağı    B. Uyarma filtresi-Monokromatör    C. Numune Kabı  
D. Yayılan ışın filtresi- Monokromatör    E. Numune fotoyükselticisi  
F. Fark Yükselticisi    G. Kaydedici    H. Referans Yükselticisi  
K. Işın Şiddeti Ayarlayıcısı

Şekil 10. Bir spektrofiorimetrenin başlıca kısımları (Gündüz, 2002)

Spektrofiorimetrelerde ışın kaynağının güçlü olması gerekir. Bu amaçla yüksek basınçlı ksenon ark lambaları kullanılır. Bu lambalar yaklaşık 300nm den 1300nm ye kadar sürekli ve şiddetli bir ışın bandı verir. Bu ışın bandını floresans ışın elde etmede kullanabilmek için banttaki ışınları dalga boylarına ayırmak gerekir. Böyle bir ayırma ancak greyting monokromatörleriyle yapılır. Bu nedenle bu cihazlar spektrofiorimetrelere göre daha kullanışlı fakat daha pahalıdır.

Spektrofiorimetrelerde floresans sinyalleri zayıf olduğundan güçlendirmek için fotokatlandırıcı tüpler veya dedektörler kullanılır. Floresans ölçülmesinde camdan veya silikadan yapılmış numune kapları kullanılır.

Spektrofiorimetre cihazı kullanılarak yapılan çok çeşitli analiz yöntemleri bulunmaktadır. USDA-FGİS'e (ABD Tarım Bakanlığı-Tahıl İnceleme Servisi) ait metoda göre, mısır ve glüten ununda aflatoksin tayini, 4 aşamada gerçekleşir (VICAM, 1999).

- Ekstraksiyon
- Süzme
- İmunoaffinitite Kolon ile Ayırma
- Ölçüm

### **Ekstraksiyon**

Aflatoksin içeren 50 g numune, 250 ml metanol-su (3+2) karışımı ve 5g tuz ilave edilerek blendırda 3 dk yüksek hızda karıştırılır.

### **Süzme**

Karışım ilk önce normal filtre kağıdı kullanılarak süzülür. Süzme işlemi sonunda süzüntüden 10 ml pipetle alınıp 20 ml saf su ile seyreltilir. Daha sonra cam mikrofiber filtreden geçirilir.

### **İmunoaffinitite Kolon ile Ayırma (Elusyon)**

Bu işlemlerden sonra 4 ml'lik numune süzüntüsü saniyede 1-2 damla akacak şekilde (3ml/dk) imunoaffinitite kolondan geçirilir ve behere alınır. Ardından yıkama işlemi için akış hızı 5ml/dk olacak şekilde 10 ml saf su geçirilir. Yıkama işlemi iki kez yapılır. Yıkama işleminden sonra kolondan hava geçirilir.

İmunoaffinitite kolonda tutulan aflatoksinleri elue edebilmek için 1 ml HPLC saflıkta metanol eklenir ve saniyede 1-2 damla olacak şekilde akması beklenir. Metanol geçişi tamamlandıktan sonra, florimetre küvetine 1 ml de Vicam'e ait Aflatest geliştirme çözeltisinden eklenir. İyi karışması beklenir ve analiz başlatılır.



Şekil 11. Spektroflorimetre cihazı

#### 2.4.4 İnce tabaka kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi, bir plaka üzerine kaplanmış durgun faz boyunca, numuneyi içeren mobil fazın, kapiler hareket ettiği kromatografik bir metottur.

TLC, ilaçların ayrılmasında ve tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan tekniklerden birisidir. Bu yöntem, araştırma maliyeti açısından kolon sıvı kromatografi ile ayırmalara göre daha düşük maliyetli ve uygulaması daha kolay ve hızlı olduğundan birçok farklı dalda kullanılmaktadır. İlaç sanayisinde ürün saflığının belirlenmesinde, klinik laboratuvarlarda, biyokimyasal ve biyolojik çalışmalarda, endüstriyel laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yaygın uygulamanın bir sonucu olarak TLC ile en az HPLC'deki kadar çok sayıda analiz yapıldığı hesaplanmıştır.

İnce tabaka Kromatografisi, üzerinde ayrılacak maddeye uygun bir adsorblayıcı madde bulunan düzgün cam, plastik veya alüminyumdan yapılmış plakalar ile yapılır. Bu plakalar genellikle 5x20, 10x20, 20x20 boyutlarındadır. Piyasadaki plakalar klasik ve yüksek performanslı olmak üzere ikiye ayrılır. Genellikle kullanılan plakalar, partikül büyüklüğü 20 µm veya daha büyük olan adsorblayıcı maddenin nispeten kalın bir tabaka oluşturduğu (200-250 µm) plakalardır. Bu plakalarda 25 dakikalık bir yürütme süresi içinde 12 cm lik yol boyunca 2000 teorik tabaka bulunur.

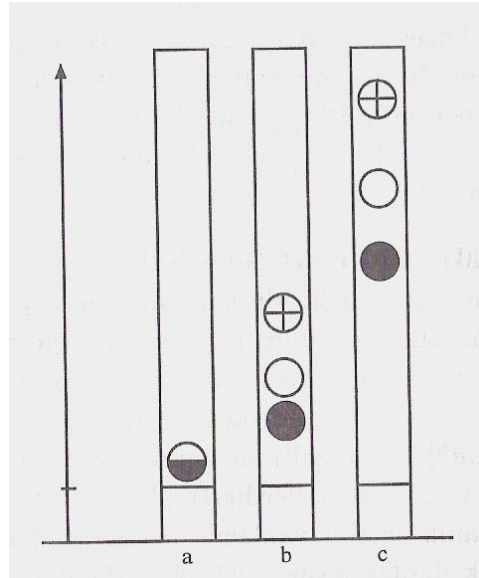
Yüksek performanslı plakalar ise genellikle 200 µm ve partikül çapı 5 µm lik taneciklere sahiptir. Dolayısıyla yüksek performanslı bir plakada 10 dakikalık bir yürütme süresi içinde 3 cm lik kısımda 4000 teorik tabaka bulunur. Yüksek performanslı plakaların tek dezavantajı numune kapasitesinin çok küçük olmasıdır.

TLC de adsorblayıcı madde ayrılması beklenen maddenin asidik ya da bazik oluşuna göre belirlenir. Genellikle asidik karakterli maddeler için silikajel gibi asidik adsorblayıcılar, bazik karakterli maddeler için alüminyum oksit, talk gibi bazik adsorblayıcılar kullanılır.

TLC metodunda, kullanılan hareketli faz olarak genellikle kloroform, karbondioklorür, dietileter, t-bütiletileter, aseton, etanol, metanol, su, 2-propanol ve asetik asit kullanılır. Sabit faz olarak ise alümina, silika jel, florisil gibi maddeler kullanılır.

TLC’de numune genellikle % 0,01-% 0,1 lik çözültisi halinde plakanın bir kenarından 1-2 cm mesafede yaklaşık 5 mm lik çapa sahip bir nokta şeklinde uygulanır. Bu işlem kılcal bir boru ya da mikropipet ile yapılır. Birden fazla numune varsa her numune arasında en az 1 cm aralık bırakılmalıdır.

Numune uygulandıktan sonra çözücüsünün buharlaşması beklenir ve buharlaşma işlemi tamamlandıktan sonra plaka, geliştirme çözücüsünün buharıyla doymuş kapalı bir kaba veya bir kromatografi tankına yerleştirilir. Bu kap içinde 1-2 cm yüksekliğinde geliştirme çözücüsü bulunmaktadır. Kromatografi tanklarının çözücü buharıyla iyice doyurulması gerekir. Aksi halde maddelerin ayrılması iyi olmaz. Şekil 12’de görüldüğü gibi, a halinde kromatogram açık havada yapılmıştır, b halinde kromatogram tank içinde yapılmış ancak tank çözücü buharıyla doyurulmamıştır, c halinde ise tank atmosferi çözücü buharıyla iyice doyurulmuştur.



Şekil 12. Çözücü buharı ve kromatogram netliği (Gündüz, 2002)

Numuneyi içeren plaka, kromatografi tankına yerleştirilirken bir ucu çözücüye daldırılır, ancak lekenin sıvıya temas etmemesine dikkat edilir. Yürütme sıvısı küçük partiküller arasında kapiler etkileşme olayı ile yukarı doğru tırmanır. Çözücü numunenin uygulandığı yerden geçerken numuneyi çözer ve üst tarafa doğru taşır. Bu sırada numune



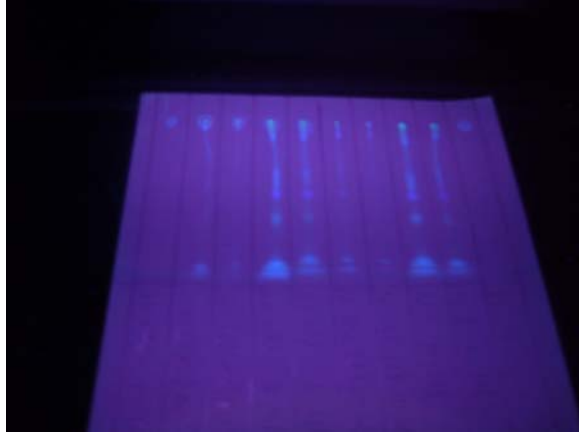
hareket eden faz ile durgun faz arasında kendiliğinden dağılmaya uğrar. Yükselme yaklaşık 15cm olduğu zaman plaka kap içerisinde çıkarılır ve kurutulur.



Şekil 13. Kromatografi tankında yürütme işlemi

Kurutma işleminden sonra ayrılan maddeler renkli iseler plaka üzerinde görünürler. Ayrılan maddeler renksizseler çeşitli yöntemler uygulanabilir. Eğer UV bölgede kendileri absorpsiyon gösteriyorlarsa ya da kısa veya uzun dalga boylu ışınlarla tutulduklarında (254-365 nm) floresans gösteriyorlarsa (Afla B<sub>1</sub>,B<sub>2</sub>,G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub> floresans özellik gösterir) kromatogramda lekelerin saptanması basittir. Aksi halde maddelerin bir kimyasal reaksiyon ile renkli türevlerini oluşturmalarından yararlanılarak, plakaya bir belirteç püskürtülür.

Aflatoksin tayininde belirteç olarak, AlCl<sub>3</sub> çözeltisi ya da H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi kullanılır. AlCl<sub>3</sub> çözeltisi, etil alkolde % 20 lik hazırlanır. Plakaya püskürtülmesinin amacı Afla B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub> in floresans şiddetini arttırmaktır. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi ise etil alkolde ya da suda % 25-50 lik olarak hazırlanır ve plakaya püskürtülür. Plakaya püskürtülünce aflatoksinlerin UV ışık altında renklerini mavi-yeşilden sarıya dönüştürür.



Şekil 14. AlCl<sub>3</sub> çözeltisi püskürtülmüş TLC plakası

TLC de her maddenin hareketli fazla sürüklenmesi farklıdır. Buna *alınma faktörü* denir ve R<sub>f</sub> ile gösterilir. R<sub>f</sub> her madde için koşullar aynı olduğu sürece sabittir.

$$R_f = \frac{\text{Maddenin sürüklenmesi (cm)}}{\text{Çözücünün sürüklenmesi (cm)}}$$

Şartlar aynı tutulursa R<sub>f</sub> değerleri yardımıyla numune içinde ne gibi maddeler olduğu tespit edilebilir. R<sub>f</sub> değeri ısı, basınç, nem, konsantrasyon, mobil ve durgun fazların karakteri gibi faktörlerden etkilenir.

TLC metodu kullanılarak yapılan aflatoksin analizi, AOAC'nin 970.45 sayılı metoduna göre, 5 aşamada gerçekleştirilir (AOAC, 2000).

- Numune hazırlama
- Ekstraksiyon
- Plakaya Uygulama
- Yürütme
- Ölçüm

### **Numune Hazırlama**

1100 g dövülmüş yarfıstığı, 1500 ml su ve 22 g NaCl ile birlikte blendırda orta hızda 3 dk karıştırılır.

### **Ekstraksiyon**

100 g yerfıstığı ya da yerfıstığı unu veya 50 g yerfıstığı yağı blendır kabına konur. Yerfıstığı yağı için 250 ml metanol-su (55+45) ve 100 ml hekzan; yerfıstığı ya da unu için 500 ml metanol-su (55+45) 200 ml hekzan ve 4 g NaCl eklenir. Yüksek hızda 1 dk karıştırılır.

Daha sonra 250 ml lik santrifüj tüpüne alınarak 2000 rpm de 5 dk santrifüjlenir. İşlem tamamlandıktan sonra alttaki metanol fazının 25 ml si ayırma hunisine pipet yardımıyla konulur. 25 ml  $\text{CHCl}_3$  eklenerek 30-60 s çalkalanır. Tabakalar ayrıldıktan sonra alttaki  $\text{CHCl}_3$  fazı, 600 ml lik paslanmaz çelik behere aktarılır. Beher azot buharına tutulur ve çözen 2 ml kalıncaya kadar buharlaştırılır. Ekstrakt viale alınır ve tekrar azot buharı içeren sıcak su banyosunda buharlaştırma işlemi tekrarlanır.

### **Plakaya uygulama**

Ekstrakt 200  $\mu\text{l}$  benzen- $\text{CH}_3\text{CN}$  (98+2) de çözülerek plakaya uygulanır. Durgun faz olarak silikajel içeren alüminyum, cam ya da plastik plaka kullanılabilir.

### **Yürütme**

Kromatografi tankına, hareketli faz olarak 50 ml aseton-kloroform konur. Aseton ve kloroformun karışımdaki yüzdeleri (5+95) ile (15+85) arasında değiştirilebilir. Yürütme işlemi aflatoksin  $R_f$  değerleri 0.4-0.7 oluncaya kadar sürer, bu da yaklaşık 40 dk'dır.

### **Ölçüm**

Yürütme işlemi bittikten sonra plaka tanktan çıkartılır ve çözenin uçması için bir süre beklenir. Daha sonra UV lamba altında aflatoksinlerin floresansı gözlenir. Afla  $B_1$  ve Afla  $B_2$  mavi renkli floresans verirken, Afla  $G_1$  ve Afla  $G_2$  yeşil renkli floresans verir.  $R_f$  değerleri büyükten küçüğe şöyle sıralanır: Afla  $B_1$ -Afla  $B_2$ -Afla  $G_1$ -Afla  $G_2$ .

### **2.4.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)**

Kromatografinin mucidi Tswett'in çalışmaları dahil, önceleri sıvı kromatografilerinde çapı 1-5 cm ve uzunluğu 50-500 cm olan cam kolonlar kullanılırdı. Uygun akış hızları temin etmek için katı durgun fazı oluşturan partiküllerin çapı genellikle 150-200 µm aralığındaydı. Bu durumda bile akış hızı çok düşük olurdu. Bu yüzden ayırma çok zaman alırdı. Bu hızı arttırmak için vakum uygulaması da iyi sonuç vermemişti (Gündüz, 2002).

1960 lı yıllarda dolgu maddelerinin tanecik boyutunun azaltılması ile bilim adamları kolonu küçük partiküllü dolgu maddeleri ile doldurup kolonun üstünden yüksek basınç uygulamışlardır. Böylece **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi** yöntemi doğmuştur.

HPLC cihazı kullanılarak yapılan aflatoksin analizi, AOAC'nin 999.07 sayılı metoduna göre, 5 aşamada gerçekleştirilir (AOAC, 2000).

- Ekstraksiyon
- Süzme
- İmunoaffinitite Kolon ile Ayırma
- Enjeksiyon
- Ölçüm

#### **Ekstraksiyon:**

Kuru incirler için ekstraksiyon aşamasında 50 g numune tartılır ve üzerine 150 ml teknik metanol, 100 ml distile su ve 5 g tuz ilave edilir ve blendırda, 3 dk yüksek hızda karıştırılır.

#### **Süzme:**

Bu aşamada ekstrakt, önce normal filtre kağıdından daha sonra Whatman No:4 ten süzülür.

#### **İmunoaffinitite Kolon (IAC) ile Ayırma:**

Affinitite kolonlar, Afla B<sub>1</sub>, Afla B<sub>2</sub>, Afla G<sub>1</sub> ve Afla G<sub>2</sub>'yi kendisine bağlayacak antikolar içeren kolonlardır. Bu kolonlar, Afla B<sub>1</sub> için, 100 ng'lık miktara kadar bağlayabilirler. Bu kolonlarda geri kazanım, Afla B<sub>1</sub>, Afla B<sub>2</sub> ve Afla G<sub>1</sub> için en az % 80, Afla G<sub>2</sub> için % 60 olarak belirlenmiştir (AOAC, 2000).

IAC'ler kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi sağlanır. Daha sonra IAC'leri hazır hale getirmek için, 10 ml PBS (Fosfat tamponu) çözeltisi akış hızı 2-3ml/dk olacak şekilde kolonlardan geçirilir.

Pipet yardımıyla süzüntüden 10 ml alınır ve akış hızı 3ml/dk olacak (saniyede 1 damla) şekilde immunoaffinite kolondan geçirilir. Akış tamamlandıktan sonra kolondan aynı akış hızında 15 ml saf su geçirilir. Ardından da 3-4 kez şırınga yardımıyla hava geçirilir.

Aflatoksinleri vialde almak için, 0.5 ml metanol IAC den geçirilir, 1dk beklenir ve 0.75 ml daha metanol geçirilir. Böylece aflatoksinler vialde elde edilmiş olur.

### **Enjeksiyon:**

HPLC ye numunenin aktarımı ya oto-örnekleyici ile ya da şırınga yardımıyla yapılır. Eğer şırınga yardımıyla enjeksiyon yapılacaksa, vialdeki karışımdan yaklaşık 200 µl lik kısmı şırıngaya alınır ve HPLC'ye aktarılır.

Eğer enjeksiyon otomatik olarak yapılacaksa, numuneler oto-örnekleyiciye dizilir ve cihazın ne kadar numune kullanacağı miktar olarak ayarlanır ve analiz işlemi başlatılır. Her bir aflatoksin için alıkonulma süresi Afla B<sub>1</sub>,Afla B<sub>2</sub>, Afla G<sub>1</sub> ve Afla G<sub>2</sub> sırasıyla şöyledir: 11dk, 9 dk, 8 dk ve 6 dk.

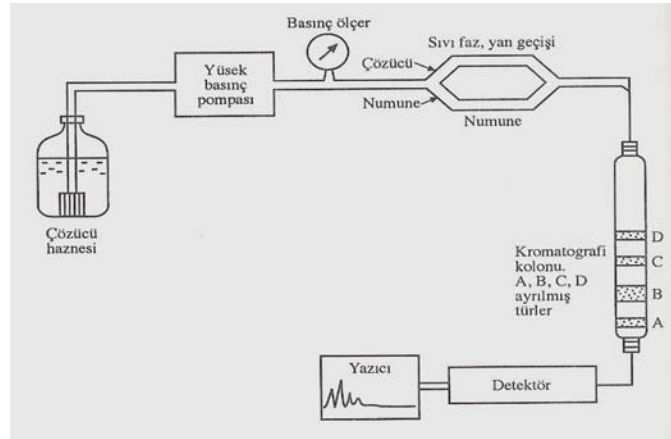
HPLC yöntemi tüm analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri arasında hassas olması, uçucu olmayan türlerin ya da sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve de en önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak, aminoasitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir.

### 2.4.5.1. HPLC cihazı



Şekil 15. HPLC cihazı

HPLC cihazı en genel haliyle bir çözücü haznesi, yüksek basınç pompası, analitik kolon, dedektör ve yazıcıdan oluşur.



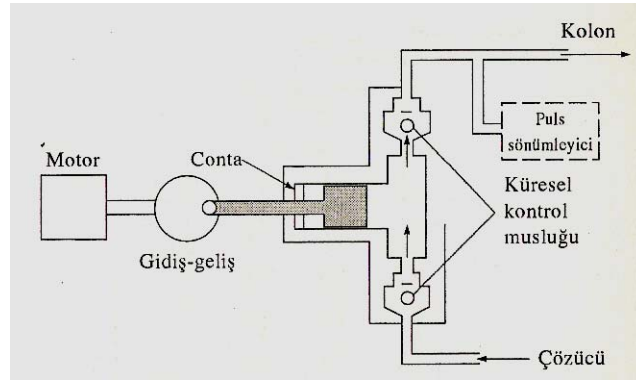
Şekil 16. HPLC cihazının şematik görünümü

HPLC sistemi, örneği sisteme taşıyan çözücüye içeren çözücü bölmesiyle başlar. Her cihazda en az bir tane 500ml lik camdan veya paslanmaz çelikten yapılmış bir çözücü haznesi bulunur. Çözücü haznesi, sisteme zarar verecek partikülleri uzaklaştırmak için bir filtre içerir.

Modern HPLC cihazlarında genellikle 2 veya daha fazla çözücüye karıştırabilen bir sistem bulunur. Çözücü sisteme bir pompa yardımıyla ulaştırılır. Bu pompalar ileri-geri hareket eden pompalardır. HPLC de pompa çok önemlidir. O yüzden HPLC de pompalama

sistemi Şu Şartları taŐımalıdır: 400 atm ye kadar basınç üretimi, puls içermeyen basınç çıkışı, 0,1-10 ml/dk aralığında değişen akış hızları, akış hızı kontrolünün ve tekrarlanabilirliğinin gerekmesi, korozyona dayanıklı parçalar.

HPLC de kullanılan pompalar üçe ayrılır: Silindir yollu pompalar, Şırınga veya sürgülü pompalar, pnömatik pompalar.



Şekil 17. HPLC için bir pistonlu pompa örneği

Diğer bölme numune enjeksiyon bölmesidir. Enjeksiyon valfi, analiz yapılıŐı için uygun boyutta numune haznesi ile donatılmıŐtır.

Numune enjeksiyonu, yüksek basınçta yapılır. Enjekte edilen numune, yüksek basınçta hareket eden mobil faza karıŐır ve kolonun üstüne mobil fazda çözünmüş olarak ulaŐır. UlaŐma çok küçük bir hacimde olur. Çünkü hareketli fazın büyük bir kısmı yan geçiŐten devam ederken, çok az bir kısmı numuneyle karıŐıp ana mobil fazla birleŐir. Böylece numune fazla seyrelmeden kolona ulaŐır. Bu önemlidir, çünkü numune seyrelirse pikler dedektörden yayvan çıkacaktır.

Enjektörün ardından analitik kolon ilk örneğin ayrılıŐını gerçekteŐtirir. Tipik bir HPLC kolonunun çapı 3-4 mm, uzunluğu 10-40 cm kadardır. Kolon paslanmaz çelikten yapılır. Günümüzde belki de en çok kullanılan kolon, 25 cm uzunluğunda 4,6 mm iç çapında ve 5µm tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi doldurulmuş kolonlardır. Bu tip kolonlar 40000-60000 tabaka/metre içerirler (Skoog et al, 2002).

Analitik kolonlar çok değerli olduklarından hareketli faz bunlara gelmeden önce genellikle kısa bir kolondan geçirilir. Bu kolonun görevi sadece partikül haldeki maddeleri ve yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve durgun faza tersinmez olarak bağlanan bileşikleri de tutmaktır.

Analitik kolonlarda dolgu maddesi olarak iki tip madde konur. Bunlar film dolgular ve gözenekli dolgulardır. Birinci tip maddeler cam veya polimerden yapılıdır. Yüzeylerine gözenekli yapıda silika, alumina veya iyon değiştirme reçinesi kaplanır. İkinci tip maddeler gözenekli yapıda olan, silika, alumina veya iyon değiştirme reçinesinden yapılan 3-10 µmlik parçacıklardır.



Şekil 18. HPLC analitik kolonu (ODS-3)

Analitik kolondan sonra ayrılan bileşenler, tayin edilecek maddeye uygun dedektörle dedekte edilirler. Dedektörden sonra geri basınç regülatörü bulunur. Bu alet çözücü dedektörden geçerken içinde hiç hava bulunmamasını sağlar. Çünkü hava kabarcıkları numune bileşenlerinin dedeksiyonunu engeller. Alternatif olarak, çözünmüş gazların atılması için, çözücü haznesindeki çözücünden inert bir gaz da geçirilebilir.

HPLC cihazında kullanılan dedektörler iki çeşittir:

➤ Genel amaçlı dedektörler, hareketli fazın kırma indisini, dielektrik sabitini ve yoğunluğunu ölçen dedektörlerdir.

- *Kırma İndisi Dedektörü,*
- *Işın Dağıtma Dedektörü,*
- *Elektrokimyasal Dedektörler vs.*



➤ Özel amaçlı dedektörler, bir maddenin UV absorpsiyonunu, floresansını veya diffüzlenme akımını ölçer.

- *IR Absorbans Dedektörleri,*
- *Floresans Dedektörleri ,*
- *UV Absorbans Dedektörleri,*
- *Filtreli UV Absorbans Dedektörleri,*
- *Monokromatorlu UV Absorbans Dedektörleri*

1982 yılında ve sıvı kromatografinin önemli rol oynadığı 365 tane basılmış makalede yapılan incelemede, çalışmaların % 71'inin UV absorpsiyonunun belirlenmesiyle,% 15'inin floresansla, % 5,4'ünün kırma indisıyla, % 4,3'ünün elektrokimyasal ölçmelerle ve geri kalan % 4,3'ünün diğer yöntemlerle yapıldığını ortaya koymaktadır.

Çizelge 8'de, HPLC için genel olarak kullanılan dedektörlerin önemli özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge 7. LC Dedektörlerin Performansı (Skoog et al, 2002)

LC dedektör	Piyasada var mı?	Kütle LOD (ticari dedektörler) <sup>a</sup>	Kütle LOD (bugünkü durum) <sup>b</sup>
Absorbans	Evet <sup>c</sup>	100 pg-1 ng	10 pg
Floresans	Evet <sup>c</sup>	1-10 pg	10 fg
Elektrokimyasal	Evet <sup>c</sup>	10 pg-1 ng	100 fg
Kırma indisi	Evet	100 ng-1 µg	10 ng
İletkenlik	Evet	500 pg-1 ng	500 pg
Kütle spektrometre	Evet <sup>d</sup>	100 pg-1 ng	1 pg
FT-IR	Evet <sup>d</sup>	1 µg	100 ng
Işık saçma <sup>e</sup>	Evet	10 µg	500 ng
Optikçe aktiflik	Hayır	—	1 ng
Element seçici	Hayır	—	10 ng
Fotoiyonlaşma	Hayır	—	1 pg-1 ng

a. Kütle LOD, enjeksiyonlarda 10 µL, mikrobor LC için 1µL enjeksiyon, mol kütlesi 200 g/mol alarak, gürültü sinyalinin beşkatına eşit bir sinyale karşılık gelen enjekte edilmiş kütle için hesaplanır.

b. a ile aynı olmasına karşın enjeksiyon hacmi genellikle daha küçüktür.

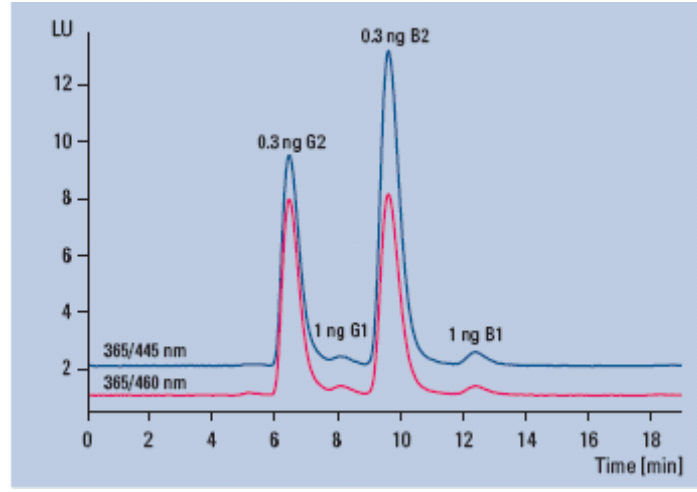
c. Aynı zamanda mikrobor LC için piyasada bulunmaktadır.

d. Şuanda pahalı olarak piyasadadır.

e. Küçük açılı ışık saçma ve nefelometreyi içeren.

HPLC cihazında, floresans dedektör yardımıyla nanogram düzeyinde analiz yapılabilir. Bu da bize şunu gösterir: Floresans dedektör kullanılarak, numunenin çok az bir miktarıyla (50 µl gibi), ng düzeyinde aflatoksinler analiz edilebilir.

Şekil 19, iki ayrı dalga boyunda floresans dedektörlü HPLC cihazı yardımıyla yapılan aflatoksin analizini göstermektedir.

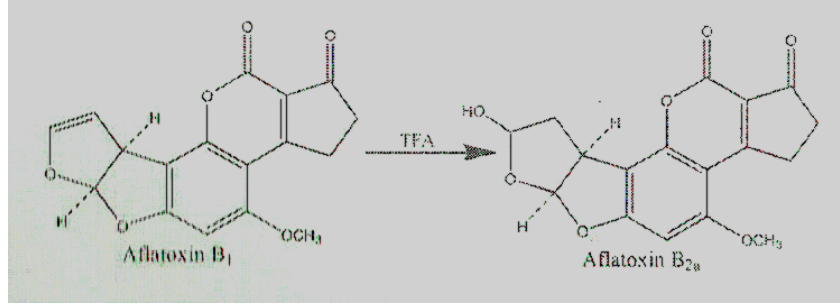


Şekil 19. İki farklı dalga boyunda aflatoksin analizi (Schuster et al, 2000)

#### 2.4.5.2. HPLC metodunda türevlendirme :

Afla B<sub>1</sub>, Afla B<sub>2</sub>, Afla G<sub>1</sub> ve Afla G<sub>2</sub> nin floresans sinyali çok düşüktür. Özellikle Afla B<sub>1</sub> ve Afla G<sub>1</sub> in floresans sinyalini yükseltmek için HPLC metodunda iki tür türevlendirme uygulanır: Kolon öncesi Türevlendirme ve Kolon Sonrası Türevlendirme.

Kolon öncesi türevlendirmede, süzme işleminden sonra süzüntüye TFA (Trifloroasetik asit) çözeltisi eklenir. Amaç, Afla B<sub>1</sub> ve Afla G<sub>1</sub>' in metanol-su ya da asetonitril-su gibi çözücülerde floresans özelliğini arttırmaktır. Bu işlemde aflatoksinlerle TFA arasındaki reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dk 50 °C sıcaklıkta beklenmelidir. TFA çözeltisi Afla B<sub>1</sub> ve Afla G<sub>1</sub>' in hemiasetal formlarına dönüştürür. Bu formlara Afla B<sub>2a</sub> ve Afla G<sub>2a</sub> denir.



Şekil 20. Afla B<sub>1</sub>' i TFA çözeltisi ile türevlendirme

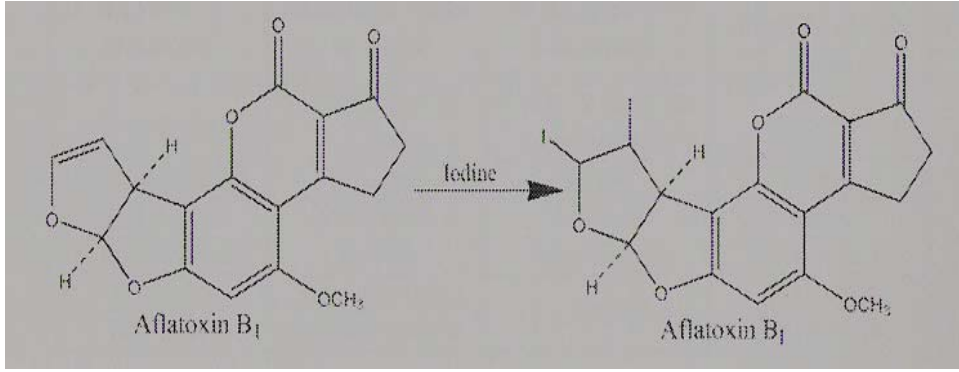
Bu metotta, TFA içeren aflatoksinli numunenin azot buharından geçirilmesi de gerekmektedir. Bu süreçte numune kaybı olasılığı, yöntemin uzun zaman alması ve TFA ayracının aşındırıcı bir kimyasal olması bu metodun kullanımını azaltmaktadır (r-biopharm, 2003).

Kolon sonrası türevlendirme dört şekilde yapılır:

- İyot çözeltisi ile Türevlendirme
- PBPB (Pridinyumbromürperbromür) çözeltisi ile Türevlendirme
- Fotolitik Türevlendirme
- Kobra Cell ile Türevlendirme
- 

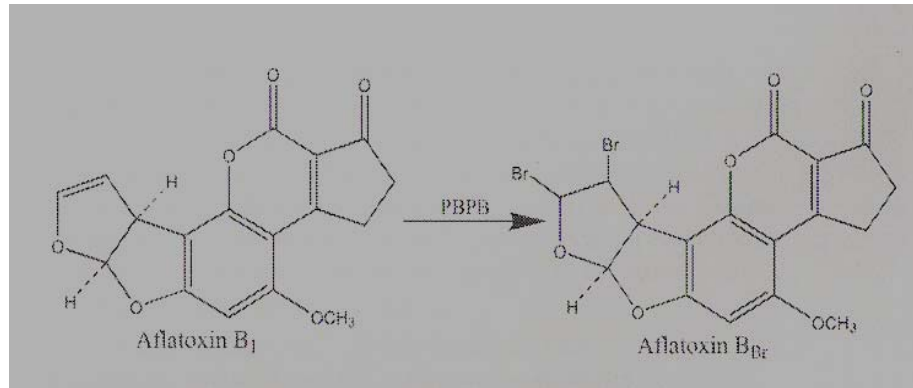
İyot ile yapılan yöntemde, iyot çözeltisi % 0.05 lik hazırlanır. Bunun için 0.5 g iyodun 100 ml metanolde tamamen çözülmesi sağlanır, üzerine 900 ml saf su eklenir (Vicam, 1999).

Bu yöntemde, iyot çözeltisini reaksiyon kabına göndermek için, HPLC cihazında ikinci bir pompaya ihtiyaç vardır. HPLC de, genellikle, iyot çözeltisinin akış hızı 0.7 ml/dk ve hareketli fazın hızı 0.8 ml/dk tutulur. Aflatoksinler ile iyot çözeltisinin reaksiyonu, 60 °C de teflon kolonlarda (0.5 mm x 3000 mm) gerçekleştirilir. İşlem yaklaşık 40 s sürer. Bu yöntemde kolon öncesi yöntemdeki gibi buharlaştırma işlemi yoktur ancak bu metotta iyot çözeltisi her gün yeni olarak hazırlanmalıdır ve reaksiyon kabında iyot kristallerinin oluşumunu engellemek için ekipmanlar düzenli olarak temizlenmelidir (r-biopharm, 2003).



Şekil 21. Afla B<sub>1</sub>' i iyot çözeltisi ile türevlendirme

PBPB çözeltisi ile yapılan türevlendirmede, ikinci bir pompa yardımıyla hazırlanan PBPB çözeltisi (HPLC saflıkta suda 0.05 mg/ml) akış hızı 0.3 ml/dk olacak şekilde pompalanır. HPLC de hareketli fazın akış hızı da 1 ml/dk olmalıdır (Nollet, 2004).

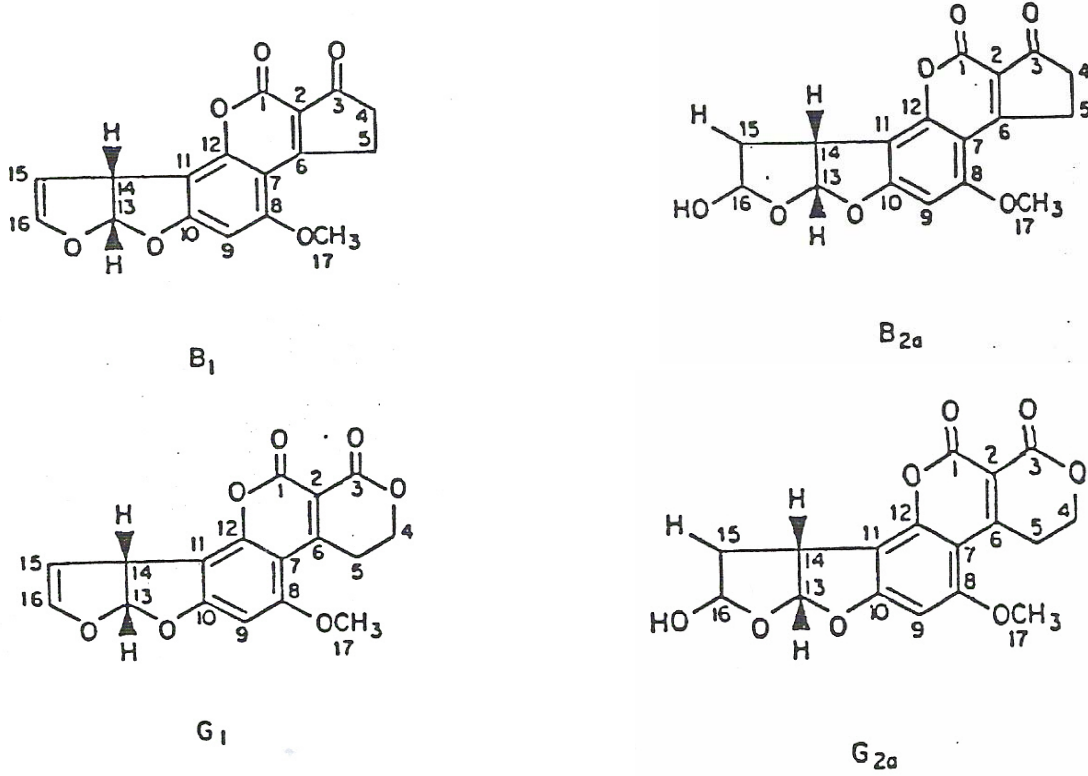


Şekil 22. Afla B<sub>1</sub>' i PBPB çözeltisi ile türevlendirme

Fotolitik türevlendirme işleminde: Afla B<sub>1</sub> ve Afla G<sub>1</sub>, aynı kolon öncesi türevlendirmedeki gibi hemiasetal türevleri olan Afla B<sub>2a</sub> ve Afla G<sub>2a</sub> ya dönüştürülür. Ancak bu sistemde TFA çözeltisi yerine bir fotokimyasal türevlendirme düzeneği kullanılır. Bu düzenek, 254 nm düşük basınçlı civa lambası ve reaksiyon hücresine birleştirmek için PTFE (politetrafloretilen) den yapılmış bir gereçten oluşur.

Kobra Cell, Afla B<sub>1</sub> ve Afla G<sub>1</sub>'in floresansını yükselterek daha hassas bir şekilde analiz edilmelerini sağlayan elektrokimyasal bir pildir. Bu elektrokimyasal pil, HPLC hareketli fazına eklenen brom iyonlarını daha aktif hale getirerek, Afla B<sub>1</sub> ve Afla G<sub>1</sub> ile reaksiyona girmelerini sağlar. Bu reaksiyon sonunda Afla B<sub>1</sub> ve Afla G<sub>1</sub> in türevleri olan Afla

B<sub>2a</sub> ve Afla G<sub>2a</sub> oluşur. Bu iki bileşiğin floresans özellikleri daha fazladır. Bu türevlendirme işlemi, hareketli fazın akış hızı 0.5 ml/dk olursa yaklaşık 4 s de gerçekleşir.



Şekil 23. Afla B<sub>1</sub>-G<sub>1</sub> ve Afla B<sub>2a</sub>-G<sub>2a</sub>

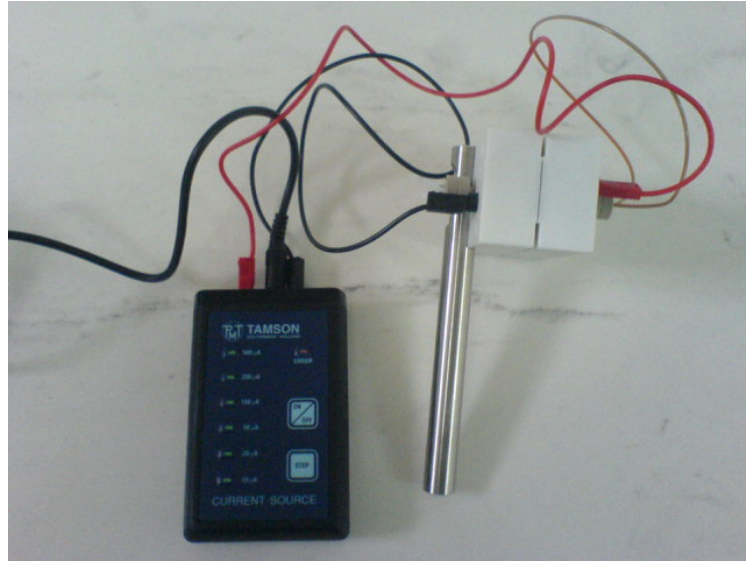
Kobra Cell'in türevlendirmeye başlamadan önce ayarları şu şekilde olmalıdır:

Hareketli faza ek olarak 120 µg KBr ve 350 µl 4 M HNO<sub>3</sub>

Elektrik akımı : 100 µA

Reaksiyon tüpünün boyutları: 40 cm ve 0.5 cm iç çap

Kobra Cell'in kullanımı, diğer metotlara göre daha avantajlıdır. Günlük olarak herhangi bir hazırlığa ihtiyaç yoktur. Ayrıca yeni bir ekipman gerektirmez. Diğer yöntemlere kıyasla daha kısa zaman gerektirir.



Şekil 24. Kobra Cell

PARAMETRE	İYOT ÇÖZELTİSİ İLE	PBPB ÇÖZELTİSİ İLE	ELEKTROKİMYASAL
AKIŞ HIZI	1ml+0.6 ml reaktif	1ml+0.3 ml reaktif	1ml (reaktif yok)
ÇÖZGEN	Doymuş iyot çözeltisi	1 litre suda 50 mg PBPB	Mobil faza eklenen KBr ve HNO <sub>3</sub>
DAYANIKLILIK	Yaklaşık 1 gün	Karanlıkta 4 günden fazla	Limitsiz
REAKSİYON BOBİNİ	6 m	50 cm	50 cm
SICAKLIK	70 °C	Çevre sıcaklığı	Çevre sıcaklığı
EXTRA GEREÇ	Fırın ya da kolon sonrası tepkime kabı	Yok	Perdeli elektrokimyasal pil
SİNYAL KAZANIMI	PBPB çözeltisinden az	İyot çözeltisinden fazla	PBPB ve İyot çözeltilerinden fazla
BİLİNEN SORUNLAR	İyot kristalizasyonu	Yanlış saklama sonucu PBPB çözeltisinde bozulma	Yok

Çizelge 8. Türevlendirme yöntemlerinin kıyaslanması (Stroka, 2000)

## 2.4.6. İmmuno kimyasal yöntemler

Aflatoksin tayininde kullanılan iki çeşit immunokimyasal yöntem vardır.

1. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
2. RIA (Radio Immuno Assay)

### 2.4.6.1. ELISA (EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay)

ELISA 1971 de geliştirilmiştir. Antikor moleküllerini bağlamak için test çözeltisindeki işaretlenmemiş aflatoksin ile, tayin için kullanılan işaretlenmiş aflatoksinler arasındaki yarışa dayanır.

Bu teknik iki basamaktan oluşur:

- \* Antikor ve toksin arasındaki reaksiyon
- \* Enzim bağlı toksin ile birlikte sübstrat reaksiyonunun ölçümü

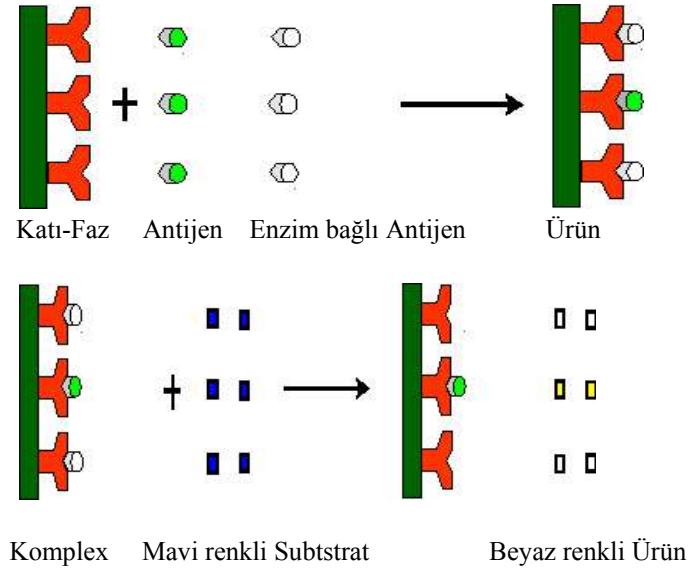
ELISA metodunda, ilk önce katı faza ilk antikor adsorbe edilir. Sonra antijen içeren numune ortama katılır ve antikora bağlanması için inkübe edilir. Enzim bağlı ikinci antikor ortama eklenir ve bağlanması beklenir. Daha sonra enzime uygun substrat eklenir ve enzim aktivitesi ölçülür.

ELISA metodunun en önemli iki tekniği şunlardır:

- Yarışmalı metot
- İndirekt metot

#### **Yarışmalı Metot:**

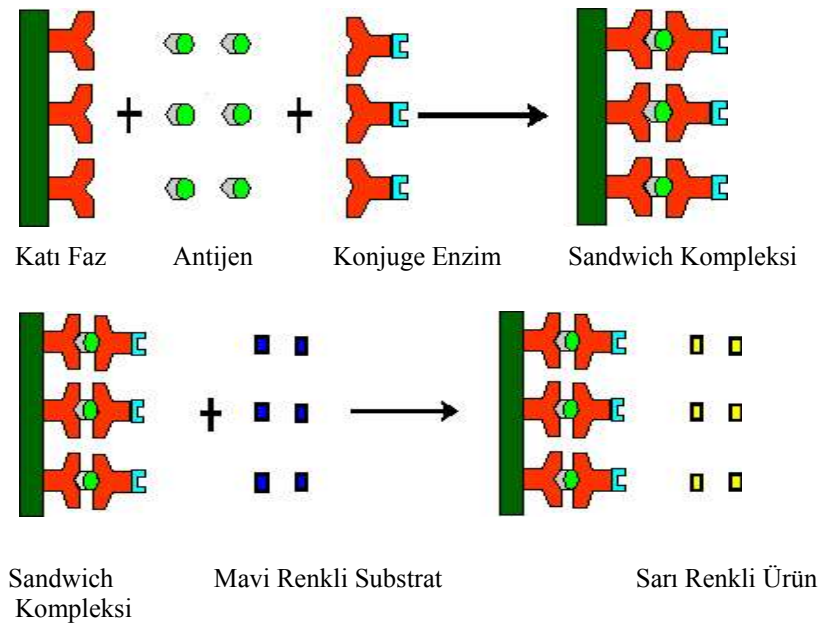
İlk önce spesifik antikorlar katı desteğe adsorbe edilir. Enzim bağlı antijen ile bilinmeyen serbest antijen eklenir ve plaka inkübe edilir. Bağlı ve serbest antijenler katı faza bağlandıktan sonra enzim substratı eklenir ve enzim aktivitesi ölçülür.



Şekil 25. Yarışmalı Metot

### İndirekt Metot:

Spesifik antijen katı faza bağlanır. Antikorları içeren serum ilave edilir ve plaka inkube edilir. Bazı spesifik antikor molekülleri antijene bağlanır. Daha sonra bağlı enzim eklenir ve plaka tekrar inkube edilir. Enzim de spesifik antikorlara bağlanır. En son ortama substrat katılır. Uygun koşullarda, orijinal serumdaki spesifik antikorların miktarı enzim aktivasyonu ile orantılıdır.



Şekil 26. İndirekt Metot



AOAC'nin 990.34 sayılı resmi metoduna göre, yerfıstığı yağında aflatoksin analizi ELISA metodu ile şu şekilde yapılır:

### **Prensip**

Afla B<sub>1</sub>, Afla B<sub>2</sub> ve Afla G<sub>1</sub> e özel antikorlar süzgece konular ve toksin (Afla B<sub>1</sub>) enzim ile (horseradish peroksidaz) etiketlenir. Hareketsiz antikorlara, toksin-enzim konjugatı bağlanması eklenen numunedeki serbest toksinlerle inhibe edilir. Reaksiyon gerçekleştiğinden sonra enzim aktivitesi, bağlı toksin-enzim konjugatı miktarı ile orantılıdır. Antikor-toksin-enzim kompleksinin derişimi, eklenen serbest toksin derişimiyle ters orantılıdır. Bağlı enzim, substrat oksidasyonunu katalizleyerek kompleks rengini maviye çevirir. Renk değişimi numunelerin 20ng/g'dan küçük miktarda aflatoksin içerdiğini gösterir. Renk değişim olmaması, numunelerde 20 ng/g'dan büyük miktarda aflatoksin bulunduğunu gösterir.

### **Ekstraksiyon**

50 g mısır ya da pamuk tohumu, 100 ml metanol-su (8+2) ile blendırda 3 dakika yüksek hızda karıştırılır. Daha sonra karışım süzülür ve filtrat geri kazanılır.

Yerfıstığı yağı için ise, 50 g numune blendıra konur üzerine 100 ml hekzan ve 250 ml metanol-su (55+45) eklenerek yüksek hızda 3 dakika karıştırılır. Karışım süzülür ve ayırma hunisine aktarılır. Tabakaların ayrılması için 10 dakika beklenir ve alttaki fazın 20 ml si 150 ml lik behere alınır. Bu faz içine en az 15 adet kaynama çubuğu atılarak buhar banyosunda ısıtılır. 3 dakika kaynatılır ve soğutulur.

### **Enzim İmunoassay**

A substratı: Tetrametilbenzidin (0.4g/l su) pH: 8.3

B substrat: Hidrojen peroksit(% 0.13 lük sitrik asit çözeltisinde % 0.02 lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> )  
pH : 3.0

Tampon çözelti : % 0.05 timerosal içeren PBS çözeltisinde % 0.1 albumin

Yıkama çözeltisi: PBS çözeltisi

Mısır ve pamuk tohumu için: Kullanılacak malzemelerin tümünün oda sıcaklığına gelmesi için 1 saat beklenir. Bir test tüpünün içine 500 µl (10 damla) A substratından, 500 µl B substratından konularak yeni substrat hazırlanır. A substratı ile B substratı karıştırıldıktan sonra 15 dk içinde kullanılmalıdır.

Daha sonra 400 µl lik tampona 200 µl lik test ekstraktı eklenir. İyice karıştırılır ve birinci 150µl lik bölüm alınarak kaba uygulanır. 1 dakika beklenir ve ikinci 150 µl lik bölüm uygulanır. 1 dakika daha beklenir.

Ardından100 µl (2 damla) enzim çözeltisi kaba uygulanır ve 1 dakika beklenir. Daha sonra 1,5 ml lik (30 damla) yıkama çözeltisi eklenir. Eğer birden fazla kap kullanılıyorsa her kaba 3 sefer 500 µl lik yıkama çözeltisi katılır. Son olarak her kaba her test tüpündeki 1ml lik substrat çözeltisinin tamamı ilave edilir. 1 dakika beklenir ve bölmelerdeki renk gelişimi izlenir.

Yerfıstığı yağı için: Kullanılacak malzemelerin tümünün oda sıcaklığına gelmesi için 1 saat beklenir. Bir test tüpünün içine 500 µl (10 damla) A substratından, 500 µl B substratından konularak yeni substrat hazırlanır. A substratı ile B substratı karıştırıldıktan sonra 15 dk içinde kullanılmalıdır.

500 µl test ekstraktı 500 µl lik tampona eklenir. İyice karıştırıldıktan sonra test ekstraktının 200 µl si plaka bölmesine uygulanır. 1 dakika beklenir ve ikinci 200µl lik bölüm uygulanır.1 dakika daha beklenir. Üçüncü 200 µl lik bölüm uygulanır. 1 dakika daha beklenir. Daha sonrada yukarıdaki işlemler tekrarlanır.

### **Sonuçların Değerlendirilmesi**

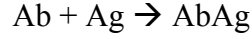
Eğer plakadaki bölmede renk açık mavi veya daha koyuysa, numuneler Afla B<sub>1</sub>, Afla B<sub>2</sub> ve Afla G<sub>1</sub> ( ≤ 20 ng/g ) içeriyor demektir.

Eğer mavi renk yoksa ve 1dakika içinde rek değişimi gözlenmiyorsa, numune Afla B<sub>1</sub>, Afla B<sub>2</sub> ve Afla G<sub>1</sub> ( ≥ 20 ng/g ) içeriyor demektir.

### 2.4.6.2 RIA (RadioImmunoAssay)

RIA ilk olarak 1959'da insülin için geliştirilmiştir. RIA'nın geliştirilmesindeki amaç, hormonlar gibi ölçülmesi kolay olmayan biyolojik maddelerin, miktarlarını tayin edebilmektir.

Yöntem temelde bir antikor (Ab) ile bir antijenin (Ag) antikor-antijen kompleksi (AbAg) oluşturmak üzere reaksiyona girmesine dayanır.



Antikor veya antijen radyoaktif olarak etiketlenir. En sık kullanılan izotop  $^{125}\text{I}$  dir.

Tercih edilme nedeni, proteinlere, molekülün yapısal ve kimyasal özelliklerinde değişiklik yapmadan katılabilmesidir. Ayrıca oldukça uzun yarı-ömüre sahip olması (60 gün) ve nispeten zayıf  $\gamma$  yayıcısı olması da diğer tercih nedenleridir.

Etiketlenen, antijen ise, sınırlı miktardaki antikora karşı etiketli ve etiketsiz antijenler kompleks oluşturmak üzere yarışır. İşlem bittikten sonra serbest antijenden, antijen-antikor kompleksi yapmış olanlar ayrılır ve iki gruptan bir tanesinin radyoaktivitesi ölçülerek antijen miktarı tespit edilir. Sonuç daha önceden hazırlanmış bir standart grafiği ile belirlenir.

#### **Aflatoksinlere Uygulanışı**

ELISA'ya benzer bir yöntemdir. Ancak bu yöntemde işaretlenmiş ligand olarak radyoaktif aflatoksin kullanılır.

RIA yönteminde, aflatoksinler için spesifik bir antikor, çeşitli miktarlardaki toksin standartları ya da bilinmeyen bir grup madde varlığında, sabit miktardaki ışınla işaretlenmiş toksin ile birlikte inkübe edilir.

Amonyum sülfat çözeltisi  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , çözeltilen toksin-antikor kompleksini uzaklaştırmak için kullanılır. Materyaldeki toksin içeriği çözeltideki bağlanmamış radyoaktif toksin kalıntısı miktarıyla doğru orantılıdır.

### 3. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

1988-1990 yılları arasında bölgemizde yapılan bir çalışmada aflatoksin oluşumunun ağaç olumu döneminde başladığı, buruk, sergi ve üretici deposu dönemlerinde artarak oluştuğu saptanmıştır (Demir ve ark, 1990).

Mantarın gelişmesi ve mikotoksin üretebilmesi için uygun koşullarında bulunması gerekir. Bu koşullar, O<sub>2</sub>, sıcaklık ve su aktivitesidir.

Aflatoksin oluşumunda *A.flavus* ve *A.parasiticus*'un gelişmediği ve toksin oluşumunun önlendiği aw (activity of water) değeri, 0.84 'dür. Bu değer minimum kritik değerdir. Ancak 1978 yılında minimum aw değeri 0.80 olarak belirlenmiştir. Üründe küf gelişiminin önlendiği minimum aw değeri, büyük ölçüde ortam sıcaklığına bağlıdır. Optimum küf gelişmesi 0.90-0.99 aw'de elde edilmiştir (Derici, 1997).

Sıcaklık *Aspergillus flavus*'un üremesinde bir diğer önemli etkidir. *Aspergillus flavus*'un optimum gelişme sıcaklığı 25°-35°C, min. 12°C ve max. 43°C dir ( Derici, 1997).

Aflatoksinler ısıya oldukça dayanıklı bileşiklerdir. Afla B<sub>1</sub>, 130<sup>0</sup>C de bile parçalanmadığı için, pastörizasyon, sterilizasyon ve pişirme işlemlerinde gıdalarda kalabilmekte ve insan sağlığı açısından tehlike oluşturabilmektedir (Krishnamachari et al, 1975).

*A.flavus* ve *A.Parasiticus* mantarları aerob olduğundan, ortamda CO<sub>2</sub> oranı % 15 e çıkarıldığında küf gelişmesi artmakta, ancak bunun üzerindeki değerlerde önlenmektedir (Derici, 1997).

Küf gelişmesinde süre de önemli bir faktördür. Su aktivitesi 0,85 iken 4. günde, 0,90 iken 2. günde, bu değerlerin üzerinde de 24 saat içinde küf gelişmesi gözlenir. *A.flavus*'un *A.parasiticus* 'a göre biraz daha yavaş geliştiği bilinmektedir. Genel olarak küfler geniş bir pH aralığında gelişebildiklerinden ( pH 3- 8 ) pH değişikliklerinden fazla etkilenmezler ancak pH'ın 5- 5,5 olan optimum değerden uzaklaşması diğer gelişmeyi etkileyen faktörlerin etkilerini arttırır. pH'nin 4-7 arasında değişmesi küf gelişmesinde önemli bir değişiklik meydana getirmez. Ancak pH'ın 3 olması, *A.flavus* gelişiminin önemli derecede gerilemesine sebep olmaktadır (Holmquist et al, 1983).

Bazı kimyasal maddelerin küf gelişimini hatta toksin sentezini önlediği belirlenmiştir. Ancak bunların bir çoğu sağlığa zararlı olduğundan besinlerde kullanılmamaktadır. Thiram, ortocide, botran, sodyum sülfid, flopet, benomil, formik asit tuzu, asetik asit tuzu, propiyonik asit tuzu, bütirik asit tuzu *A. Flavus* gelişimini tamamen önlemektedir (Derici, 1997).

Diğer bir çalışmada, 250 ppb Afla B<sub>1</sub> içeren kuru incirler % 1'lik sodyumbisülfid ile muamele edilince 72 saatte aflatoksinin % 28.2 sinin, % 2'lik hidrojen peroksit ile muamele edilince % 65.5 inin bozunduğu gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada UV ışık altında 1 saat bekletilirse % 45.7 sinin bozunacağı da belirtilmiştir (James et al, 1992).

Bazı metaller aflatoksin üretimini engelleyebilmektedir. Çinko, aflatoksin üretimini stimüle ederken, bazı iz metalleri düşük konsantrasyonlarda aflatoksin üretimini inhibe edebilmektedir (Derici, 1997).

Kuru incirlerde, UV lamba altında parlak yeşilimsi sarı floresans (BGYF) veren incirlerin ayrılarak, partilerin aflatoksin yoğunluğunun düşürülebileceği, yani kuru incirlerde, BGYF ile aflatoksin arasında yüksek ilişki bulunduğu belirlenmiştir (Demir ve ark, 1988).

UV lambanın fonksiyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, UV altında sarı-yeşil floresans veren 92 adet kuru incir örneğinden 54 tanesinde, aflatoksin varlığı saptanamamış, floresans vermeyen 74 adet incirden 1 tanesinde aflatoksin gözlenmiştir. Buna göre UV lambanın işletmelerde fonksiyonel olarak kullanılmasının yararlı olacağı belirtilmiştir (Konca ve Gülseri 1990).

1988'de yapılan bir çalışmada 62 adet BGYF gösteren kuru incirde, 10 numunede 0.2 ppb'den az, 1 numunede ise 1000 ppb den fazla olmak üzere 0.2-1000 ppb arasında aflatoksin B<sub>1</sub> değerleri elde etmişlerdir (Steiner et al, 1988).

Diğer bir çalışmada Özay ve ark. (1989), 106 BGY floresanslı kuru incir örneğinde aflatoksin analizi yapmışlar ve 7 numunede 1 ppb den az olmak üzere diğer numunelerde 1-6344.8 ppb arasında değişen Afla B<sub>1</sub> saptamışlardır (Gül, 1992).

1992'de Bornova'da yapılan bir çalışmada, farklı özellikte BGYF gösteren toplam 64 kuru incirde aflatoksin analizi yapılmış ve numunelerin 61'inde değişik miktarlarda aflatoksin saptanmış, 3'ünde aflatoksin saptanmamıştır. Ayrıca Gül, numunelerde incelenen meyve rengi ile BGYF arasında önemli derecede ilişki belirlemiştir. Meyve rengi koyulaştıkça

BGYF'li meyve oranının arttığı, meyve rengi açıldıkça BGYF'li meyve oranının azaldığını saptamıştır. Bu nedenle, meyve rengini olumsuz etkileyecek faktörlerin aflatoksin oluşumunu hızlandırdığını savunmuştur (Gül, 1992).

Aflatoksin analizi söz konusu olduğunda, UV spektrofotometresi, seçiciliğinin az olması ve dedeksiyon limitinin çok yüksek olması nedeniyle tercih edilmemektedir. Onun yerini son yıllarda, aflatoksinlerin floresans özelliği sebebiyle, spektroflorimetreler almıştır (Miraglia and Berra, 2000).

TLC ile yapılan ve incirde aflatoksin miktarlarının incelendiği bir çalışmada, 24 adet UV lamba altında ışımaya veren ve 24 adet ışımaya vermeyen 48 adet numune kullanılmış, bunlardan ışımaya vermeyen 24 adet numunede aflatoksine rastlanmamıştır. Işıma veren numunelerin ise 12 tanesinde Afla B<sub>1</sub> (ort. 205.47 ppb) , 8 numunede Afla B<sub>2</sub> (max 16.06 ppb), 7 numunede Afla G<sub>1</sub> (ort. 79.15 ppb), 3 numunede Afla G<sub>2</sub> ye (ort. 2.63 ppb) rastlanmıştır (Derici, 1997).

Van ilinde açık olarak satışa sunulan kırmızı pul biberlerde Afla B<sub>1</sub> varlığını belirlemek amacıyla yapılan ve yöntem olarak TLC yönteminin kullanıldığı bir çalışmada, kırmızı pul biber numunelerinde Afla B<sub>1</sub> miktarı 1.10- 44.00 ppb (ort. 8.66 ± 1.31) arasında saptanmıştır. Afla B<sub>1</sub> miktarı, incelenen kırmızı pul biberlerin % 57.5'inde (23 numune) ülkemizde izin verilen sınır değer (5 ppb) üzerinde, % 7.5'inde (3 numune) ise sınır değerde saptanmıştır. Sonuç olarak, analizi yapılan kırmızı pul biberlerin tamamının Afla B<sub>1</sub> ile değişik düzeyde kirlenmiş olduğu belirlenmiştir (Ağaoğlu, 1999).

Afla M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub>, Afla B<sub>1</sub> ve Afla B<sub>2</sub> nin hidroksil türevleridir. Özellikle süt ve süt ürünlerinde ve vücutta idrar ve safra salgısında belirlenmiştir.

Türkiye'de İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile yapılan çalışmalarda, Demirer, süt, peynir, süt tozu, tereyağı, yoğurt ve ayran olmak üzere toplam 334 numuneyi; Çoksöyler ve Köşker, 101 adet çiğ süt örneğini; Kardeş, 123 adet değişik peyniri; Gürbüz ve arkadaşları Konya'da, 240 peynir numunesini analiz etmişler ve bu çalışmalar sonucunda numunelerinde Afla M<sub>1</sub> tespit edememişlerdir (Oruç, 2003).

HPLC ile süt numunelerinde Afla M<sub>1</sub> değerini saptamak için yapılan bir çalışmada, Özkaya ve arkadaşlarının, Türkiye'de 25 ilden topladıkları süt numunelerinin Afla M<sub>1</sub> ortalamalarına baktığımızda, Antalya (64 ng/l), Ankara (57 ng/l), Balıkesir (145 ng/l), Bursa

(142 ng/l),Elazığ (94 ng/l), Kahramanmaraş (94 ng/l) ve Konya'daki (60 ng/l) miktarların tolerans düzeyini (50 ng/l) aştığı belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, Ankara ve İzmir piyasasından toplanan peynir numunelerinde Afla M<sub>1</sub>'in rastlanma oranı yüksek olmasına rağmen (% 44.9), bir tanesi (500 ng/kg) tolerans limitini aşmaktadır ( Özkaya, 2002).

Kuru kayısı da aflatoksin oluşumunun ve düzeylerinin incelendiği bir çalışmada, TLC ile HPLC mukayese edilmiştir. TLC de CB (Contaminant Branch) ekstraksiyonu ile ortalama geri kazanım % 85 olarak bulunurken, HPLC de immunoaffinite kolon kullanılarak yapılan geri kazanım % 97 olarak bulunmuştur (Çelik, 2001).

Sığır, koyun ve tavuk karaciğerlerinde aflatoksin düzeylerinin belirlenmesine dair bir çalışmada şu sonuca varılmıştır. Aflatoksin analizlerinde kullanılan geleneksel bir ve iki boyutlu TLC teknikleri, nitel analizlerde üstün olmasına rağmen, ancak yarı kantitatif değerlendirmeye olanak tanımaktadır. HPLC ile kesin kantitatif sonuçlar elde edilmesine ve HPLC'nin hızlı olmasına karşın TLC ye göre oldukça pahalıdır (Kelle ve ark, 1979).

Yerfıstığı yağında aflatoksin analizinin yapıldığı bir çalışmada, TLC'nin HPLC'ye göre daha kesin sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Dell et al, 1990).

Farklı numunelerdeki mikotoksinlerin, kantitatif analizinin yapıldığı bir çalışmada, TLC ve HPLC karşılaştırılmış ve TLC metodunun doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve geri kazanım açısından HPLC metoduna eşdeğer olduğu vurgulanmıştır (Tosch et al, 1984).

Yünde Afla B<sub>1</sub>'in tayininin yapıldığı bir çalışmada, TLC sonuçlarının HPLC sonuçları ile uyum içinde olduğu belirtilmiştir (Lee et al, 1990).

Mikotoksin analizinde uygulanan metodların kesinlik parametrelerinin hesaplandığı bir çalışmada, TLC ve HPLC'nin kesinlik olarak aynı, ELISA yönteminin ise bunlara göre kesinlik bakımından zayıf olduğu sonucuna varılmıştır (Horwitz et al, 1993).

Floresans ve UV dedektörler, molekülde floresans ya da UV kromoforların varlığına ihtiyaç duyarlar, bu yüzden HPLC yönteminde türevlendirmeye ihtiyaç vardır. Dolayısıyla TLC yöntemi, türevlendirilmemiş mikotoksinlerin analizinde HPLC'ye göre daha elverişlidir (Martin et al, 1986 ).

TS 541'de, yağlı kuru meyvelerde aflatoksin tayin metotları olarak ekstraksiyon işleminde CB (Contaminant Branch) ve BF (Best Food) metodun yaygın olarak kullanıldığı

belirtilmiştir. AOAC de bildirilen TLC metotları, incirde Afla B<sub>2</sub>-Afla G<sub>1</sub> bölgesinde görülen girişimden dolayı pek tatmin edici sonuçlar vermemiştir. Bu nedenle Allen 1974'te bu girişimi önlemek için iki boyutlu antigonal spotlama tekniğini kullanmıştır (Gül, 1992).

1989 yılında yapılan bir çalışmada incirlerde aflatoksin saptanmasında Romer ve CB metodları karşılaştırılmış ve modifiye Romer metodunu tavsiye etmiştir (Altuğ, 1988).

ELISA ve TLC ile yapılan bir çalışmada, floresanslı kuru incirlerde metanol ile ekstraksiyon işlemi yapılmış ve iki yöntem kıyaslanarak ELISA ile bulunan değerlerin TLC metodu ile bulunan değerlerden uzak olmadığı belirlenmiştir (Reichert et al, 1988).

TLC, düşük düzeylerde aflatoksin içeren numunelerde ELISA ya göre daha güvenilir sonuçlar verir (Dell et al, 1990).

Tarımsal ürünlerde aflatoksin analizi için yöntemlerin incelendiği bir araştırmada, TLC nin ELISA ya göre daha kesin sonuçlar verdiği bulunmuştur (Whitaker et al, 1996).

DON (Deoksinivalenol)'ün kantitatif olarak ölçülmesinde TLC ve ELISA nın kıyaslandığı bir çalışmada, ELISA ile yüksek geri kazanımlar elde edilmediği ancak TLC ye göre çok hızlı ve az yorucu olduğu belirtilmiştir (Wolf Hall et al, 1996).

Sarımehmetoğlu ve arkadaşları, ELISA ile, Ankara'da, değişik firmalara ait 85 pastörize süt örneğinin % 63.86'sında belirlenen Afla M<sub>1</sub>'in, Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen tolerans limitlerini aştığını bildirmiştir (Sarımehmetoğlu et al, 2004).

Yaroğlu, Bursa'daki T.S.K.'ne bağlı birliklere alınan kaşar, eritme ve beyaz peynirlerden aldığı 300 örneğin % 7.66'sında Afla M<sub>1</sub> tespit etmiş, numunelerin % 1.66'ndaki düzeylerin Türk Gıda Kodeksi tolerans düzeyini geçtiğini bildirmiştir (Yaroğlu et al, 2005).

Tarımsal alanda aflatoksin ölçümü için birçok yöntemle çalışmış olan Whitaker 1996 da yayınladığı makalesinde, ELISA nın kesinliğinin TLC ye göre daha az olduğunu belirtmiştir (Whitaker et al, 1996).

Wolf Hall ve arkadaşlarının 1996 yılında yayınladıkları makalede, ELISA nın yüksek geri kazanım vermediği, fakat, TLC ye göre daha hızlı ve daha az zahmetli olduğunu belirtmiştir (Wolf Hall et al, 1996).



## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1 Araştırma Materyali

Bu çalışmada kullanılan Aydın yöresi kuru incirleri Aydın Borsası Gıda Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Analizi yapılan ilk 20 adet numune "A numuneleri" olarak adlandırılmış, ikinci 18 adet numuneye de "C numuneleri" adı verilmiştir.

Numunelerin analizi için, İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Florimetrik yöntem kullanılmıştır.

İnce tabaka kromatografisi için iki yöntem seçilmiştir ve bu iki yöntemin incir numunelerine uygulanabilirliği tartışılmıştır. Birinci yöntem, Roberts B.A. and Patterson D.S.P. ye ait, "Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs using a novel membrane cleanup procedure" adlı makalede kullanılan yöntemdir. Bu yöntem 1975 yılında AOAC'de yayınlanmış ve karışık hayvan yemlerinde çeşitli mikotoksinlerin analizi için kullanılmıştır. Daha sonra bu yöntem geliştirilerek, 1982 yılında Şanlı ve ark. tarafından karma yemlerde aflatoksin analizi yapmak amacıyla kullanılmıştır (Şanlı ve ark, 1982).

İkinci uygulanan yöntem, Stroka ve Anklam'ın 'Journal of Chromatography A' da yayınlanan "Standard operation procedure for the determination of aflatoxins in various food matrices by ICA clean-up and TLC" adlı makalede uyguladıkları yöntemdir. Bu yöntemde diğer TLC yöntemlerinden farklı olarak, aflatoksinleri safsızlıklardan ayırma işlemi için, immunoaffinite kolonlar kullanılmıştır (Stroka et al, 1999).

HPLC yöntemi olarak, AOAC'nin 999.07 sayılı "Aflatoxin B<sub>1</sub> and Total aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste, and Paprika Powder" adlı resmi yöntemi kullanıldı (Scott, 1995).

Florimetrik yöntem olarak, ABD Tarım Bakanlığı Tahıl Kontrol Servisi'nin (USDA-FGIS) kabul ettiği yöntem kullanıldı (Vicam, 1999).

## 4.2 Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Deneyler sırasında kullanılan cihazlar aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 9. Analizlerde kullanılan cihazlar

1	CAMAG UV lamba (262-365nm)
2	HP-AGILENT HPLC cihazı
3	GL Sciences Inc. İnertsil ODS-3 ters faz Sıvı Kromatografi Kolonu
4	BUCHI R-3000 Rotavapor
5	KobraCell
6	Etüv
7	Fluoroskan Ascent FL 2.5 Spektroflorimetre

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler alfabetik sıraya göre aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 10. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Sıra No	Maddenin adı	Markası	Katalog No
1	Alüminyumklorür	Merck	801081
2	Aseton	Merck	100020
3	Asetonitril (HPLC grade)	Merck	100030
4	Dietil Eter (susuz)	Merck	100929
6	Etil Asetat (HPLC grade)	Merck	100868
7	Florisil (for column chrom.)	Merck	112518
8	Formik asit % 98-100 GR for analysis	Merck	100264
9	Hidroklorik asit	Merck	100317
10	İyot	Merck	104761
11	İzooktan	Teknik	
12	Kloroform	Merck	102444
13	Kurşun Asetat	Teknik	
14	Metanol (HPLC grade)	Merck	106018
15	Metanol	Merck	106008

16	n-Hekzan	Merck	104368
17	Nitrik Asit	J.T.Baker	7622
18	Parafin	Merck	107162
19	PBS tablet	Merck	106018
20	Potasyum Bromür	Riedel	02110
21	Potasyum Klorür	Merck	104936
22	Rhone Total Aflatoxin 1000 ppb	Rhone	SE 698/B
23	Silika jel 60G	Merck	107731
24	Sodyum Klorür	Riedel	13423
25	Sodyumbikarbonat	Teknik	
26	Sodyumsülfat	Merck	106649
27	Sülfürik Asit	Merck	100713
28	Ters-Butil-Metil Eter	Merck	101845
29	Toluen	Merck	108327
30	2-propanol GR for analysis	Merck	109634
31	Alüminyum plaka (Silika gel 60)	Merck	105553
32	Cam plaka (Silika gel 60)	Merck	105721

### **4.3 Kullanılan Yöntemler**

Kuru incir numunelerindeki aflatoksin düzeylerinin tespiti ve yöntemlerin özelliklerinin incelenmesi için Florimetrik yöntem, TLC yöntemi ve HPLC yöntemi kullanıldı.

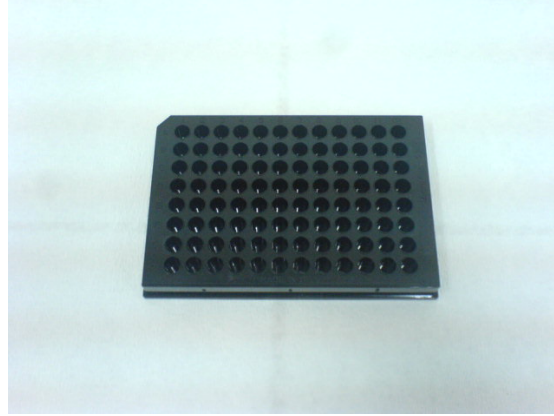
#### **4.3.1 Florimetrik yöntem ile aflatoksin analizi**

Bu analiz yönteminde Fluoroskan Ascent FL 2.5 marka spektroflorimetre cihazından yararlanıldı. Dört aşamada gerçekleştirildi: Ekstraksiyon, Süzme, İmunoaffinit Kolon ile Ayırma, Ölçüm.

Ekstraksiyon aşamasında aflatoksin içeren 50 g numune, 150 ml teknik metanol ve 100 ml distile su ve 5 g tuz ilave edilerek Waring blender da 3 dk yüksek hızda karıştırıldı.

Daha sonra karışım ilk önce normal filtre kağıdı kullanılarak, ardından Whatman no:4 filtre kağıdı kullanılarak süzüldü. Süzme işlemi 5 dk sürmüştür.

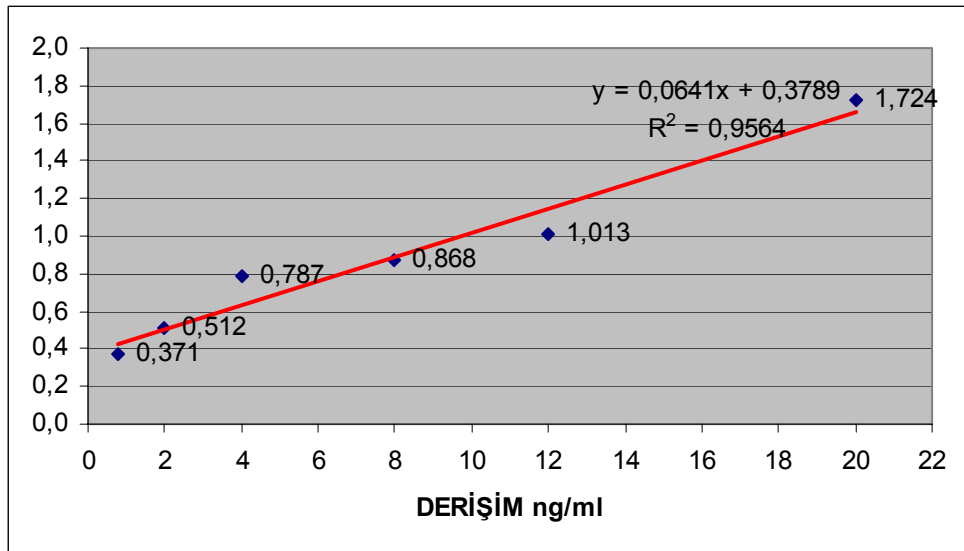
İmunoaffinit kolonlar buzdolabından çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi için bir süre beklendi. Daha sonra ağız kısımları kesilerek kurumaması için 10 ml PBS geçirildi. Bu işlemlerden sonra 10 ml'lik numune süzüntüsü pipet yardımıyla alınarak, saniyede 1-2 damla akacak şekilde (3 ml/dk) imunoaffinite kolondan geçirildi ve behere alındı. Ardından yıkama işlemi için akış hızı 3 ml/dk olacak şekilde 15 ml saf su geçirildi. Yıkama işleminden sonra 3-5 kez hava geçirildi. İmunoaffinite kolonda tutulan aflatoksinleri elue edebilmek için, 0.5 ml metanol IAC den geçirildi, ardından 0.75 ml daha metanol geçirildi. Böylece aflatoksinler vialde elde edilmiş oldu. Tamamen safsızlıklardan ayrılan numune, “microfluor black plate” adı verilen spektroflorimetre plakasına konuldu ve 365 nm de floresans değerlerine bakılarak miktarları hesaplandı. Analiz işlemi yaklaşık 60 saniye sürdü.



Şekil 27. Microfluor black plate

Çizelge 11. Florimetrik yöntemde  
Kalibrasyon Grafiği Değerler Tablosu

Aflatoksin Standart Numarası	Aflatoksin Standardı Derişimi (ng/ml)	Ölçülen Değer
1	0.8	0,371
2	2	0,512
3	4	0,787
4	8	0,868
5	12	1,013
6	20	1,724



Şekil 28. Florimetrik yöntemde Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 12. Numunelerde toplam Aflatoksin değerleri (Spektroflorimetre)

Sıra Numarası	Numune Adı	Spektroflorimetre de tespit edilen Afla B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> derişimi (ng/ml)
1	A1	12.514
2	A2	25.422
3	A3	9.045
4	A4	16.218
5	A5	11.210
6	A6	5.890
7	A7	11.772
8	A8	24.353
9	A9	7.878
10	A10	8.867
11	A11	7.299
12	A12	9.773
13	A13	6.672
14	A14	13.849
15	A15	6.155
16	A16	10.226
17	A17	6.948
18	A18	10.788
19	A19	7.545
20	A20	12.037
21	C1	12.738
22	C2	11.700
23	C3	12.062
24	C4	10.044
25	C5	12.633
26	C6	23.015
27	C7	2.310
28	C8	16.169

29	C9	17.505
30	C10	8.161
31	C11	8.322
32	C12	8.308
33	C13	4.380
34	C14	3.843
35	C15	8.340
36	C16	7.133
37	C17	10.456
38	C18	125.120

### 4.3.2 İnce tabaka kromatografisi ile aflatoksin analizi

TLC de, florodensitometri cihazı olmadığı için, dedeksiyon aşaması UV lamba ile gerçekleştirildi. Dolayısıyla kantitatif bir analiz yapılamadı. Çıplak gözle aflatoksinler, standart beneklerine bakılarak tespit edildi.

İlk önce sistemin duyarlılığını ölçmek amacıyla, 1000 ng/ml lik toplam aflatoksin standardı, silikajel G kaplı alüminyum plakaya 100 µl, 50 µl, 25 µl, 10 µl ve 5 µl lik hacimler halinde uygulandı. İşlem tamamladıktan sonra, dedeksiyon aşamasında, 100 µl, 50 µl, 25 µl, 10 µl lik hacimlerde, dört tip aflatoksin (Afla B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) çıplak gözle gözlemlenebildi.

Toplam aflatoksin standardında her aflatoksinden 250 ng/ml vardır. Bu standarttan 10 µl alınırsa, bu hacimde, her bir aflatoksinden 2.5 ng bulunur. Bu da bize TLC ile her bir aflatoksin için 2.5 ng'ı, kalitatif olarak tespit edebileceğimizi gösterdi.

Literatürde bulunan TLC yöntemlerinden, bu çalışma için en uygununu belirlemek amacıyla, metot geliştirme yoluna gidildi.

Bu işlem için literatürdeki iki farklı yöntem denendi ve hangisinin en iyi sonucu verdiği ve hangisinin daha kullanışlı olduğu belirlendi. Kullandığımız yöntemlerden ilki, 1975 yılında AOAC de yayınlanmış olan Roberts B.A. and Patterson D.S.P. ye ait yöntemdir, bu yöntemi 1982 yılında Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nden Şanlı ve ark. da kullanmıştır. Bu yöntemin işleyişi şu şekildedir:

25 g incir numunesi alındı ve 100 ml asetonitril - % 4 potasyum klorür çözeltisi (90 + 10) karışımı ilave edildi. Mekanik karıştırıcıda 3 dakika çalkalandı.

Whatman No:4 filtre kağıdından süzüldü. Süzüntüden 50 ml alınarak, buna 5 ml % 20 lik kurşun asetat katıldı. Yönteme uygun olarak 2 dakika çalkalandı ve 5 dakika bekledikten sonra 5 ml doymuş sodyum klorür çözeltisi ilave edildi. Yine 2 dakika çalkalandı, 5 dakika beklendi ve süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü ayırma hunisine koyuldu, üzerine yağ vs. maddelerini gidermek için 2 x 25 ml izooktan ilave edildi ve üstteki izooktan kısmı atıldı. Sulu asetonitril kısmına 25 ml 0.1 N NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi ilave edildi ve karıştırıldı. Mikotoksinler önce 25 ml ve sonra 3 x 10 ml kloroformla ekstre edildi her seferinde aşağıda toplanan kloroform kısmı susuz sodyum sülfattan geçirilerek kurutuldu (bu ekstrakt 1' dir)



Ayırma hunisinde kalan sulu kısma 1 ml 1 N HCl ilave edildi ve bu ortamdaki mikotoksinler (okratoksin ve sitrinin) 3 x 10 ml kloroformla ekstre edildi. Yine her seferinde kloroform ekstraktı susuz sodyum sülfattan geçirilerek kurutuldu (bu ekstrakt 2'dir). Ekstraktlar, rotavaporda kurumaya yakına kadar buharlaştırıldı, ekstrakt 2 TLC için saklandı. Ekstrakt 1 ise 3 x 1 ml asetonitril ile karıştırılarak kolona aktarıldı.

Ekstrakt 1, yukarıda belirtildiği gibi kolona aktarıldı, kolonun musluğu açılarak var olan sıvı akıtıldı. Önce 100 ml hekzan, sonra aynı miktarda susuz dietileter geçirilerek kolon yıkandı. Daha sonra, 150 ml kloroform-metanol (97+3) ile aflatoksinler elüe edildi. Eluat rotovaporda buharlaştırıldı ve 100 µl benzol-asetonitril (98+2) veya klorofomda çözdürülerek TLC'ye uygulandı.

Silika jel -G ile 0.25 mm kalınlığında kaplanmış ve 105 °C'de 60 dakika süreyle etkinleştirilip sıcakken kurutucuya alınarak bir gece bekletilen plakaya ekstrakt 1 ve 2'den 5-20 µl arasında uygulandı. Aynı plakaya aflatoksin standardından (kloroformda aflatoksin 5 µg/ml ) miktarda uygulandı. Plaka toluen-etil asetat-formik asitten (60+30+10) oluşan karışımda geliştirildi. Daha sonra da plaka, UV lamba altında uzun dalga boyunda (365 nm) ve kısa dalga boyunda (254 nm) kalitatif olarak incelendi.

İncir numunelerinde aflatoksin analizi için ikinci yöntem olarak literatürden, Stroka ve Anklam'ın 'Journal of Chromatography A' da yayınlanan "Standard operation procedure for the determination of aflatoxins in various fod matrices by ICA clean-up and TLC" adlı yöntemi seçildi (Stroka et al, 1999).

Bu yönteme uygun olarak, 50 g incir pastasına 200 ml metanol-su (8+2) karışımı eklenerek yüksek hızda blendır da 3dk karıştırıldı. Daha sonra karışım Whatman No:4 filtre kağıdından süzüldü. Süzüntünün 20 ml'si alınarak, 140 ml PBS (Fosfat Tamponu) çözeltisi ile karıştırıldı. Karışım tekrar süzüldü.

Süzme işlemi tamamlanırken, IAC (Immunoaffinity column) lerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve içinden 10 ml PBS geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Süzme işlemi tamamlandıktan sonra süzüntüden 70 ml alındı ve akış hızı 3ml/dk olacak şekilde IAC den geçirildi. Akış hızını sabit tutabilmek için şırınga yardımıyla kolona basınç uygulandı.

İşlem tamamlandıktan sonra, kolonda istenmeyen maddeleri temizlemek için, % 11 metanol, % 0,5 Tween-20 (polioksietilen-sorbitan monolorat) içeren 15 ml lik sulu çözelti uygulandı. Daha sonra da kolon 10 ml saf su ile yıkandı.

Yıkama işleminden sonra şırınga yardımıyla kolondan 3-4 defa hava geçirildi. Son olarak kolonda tutulan aflatoksinleri elue edebilmek için, kolondan 1,5 ml metanol geçirilerek vialde toplandı. Vial, elusyondan önce 50 µl lik metanol-formik asit çözeltisi ile yıkandı.

Elde edilen karışımın çözgeni olan metanol 40 °C de rotavaporda buharlaştırıldı. Daha sonra vialde 150 µl hekzan-aseton-metanol çözeltisi (90+5+5) eklendi ve plakaya uygulandı.

Plaka olarak silikajel 60 kaplı alüminyum plaka kullanıldı. Bu plakaya numuneler 100 µl lik hacimler halinde uygulandı ve plaka kromatografi tankına konuldu. Tankta yönteme uygun olarak tersiyer bütül metil eter-metanol-su (96+3+1) çözeltisi mobil faz olarak kullanıldı. 45 dakikalık yürütme işleminden sonra plaka UV lamba altında incelendi. Sonuçta sadece toplam aflatoksin standardına ait benekler gözlemlendi ama numunelerdeki aflatoksin görülemedi.

Aynı yöntem 18 adet C numunelerine uygulandı. Plakaya her numuneden 20 µl lik hacimler uygulandı. Uygulamadan önce yine plakalar 45 dk etüvde aktifleştirildi. Kromatografi tankında, aynı mobil faz kullanılarak yapılan yürütme sonunda, aflatoksin standartları net olarak gözlemlendi, ancak numunelerden yalnızca 1 tanesinde Afla B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> gözlemlendi.

Tüm yapılan işlemler sonunda, UV lamba altında aflatoksinlerin floresans özelliğini arttırmak amacıyla, plakaya alüminyum klorür ayırıcı (etil alkolde % 20'lik) püskürtüldü. Bununla tam bir gözlem yapılamadığında sülfürik asit ayırıcı (su ile % 25 lik) kullanıldı.

### 4.3.3 HPLC ile aflatoksin analizi

HPLC analizleri sırasında HPLC cihazında uygulanan koşullar ve parametreler Çizelge 15’de gösterilmiştir.

Çizelge 13. HPLC parametreleri

Enjeksiyon Hacmi	50µL
Akış Hızı	1.000 ml/dk
Durdurma Zamanı	15 dk
Mobil Faz	MeOH-ACN-Su
Çalışılan Basınç	83 bar
Max. Basınç	400 bar
Sıcaklık	40 °C
Dedektör	Floresans
Ex. dalga boyu	362 nm
Em. dalga boyu	425 nm
HPLC kolon	C18

HPLC cihazında hareketli faz olarak su -metanol-asetonitril karışımı kullanıldı. Buna göre, 600 ml HPLC saflıkta su 300 ml metanol ve 200 ml asetonitril mezür yardımıyla ölçülerek 1100 ml lik bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltinin 100 ml’lik kısmı atıldı ve türevlendirmeyi sağlamak amacıyla 1000ml’sine 120 mg potasyum bromür ve 100 µL saf nitrik asit ilave edildi. Böylece HPLC için hareketli faz hazırlanmış oldu.

Daha sonra kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için standartlar hazırlandı ve Afla B<sub>1</sub>,B<sub>2</sub>,G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub> için ayrı ayrı standart grafiği çizildi. Kalibrasyon eğrisi 6 basamaklı olarak alındı ve bu doğrultuda elimizde bulunan 1000 ng/ml toplam aflatoksin standardından ilk önce 100µl alıp 900 µl metanol ile seyrelterek 100 ppb lik bir ara standart oluşturuldu. Çizelge 16’da gösterildiği şekilde 0,8-2-4-8-12-20 ppb lik 6 adet standart hazırlandı.

Çizelge 14. Aflatoksin Standartları Hazırlanışı

Standart Çözeltinin Konsantrasyonu(ppb)	Ara standarttan alınan miktar ( $\mu$ l)	Solvent Miktarı (ml)	Su miktarı (ml)
0.8	40	1.46	1
2	100	2.4	2.5
4	100	1.15	1.25
8	100	0.525	0.625
12	100	0.300	0.400
20	100	0.150	0.250

Daha sonra hazırlanan aflatoksin standartları HPLC ye enjekte edildi ve her bir aflatoksin için standart grafiği çizildi.

Standart grafikleri çizildikten sonra numuneler, Aydın Ticaret Borsası Gıda Laboratuvarı'nın kullandığı, kuru incir numunelerinde aflatoksin tayini için AOAC'nin 999.07 sayılı resmi yöntemine göre analizlendi.

Bu yönteme göre ekstraksiyon aşamasında 50 g incir numunesi tartıldı ve üzerine 150 ml teknik metanol, 100 ml distile su ve 5 g tuz ilave edilerek blendırda yüksek hızda 3 dakika boyunca karıştırıldı. Daha sonra ekstrakt, önce normal filtre kağıdından daha sonra Whatman No:4 filtre kağıdından süzüldü.

IAC'ler kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Daha sonra IAC'leri kullanıma hazır hale getirmek için, 10 ml PBS (PhosphateBufferSaline ) çözeltisi akış hızı 2-3 ml/dk olacak şekilde kolonlardan geçirildi.

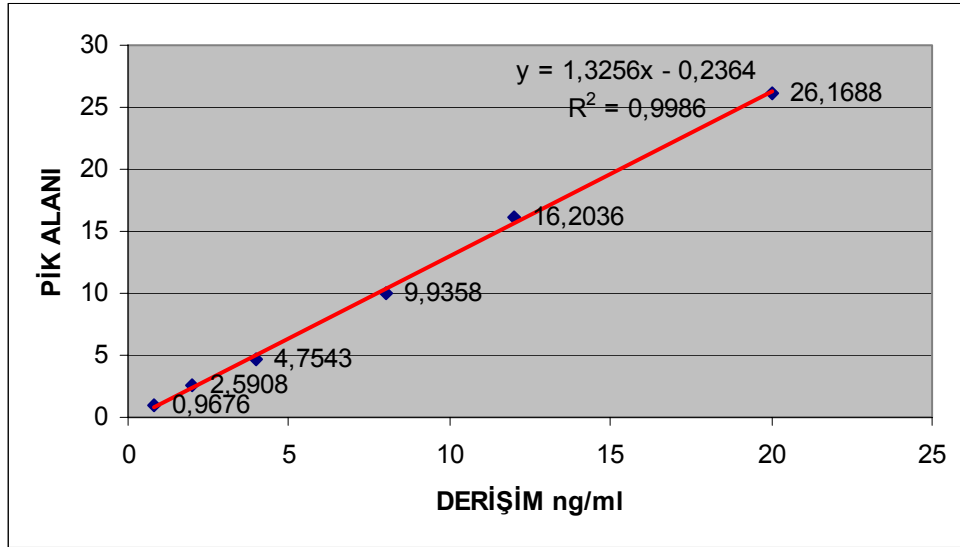
Süzme işlemi tamamlandıktan sonra, pipet yardımıyla süzüntüden 10 ml alındı ve akış hızı 3 ml/dk olacak şekilde immunoaffinite kolondan geçirildi. Akış tamamlandıktan sonra kolondan aynı akış hızında 15 ml saf su geçirildi. Ardından şırınga yardımıyla IAC'lerden 3-4 kez hava geçirildi.

Aflatoksinleri vialde almak için, 0.5 ml metanol IAC den geçirildi, 1 dk beklendi ve 0.75 ml daha metanol geçirildi. Böylece aflatoksinler vialde elde edilmiş olur.

HPLC ye numunenin aktarımı oto-örnekleyici ile yapıldı. Buna göre numuneler oto-örnekleyiciye dizildi ve her birinin analizi 15 dk sürecek şekilde cihaz ayarlandı.

Çizelge 15. Afla B<sub>1</sub> için Kalibrasyon Grafiği Değerler Tablosu (HPLC)

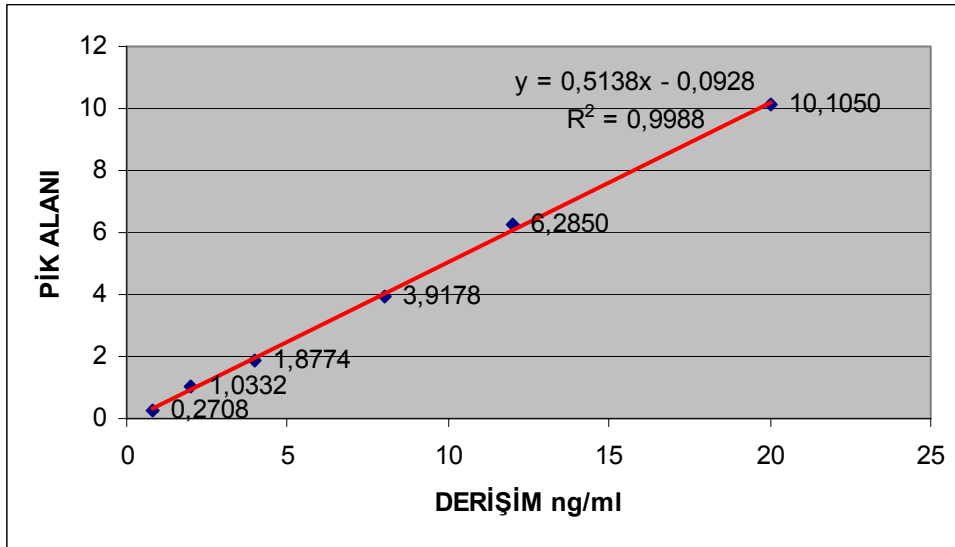
Aflatoksin Standart Numarası	Aflatoksin Standardı Derişimi (ng/ml)	Alan	Derişim/Alan
1	0.8	0.9676	0.8268
2	2	2.5908	0.7720
3	4	4.7543	0.8413
4	8	9.9358	0.8052
5	12	16.2036	0.7406
6	20	26.1688	0.7643



Şekil 29. Afla B<sub>1</sub> için Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 16. Afla B<sub>2</sub> için Kalibrasyon Grafiği Değerler Tablosu (HPLC)

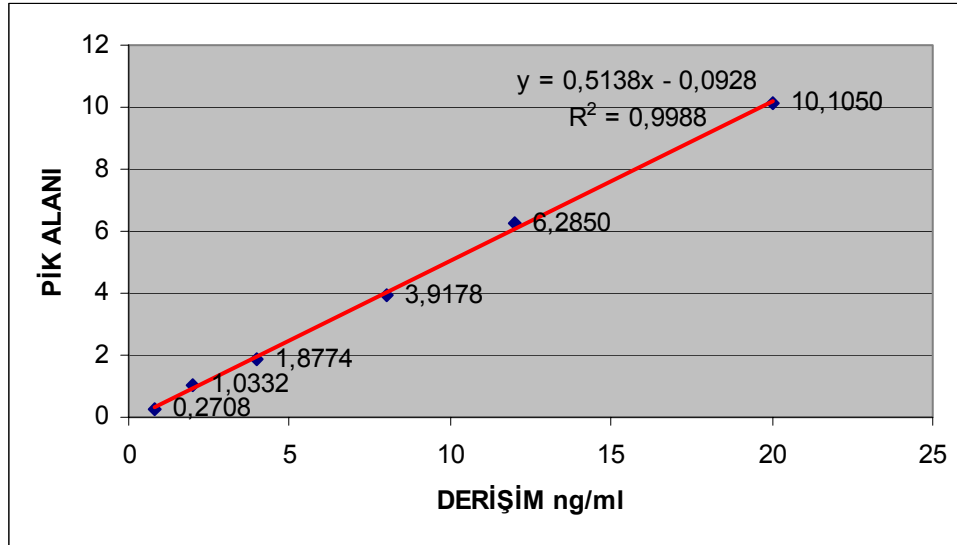
Aflatoksin Standart Numarası	Aflatoksin Standardı Derişimi (ng/ml)	Alan	Derişim/Alan
1	0.8	1.3485	0.5932
2	2	3.4973	0.5719
3	4	6.6014	0.6059
4	8	13.6562	0.5858
5	12	22.2152	0.5402
6	20	36.2779	0.5513



Şekil 30. Afla B<sub>2</sub> için Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 17. Afla G<sub>1</sub> için Kalibrasyon Grafiği Değerler Tablosu (HPLC)

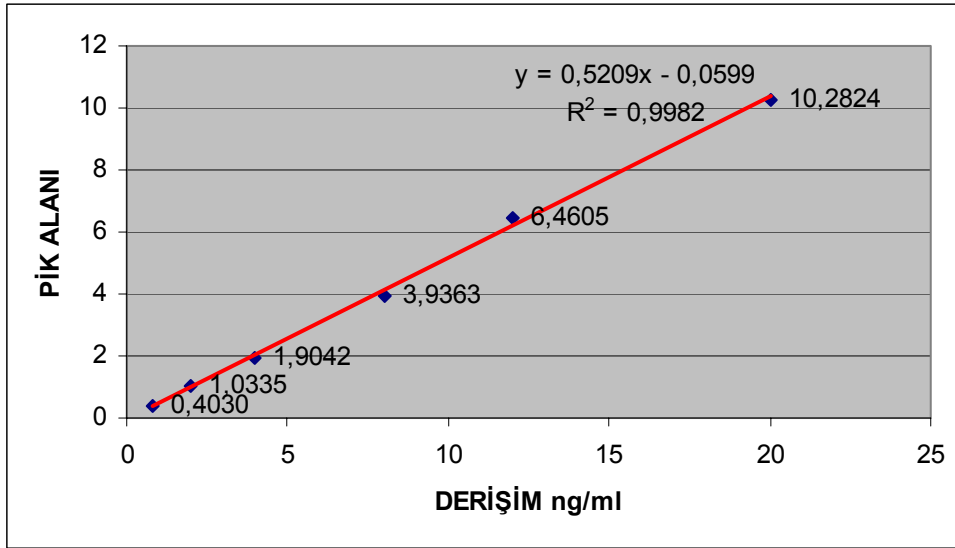
Aflatoksin Standart Numarası	Aflatoksin Standardı Derişimi (ng/ml)	Alan	Derişim/Alan
1	0.8	0.2708	2.9541
2	2	1.0332	1.9357
3	4	1.8774	2.1306
4	8	3.9178	2.0420
5	12	6.2850	1.9093
6	20	10.1050	1.9792



Şekil 31. Afla G<sub>1</sub> için Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 18. Afla G<sub>2</sub> için Kalibrasyon Grafiği Değerler Tablosu (HPLC)

Aflatoksin Standart Numarası	Aflatoksin Standardı Derişimi (ng/ml)	Alan	Derişim/Alan
1	0.8	0.4030	1.9849
2	2	1.0335	1.9350
3	4	1.9042	2.1006
4	8	3.9363	2.0323
5	12	6.4605	1.8574
6	20	10.2824	1.9451



Şekil 32. Afla G<sub>2</sub> için Kalibrasyon Grafiği



Çizelge 19. Numunelere ait **Afla B<sub>1</sub>** Değerleri (HPLC)

Sıra Numarası	Numune Adı	Analiz için Alıkonulma Süresi (dk)	HPLC de tespit edilen derişimi (ng/ml)
1	A1	10.755	6.137
2	A2	10.740	18.711
3	A3	10.770	3.566
4	A4	10.768	6.752
5	A5	10.771	7.058
6	A6	10.737	0.681
7	A7	10.772	2.077
8	A8	10.788	16.304
9	A9	10.767	1.966
10	A10	10.765	1.123
11	A11	10.762	1.182
12	A12	10.746	4.013
13	A13	10.766	1.005
14	A14	10.776	2.135
15	A15	10.762	1.178
16	A16	10.741	2.116
17	A17	10.777	0.798
18	A18	10.742	1.938
19	A19	10.779	1.221
20	A20	10.782	2.131
21	C1	10.535	3.124
22	C2	10.534	3.062
23	C3	10.539	2.603
24	C4	10.572	2.384
25	C5	10.617	2.800
26	C6	11.258	14.889
27	C7	----	----

28	C8	11.178	7.758
29	C9	11.067	5.662
30	C10	11.167	0.643
31	C11	11.500	0.501
32	C12	11.506	1.130
33	C13	10.947	0.250
34	C14	----	----
35	C15	11.408	0.211
36	C16	11.245	0.227
37	C17	11.444	1.629
38	C18	11.300	84.549

Çizelge 20. Numunelere ait **Afla B<sub>2</sub>** Değerleri (HPLC)

Sıra Numarası	Numune Adı	Analiz için Alıkonulma Süresi (dk)	HPLC de tespit edilen derişimi (ng/ml)
1	A1	8.621	0.346
2	A2	8.608	0.703
3	A3	8.642	0.216
4	A4	8.648	0.645
5	A5	8.629	0.433
6	A6	8.585	0.100
7	A7	8.640	0.239
8	A8	8.651	2.092
9	A9	8.614	0.212
10	A10	8.630	0.151
11	A11	8.603	0.085
12	A12	8.612	0.172
13	A13	----	----
14	A14	8.633	0.387
15	A15	8.626	0.110

16	A16	8.570	0.142
17	A17	8.638	0.164
18	A18	8.610	0.121
19	A19	8.616	0.071
20	A20	8.641	0.371
21	C1	8.936	0.236
22	C2	8.935	0.238
23	C3	8.938	0.231
24	C4	8.966	0.211
25	C5	8.994	0.246
26	C6	9.474	2.096
27	C7	----	----
28	C8	9.416	0.516
29	C9	9.342	0.392
30	C10	9.389	0.055
31	C11	----	0.000
32	C12	9.656	0.046
33	C13	----	----
34	C14	----	----
35	C15	----	----
36	C16	----	----
37	C17	9.612	0.297
38	C18	9.504	0.137

Çizelge 21. Numunelere ait Afla G<sub>1</sub> Değerleri (HPLC)

Sıra Numarası	Numune Adı	Analiz için Alıkonulma Süresi (dk)	HPLC de tespit edilen derişimi (ng/ml)
1	A1	----	----
2	A2	7.121	0.158
3	A3	----	----
4	A4	7.122	1.968
5	A5	----	----
6	A6	7.122	0.443
7	A7	7.122	1.227
8	A8	----	----
9	A9	----	----
10	A10	7.122	0.355
11	A11	----	----
12	A12	----	----
13	A13	----	----
14	A14	7.146	0.188
15	A15	----	----
16	A16	----	----
17	A17	----	----
18	A18	----	----
19	A19	----	----
20	A20	7.253	0.981
21	C1	7.980	1.402
22	C2	7.981	1.449
23	C3	7.984	1.206
24	C4	8.005	1.099
25	C5	8.031	1.401
26	C6	----	----
27	C7	----	----
28	C8	8.378	0.175

29	C9	8.329	6.025
30	C10	----	----
31	C11	8.558	0.500
32	C12	----	----
33	C13	8.234	0.220
34	C14	----	----
35	C15	8.535	0.605
36	C16	8.448	0.117
37	C17	8.556	1.485
38	C18	8.464	18.623

Çizelge 22. Numunelere ait **Afla G<sub>2</sub>** Değerleri (HPLC)

Sıra Numarası	Numune Adı	Alıkonulma Süresi (dk)	HPLC de tespit edilen derişimi (ng/ml)
1	A1	----	----
2	A2	----	----
3	A3	----	----
4	A4	5.816	2.022
5	A5	----	----
6	A6	5.816	0.326
7	A7	5.819	1.477
8	A8	5.821	0.257
9	A9	----	----
10	A10	5.816	0.446
11	A11	----	----
12	A12	----	----
13	A13	5.959	0.324
14	A14	5.815	1.569
15	A15	----	----
16	A16	----	----

17	A17	----	----
18	A18	----	----
19	A19	----	----
20	A20	5.816	1.161
21	C1	----	----
22	C2	6.896	0.072
23	C3	----	----
24	C4	----	----
25	C5	----	----
26	C6	----	----
27	C7	----	----
28	C8	----	----
29	C9	7.151	0.271
30	C10	----	----
31	C11	----	----
32	C12	----	----
33	C13	----	----
34	C14	----	----
35	C15	----	----
36	C16	----	----
37	C17	7.313	0.250
38	C18	----	----

Çizelge 23. Numunelerde toplam Aflatoksin değerleri (HPLC)

Sıra Numarası	Numune Adı	HPLC de tespit edilen Afla B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> derişimi (ng/ml)
1	A1	6.483
2	A2	19.572
3	A3	3.782
4	A4	11.387
5	A5	7.491
6	A6	1.550
7	A7	5.020
8	A8	18.653
9	A9	2.178
10	A10	2.075
11	A11	1.267
12	A12	4.185
13	A13	1.329
14	A14	4.279
15	A15	1.288
16	A16	2.258
17	A17	0.962
18	A18	2.059
19	A19	1.292
20	A20	6.644
21	C1	4.762
22	C2	4.821
23	C3	4.039
24	C4	3.695
25	C5	4.447
26	C6	16.984
27	C7	----
28	C8	8.450

29	C9	12.350
30	C10	0.697
31	C11	1.001
32	C12	1.176
33	C13	0.470
34	C14	----
35	C15	0.816
36	C16	0.344
37	C17	3.661
38	C18 <sup>1</sup>	103.310

1 C18 nolu örnek için seyreltme yöntemi uygulanmıştır.



## 5. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, aflatoksin analizinde kullanılabilecek analitik ya da immunokimyasal yöntemler araştırılmış ve bunlardan, aflatoksin analizi için en çok kullanılan üç tanesi (HPLC, TLC ve Florimetrik yöntem) ele alınarak avantajları ve dezavantajları belirlenmiştir. Bu amaçla, çalışılacak numune olarak Aydın yöresi kuru incirleri seçilmiştir.

Florimetrik yöntemde, aflatoksin miktarları toplam olarak hesaplanmaktadır. Yani Afla B<sub>1</sub>, Afla B<sub>2</sub>, Afla G<sub>1</sub> ve Afla G<sub>2</sub> için ayrı ayrı miktar tayini yapılamamıştır. Dolayısıyla ele alınan 38 numunede, ancak 4 aflatoksin çeşidinin toplam miktarları tespit edilebilmiştir.

Florimetrik yöntem ile ölçülen değerler, HPLC yöntemi ile ölçülen değerlerden yüksek çıkmıştır. Numuneler incelendiğinde, ölçülen değerler arasında 4-22 ppb arasında bir fark söz konusudur. Bu farkın, numune içindeki safsızlıkların uygulanan yöntemle tam olarak ayrılabilmesi nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Zira uygulanan yöntem mısır gluten unu numunelerinde aflatoksin analizi için uygulanan, Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı'nın resmi metodudur. Literatür incelendiğinde incir numunelerinde, aflatoksin analizinin florimetrik yöntemle yapıldığı bir kaynağa rastlanmamıştır. Dolayısıyla aflatoksin derişimleri ölçülürken, tam olarak aflatoksinerin temizlenememesi sonucu ekstraktta bulunan, floresans özellik gösteren diğer bileşikler de ölçülmüş olabilir.

Florimetrik yöntemin en büyük kazancı kısa sürede yapılabilmesidir. Ekstraksiyon kısmı tamamlandıktan sonra, ölçüm aşamasında spektrofotometri cihazına konan numunelerin tamamının analizi yaklaşık 20 s sürmüştür. HPLC yönteminde ölçüm aşamasında, HPLC cihazına konan her bir numune için analiz süresinin 15 dk olduğu düşünülürse florimetrik yöntemin ölçüm aşamasının ne kadar kısa olduğu anlaşılabilir.

Florimetrik yöntem çok hassastır. Milyarda bir gibi çok düşük konsantrasyonlara uygulanabilir (Gündüz, 2002).

Florimetrik yöntemde kullanılan spektrofotometre cihazı, güçlü bir ışın kaynağına sahip olması ve ışınları dalga boylarına göre ayırmak için greyting monokromatörlerine sahip olması gibi -fotometrelere göre- birçok farklı özellik içerdiği yüzünden pahalıdır.

Yapılan florimetrik tayinde en büyük sorun, plakaya numuneleri pipet yardımıyla uygularken yaşanmıştır. Çünkü kesinlikle pipet ucu, plaka üzerinde, bölmeler hariç başka bir yere değmemelidir. Pipet ucunun plakanın herhangi bir yerine değmesiyle oluşabilecek kirlilik, yanlış sonuçlar alınmasına yol açmaktadır.

TLC yöntemi, aflatoksin analizi için oldukça kolay ve ucuz bir yöntemdir. Ancak yöntemin uygulanması, uzun zaman almaktadır. Ayrıca literatürdeki TLC yöntemlerinin çoğunda, mobil faz olarak, numuneyi temizleme aşamasında ya da ekstraksiyon aşamasında hala, diklormetan veya kloroform gibi klor içeren çözümler kullanılmaktadır. Bilindiği gibi bu çözümlerde ekolojik dengeye zarar vermektedir.

TLC yönteminde, diğer yöntemlere göre hata yapma payı çok yüksektir. İncir numuneleri ile yapılan TLC yönteminde, sürekli hatalı sonuçlar bulunmuş ve hata kaynakları araştırılmıştır.

Roberts ve Patterson'a ait "Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs using a novel membrane cleanup procedure" adlı yöntem, hayvan yemlerinde rahatlıkla uygulanabilirken, incir numunelerinde bir dizi hataya yol açmıştır. Plaka toluen-etil asetat-formik asitten (60+30+10) oluşan karışımda geliştirildikten sonra, uzun ve kısa dalga UV ışıkta incelenmiştir. Kısa dalga boyunda (254 nm) net bir gözlem yapılamamıştır. Uzun dalga boyunda (365 nm) ise 1000 ppb lik toplam aflatoksin standardında Afla B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> ye ait dört ayrı benek net olarak gözlenmiştir. Ancak uygulanan numuneler, bant şeklinde sürüklenmiş olarak gözlenmiştir.

Bunun kirlilikten kaynaklanmış olabileceği düşünülerek numuneler katı-faz ekstraksiyon (SPE) kolonundan geçirilmiştir. Numuneler SPE'den geçirilmesine rağmen, yine bant tarzında sürüklenmiş olarak gözlenmiştir.

Bunun nedeninin, yürütme aşamasında, kromatografi tankının yeterince çözücü buharıyla doyurulmamış olması olabileceği düşünülerek kromatograf tankı önceden hazırlanmıştır ve çözücünün (toluen-etil asetat-formik asit) buharıyla doyması sağlanmıştır. Plaka tekrar hazırlanıp tank içinde koşturulduğunda aynı sorunla karşılaşıldığından, sorunun mobil fazdan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Bu nedenle çift yönlü yürütme işlemi yapılmıştır. Aynı şekilde hazırlanan plaka ilkönce 50 ml dietil eter de koşturulmuştur. Daha sonra 90° döndürülerek kloroform-aseton

(45+5) karışımında koşturulmuştur. Yürütme işlemi bittikten sonra plaka UV ışık altında incelendiğinde numunelerin yine bant şeklinde olduğu gözlenmiştir.

Daha sonra elusyon aşamasında değişiklik yapılmıştır. Rotavaporda çözücüsü buharlaştırılan ve 1ml kloroformda çözdürülerek, plakaya uygulanacak olan numunenin 0,5 ml si IAC den geçirilmiştir. Daha sonra metanol ve su ile elue edilmiştir. IAC den geçirilmiş ve normal prosedür uygulanmış iki ayrı 0,5 ml lik numune plakaya uygulanmıştır. Bu aşamada UV ışık altında, normal prosedür uygulanan numunede aflatoksinler yine bir bant halinde gözlenirken, IAC den geçirilen numunede aflatoksinler gözlenememiştir.

Aynı numuneler daha sonra alüminyum plakaya değil de cam plakaya uygulanmıştır. Numunelerdeki hata yine giderilememiştir. Aflatoksin standartları daha belirgin bir şekilde gözlenmiştir.

Bu yöntemden belirgin bir sonuç elde edilemediği için Roberts ve Patterson'a ait olan yöntemin, incir numunelerinde aflatoksin analizi için uygun olmadığına karar verilmiştir. Roberts ve Patterson, bu yöntemi hayvan yemlerinde aflatoksin analizi için kullanmışlardır. Literatür incelendiğinde bu yöntemle hayvan yemlerinde çok iyi sonuçlar alındığı göze çarpmaktadır. Ancak incir gibi meyvelerde, çok fazla organik madde ( nükleotitler, vitaminler, yağlar, şekerler vs. ) olduğundan, bu gibi maddelerin aflatoksinlerle girişim oluşturduğu, bu nedenle UV ışık altında aflatoksinlerin sürüklenmiş olarak görüldüğü düşünülmüştür.

Uyguladığımız TLC yönteminde hata kaynaklarından birisi de, ekstraksiyon aşamasında IAC nin, kullanımının yanlış yapılmasıdır.

Roberts ve Patterson'a ait TLC yönteminde, temizleme aşamasında imunoaffinite kolon kullanılması, plakalarda görülen sürüklenmeleri ya da numunelerde aflatoksinlerin görünmeyişini açıklayabilir. Zira yapılan çalışmada, temizleme aşamasında imunoaffinite kolon kullanılan HPLC yönteminde, herhangi bir soruna rastlanmamıştır. HPLC de böyle bir girişime rastlanmamasının nedeni, TLC yöntemi ile HPLC yönteminin farklı ayırma mekanizmalarına sahip olmasıdır. Deneyde kullanılan TLC yönteminde hareketli faz apolar(toluen-formik asit-etil asetat), durgun faz ise polardır (silika jel). Deneyde kullanılan HPLC yönteminde ise hareketli faz polar (metanol-su), durgun faz apolardır (oktadesil grupları).

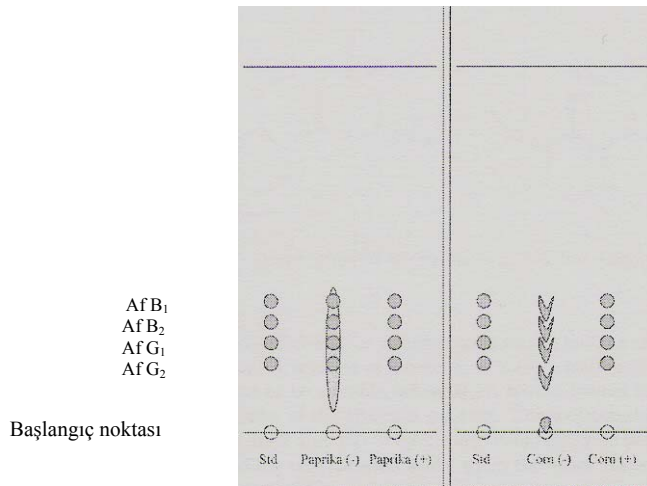
Yapılan deneysel çalışmaların sonunda, aflatoksinleri IAC'den geri alma aşamasında kloroform yerine metanol-su çözgeninin daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Metanol-su çözgeninin dışında bu girişimleri engellemek için uygulanan yöntemler şunlardır:

-İmunoaffinite kolon öncesinde seyreltilmiş ekstrakt, mikrofiber cam filtre ile temizleninceye kadar süzülür.

-Girişim yaratacak diğer bir kaynak da IAC yi yıkama aşamasında eser miktarda kirliliğin imunoaffinite kolon içerisindeki jele karışmasıdır. Bunu gidermek için iki işlem yapılabilir. Yıkama, % 0,5 Tween-20 (monosorbitanlaurat) içeren çözeltiyle yapılabilir ya da yüksek saflıkta su kullanılabilir.

Kruger ve ark. nın 1999 yılında yaptığı bir çalışmada, mısır numunelerindeki aflatoksinin florimetrik tayininde, imunoaffinite kolonların temizlenmesi aşamasında Tween-20 kullanılmış ve çok iyi sonuçlar elde edilmiştir (Stroka, 2000).



Şekil 33. Tween-20 kullanılmış ve kullanılmamış biber tozu ve mısır numunelerinin ince tabaka kromatogramı

TLC'de yürütme aşamasında, mobil fazın plaka üzerinde ilerleme hızı, kapılar kuvvetlere bağlıdır ve kontrol edilemez (Yüksek basınçlı TLC yöntemi hariç). HPLC de ise mobil fazın hızı ayarlanabilir ve kontrol edilebilir.

TLC de numunenin çözüdüğü çözünenin seçimi, TLC için HPLC kadar önemli değildir. Çünkü yürütme aşaması öncesi bu çözünenler buharlaştırılmaktadır. HPLC de ise, numunenin çözüdüğü çözünen, mutlaka mobil fazın yapısıyla ve kolonun dayanıklılığıyla uyumlu olmalıdır (Sherma and Fried, 1999).

TLC yönteminin, kıyaslanan diğer yöntemlere göre daha az duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan TLC yönteminde 2,5 ng lık bir dedeksiyon limiti belirlenmiştir. Oysaki literatürde HPLC yönteminin, 0.05 ng/g gibi oldukça düşük dedeksiyon limitine sahip olduğu belirtilmektedir (Reif et al, 1995).

TLC metodu 2 ng/g dedeksiyon limitinin altında güvenilir sonuç vermez. En büyük dezavantajı da ekolojik dengeye zararlı çözümler kullanılmasıdır (Nollet, 2004).

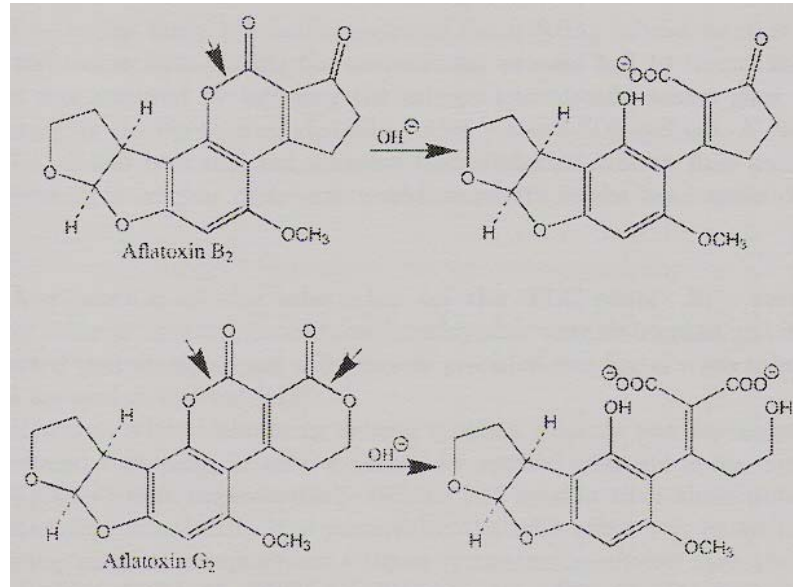
TLC de, UV ışık altında çıplak gözle görsel tespit yoluyla ancak 1µg/kg ve üzeri aflatoksinler tespit edilebilir. Ayrıca çıplak gözle yapılan işlem, ancak yarı kantitatif işlemdir (Stroka, 2000).

TLC nin duyarlılığı, floresans dedektör kullanılan bir HPLC yöntemine göre 100 kat daha azdır. Bunun nedeni, HPLC’de temizleme aşamasında IAC kullanılması ve ekstraksiyon aşamasında metanol çözeltisi kullanılmasıdır (Anklam and Stroka, 1999).

## 5. SONUÇLAR

TLC yöntemi, kullanılan diğer kromatografik ayırma yöntemlerine göre daha basit, hızlı ve ucuzdur. Özellikle numunelerdeki aflatoksinlerin kalitatif ya da yarı kantitatif olarak analizlenmesinde çok başarılı bir yöntemdir. Ancak incelenen konuyla ilgili kaynaklarda, kantitatif olarak güvenilirliğinin az olduğundan bahsedilmektedir. TLC yönteminin ekstraksiyon aşamasında birçok farklı kimyasal kullanılması, aflatoksinlerin derişim olarak belirlenmesinde hatalara yol açmaktadır. Örneğin çözgenlerin buharlaştırılması aşamasında, mutlaka bir miktar aflatoksin kaybı yaşanmaktadır. Ayrıca IAC de, su ya da PBS kalıntısı kalması ya da eser miktarda Tween-20 kalması aflatoksinlerin yapısını bozacaktır. Bu bozulmaları önlemek için cam viallere bir miktar formik asit katılmalıdır (Stroka, 2000).

Diğer taraftan, bazik ortam aflatoksinlerin yapılarındaki lakton halkalarının bozulmasına, dolayısıyla, aflatoksinlerin yapısının bozulmasına yol açar. Bunu önlemek için tüm cam gereçler, % 10'luk sülfirik asit ile ve daha sonra da saf su ile yıkanmalıdır.



Şekil 34. Bazik ortamda aflatoksinlerin yapısal bozunması (Stroka, 2000)

TLC yönteminin, kıyaslanan diğer yöntemlere göre daha az duyarlı olduğu da tespit edilmiştir. Uygulanan TLC yönteminde 2,5 ng lık bir dedeksiyon limiti belirlenmiştir. Oysaki literatürde HPLC yönteminin, 0.05 ng/g gibi oldukça düşük dedeksiyon limitine sahip olduğu belirtilmektedir (Reif et al, 1995).

Özellikle TLC yönteminde, ekolojik hasara yol açmamak için ve aflatoksin derişimlerinde daha duyarlı ölçüm yapabilmek için, temizleme aşamasında IAC'lerden yararlanılması gerekmektedir. IAC'ler pahalı ve tek kullanımlık kolonlar olmasına karşın, aflatoksini safsızlıklardan ayırmada çok başarılıdırlar. IAC'lerden aflatoksini geri elde edilmesi aşamasında (elasyon) çözgen olarak en iyi sonucu veren metanol-su karışımıdır.

Daha önce de belirtildiği üzere TLC yönteminde en büyük sorun, laboratuarda meydana gelebilecek insan kaynaklı hatalardır. Yapılan deneyler sonucunda, deney aşamasında insan kaynaklı hatalar en aza indirilirse, TLC yöntemi ile florodensitometre gibi bir cihaz yardımıyla doğruluğu yüksek sonuçlar alınabileceği, ayrıca böyle bir sistemin, florimetrik ve HPLC yöntemlerine göre daha ucuz olması, daha hızlı ve basit olması nedeniyle incir numunelerinde aflatoksin analizinde kullanılabileceği, ayrıca bu durumda IAC, C-18 ya da ODS gibi pahalı kolonlara ihtiyaç duyulmaması nedeniyle incir numunelerinde aflatoksin analiz yönteminin maliyetinin azalacağı kanısına varılmıştır.

İşletmelerde kullanılan UV lambanın, aflatoksin analizinde kesin sonuçlar vermediği anlaşılmış, ancak yine de yurtdışına ihraç edilen ürünlerde kalitatif olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Florimetrik analiz yönteminin, diğer yöntemlere göre en büyük dezavantajı, toplam aflatoksin miktarı hakkında bilgi vermesidir. Afla B<sub>1</sub> diğer aflatoksinlere göre insan vücuduna daha zararlı ve kanserojendir. İhraç edilmek istenen ülkeler de özellikle numunelerde Afla B<sub>1</sub> değerini öğrenmek istemektedirler (Çizelge 4).

Dolayısıyla, florimetrik yöntemde Afla B<sub>1</sub>, Afla B<sub>2</sub>, Afla G<sub>1</sub> ve Afla G<sub>2</sub> derişimleri ayrı ayrı belirlenemediği için, bu yöntemin ihracat esnasında kullanılamayacağı, ayrıca uygulanan yöntemde IAC gibi pahalı kolonlara yer verildiği için yöntemin maliyetinin TLC'ye göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Aflatoksin analizi ile ilgili incelenen makaleler ve kitaplar da göz önüne alınarak, florimetrik yöntemin TLC ve HPLC yöntemine yardımcı ve doğrulayıcı bir yöntem olarak kullanılması gerektiği kanısına varılmıştır.

HPLC yönteminin TLC ve florimetrik yöntemine göre en büyük avantajı, her aşamasının cihaz tarafından gerçekleştirilmesidir. Oysaki TLC ve florimetrik yöntem, HPLC kadar hassas olamaz, çünkü tamamen otomatik yapılan işlemler değildir. Bu da analiz sonuçlarında istenmeyen hatalara ve yanlış ölçümlere yol açmaktadır.

HPLC yöntemi, diğer yöntemlere göre daha fazla maliyete sahip olmasına karşın, her şeyin cihaz tarafından yapılması ve dolayısıyla hareketli fazın akış hızından, enjeksiyon miktarına kadar analizin her aşamasının kontrol edilebilir olması, ayrıca türevlendirme işlemi yapıldığında dört ayrı aflatoksin derişimini, çok küçük derişimlerde bile yüksek doğrulukla hesaplayabilmesi yani hassasiyetinin yüksek olması sebebiyle şu an dünyada en çok tercih edilen analiz yöntemi haline gelmiştir.

Kısaca, pahalı bir yöntem olmasına karşın, diğer yöntemlerle kıyaslandığında aflatoksin derişimini hesaplamada hata payının çok düşük olması sebebiyle, üretimde, dünya pazarında birinci sırada olduğumuz incir gibi ürünler için, diğer iki yönteme göre HPLC yönteminin kullanılmasının daha uygun olacağı kanısına varılmıştır.

Şekil 35'deki grafikte, üçgen şekil ile belirtilen değerler florimetrik yöntem ile ölçülen değerleri, kare şekil ile ölçülen değerler HPLC yöntemi ile ölçülen değerleri göstermektedir. Bu grafikten de anlaşılacağı gibi yapılan çalışmada, florimetrik yöntem yoluyla bulunan toplam aflatoksin değerleri, HPLC yönteminde bulunan değerlere göre yüksek çıkmıştır. Bu yüksek değerlerin, numune içindeki safsızlıkların uygulanan yöntemle tam olarak ayrılabilmesi nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

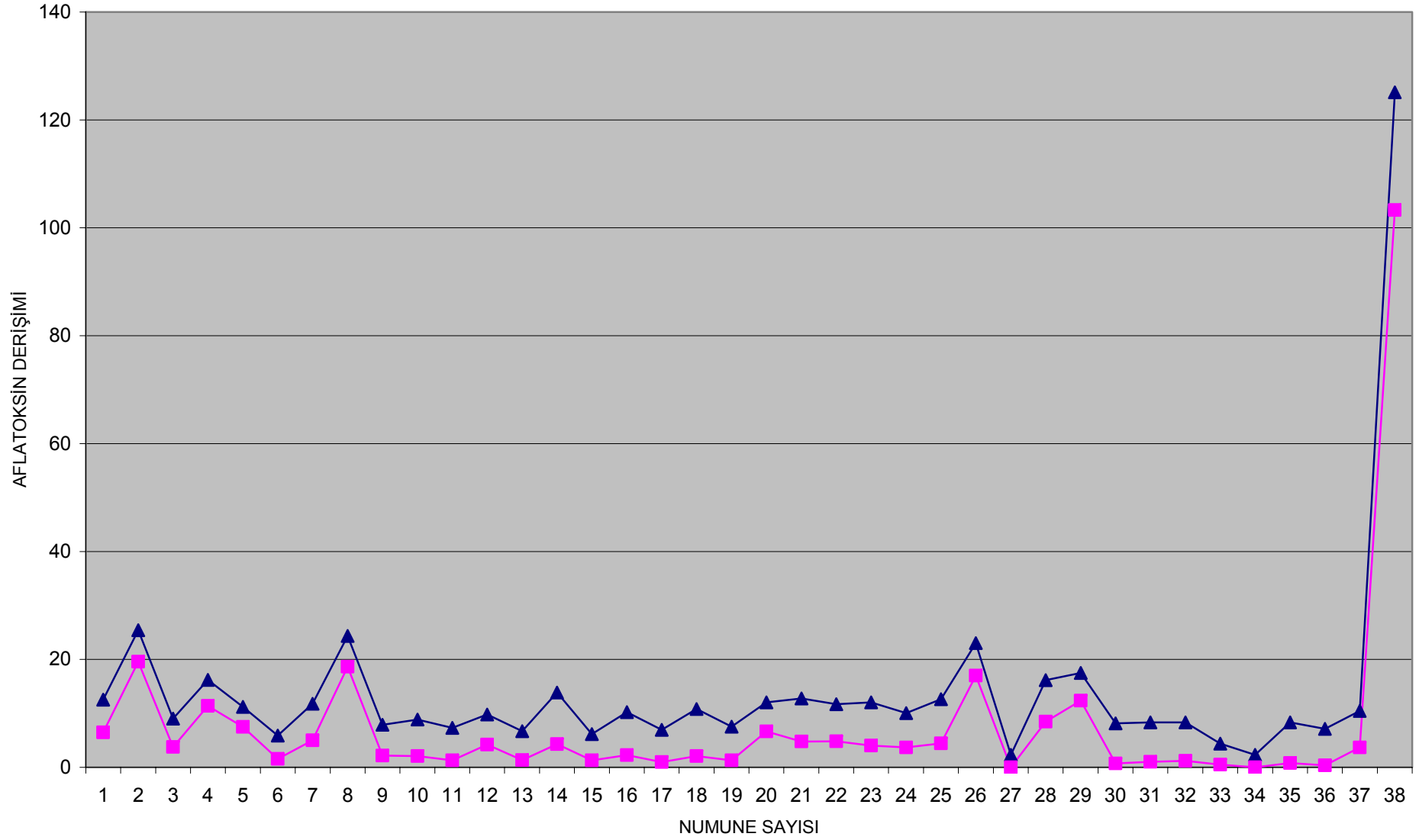


Çizelge 24. HPLC ve Florimetrik yöntem ile ölçülen toplam Aflatoksin değerleri

Sıra Numarası	Numune Adı	HPLC de tespit edilen Afla B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> derişimi (ng/ml)	Spektroflorimetre de tespit edilen Afla B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> derişimi (ng/ml)
1	A1	6.483	12.514
2	A2	19.572	25.422
3	A3	3.782	8.045
4	A4	11.387	16.218
5	A5	7.491	11.210
6	A6	1.550	5.890
7	A7	5.020	11.772
8	A8	18.653	24.353
9	A9	2.178	7.878
10	A10	2.075	8.867
11	A11	1.267	7.299
12	A12	4.185	9.773
13	A13	1.329	6.672
14	A14	4.279	13.849
15	A15	1.288	6.155
16	A16	2.258	10.226
17	A17	0.962	6.948
18	A18	2.059	10.788
19	A19	1.292	7.545
20	A20	6.644	12.037
21	C1	4.762	12.738
22	C2	4.821	11.700
23	C3	4.039	12.062
24	C4	3.695	10.044
25	C5	4.447	12.633
26	C6	16.984	23.015
27	C7	----	2.310
28	C8	8.450	16.169

29	C9	12.350	17.505
30	C10	0.697	8.161
31	C11	1.001	8.322
32	C12	1.176	8.308
33	C13	0.470	4.380
34	C14	----	3.843
35	C15	0.816	8.340
36	C16	0.344	7.133
37	C17	3.661	10.456
38	C18	103.310	125.120

Şekil 35. HPLC ve Florimetrik yöntemlerle ölçülen toplam aflatoksin derişimleri



## ÖZET

Bu çalışmada Aydın ilinde üretilen incirlerde farklı yöntemler kullanılarak, aflatoksin analizi yapılmış ve yöntemlerin birbirlerine göre zaman, duyarlılık, maliyet, hata olasılığı, analiz aşamasının zorluğu-kolaylığı ve yöntemin incir numunelerine uygulanabilirliği gibi kıstaslar ele alınarak karşılaştırılmaları yapılmıştır.

Homojenize hale getirilen 38 adet incir pastası, HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi), TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) ve Florimetrik Yöntem gibi üç farklı yöntem kullanılarak analiz edilmiş ve yöntemler birbirleriyle kıyaslanmıştır. Bu yöntemler birbirleriyle kıyaslanırken, deney aşaması gerçekleştirilemeyen diğer aflatoksin analiz yöntemlerinden bazıları da (ELISA, RIA, UV lamba kullanımı) teorik olarak ele alınmıştır.

Bu yöntemlerden, spektroflorimetre cihazı kullanılarak yapılan florimetrik yöntem, toplam aflatoksin derişimini vermesi Afla B<sub>1</sub>, Afla B<sub>2</sub>, Afla G<sub>1</sub> ve Afla G<sub>2</sub> derişimlerini ayrı ayrı analizleyememesi nedeniyle diğer yöntemlere göre daha az kullanılabilir olarak nitelendirilmiştir.

TLC yönteminin HPLC yöntemine göre daha ucuz, fakat daha zahmetli olduğu belirlenmiştir. Ancak HPLC yönteminin ekipman yönünden oldukça pahalı olması sebebiyle, TLC yönteminin dedeksiyon aşamasında florodensitometre gibi bir cihaz kullanıldığında, en az HPLC kadar kesin sonuçlar vereceği, ayrıca türevlendirme için ayrı bir gerece gerek duymaması, IAC ve C-18 gibi kolonların kullanılmaması sonucunda maliyet açısından HPLC'ye göre daha düşük olduğu için, daha çok tercih edilebileceği düşünülmektedir.

Çalışmada, sonuçlar tablolar ve grafikler halinde verilmiş, ayrıca numunelerde en az rastlanılan aflatoksinin Afla G<sub>2</sub>, en çok rastlanılanın da Afla B<sub>1</sub> olduğu belirlenmiş, rastgele seçilen 38 numuneden sadece 2 tanesinin aflatoksin içermediği belirlenmiştir.

## SUMMARY

In this study, aflatoxin analysis were made by various methods on figs produced in Aydın Region. These methods were compared according to their experimental time, sensitivity, cost, error rate, difficulties of analysis level and their applicability on fig samples.

Homogenized 38 fig pastes were analysed by three different methods as HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), TLC (Thin Layer Chromatography) and Fluorimetric Analysis. These methods were compared to each other. Also, some of the methods used to analyse aflatoxin such as ELISA, RIA and UV light usage were approached theoretically.

Fluorimetric method uses spectrofluorimeter device, gives total Aflatoxin concentration (can not analyse Afla B<sub>1</sub>, Afla B<sub>2</sub>, Afla G<sub>1</sub> ve Afla G<sub>2</sub> concentrations individually). As a result of this; usage of fluorimetric method is not common in aflatoxin detection according to other methods.

TLC method is appointed that less expensive and but more laborious than HPLC method. In TLC method, there is no need any extra device for derivatisation step and also it is not necessary to use expensive columns such as IAC and C-18 used in HPLC. More accurate results are obtained by using fluoridensitometer in detection step of TLC method. In conclusion, it is considered that TLC method with fluoridensitometer is preferred instead of HPLC method for aflatoxin analysis

In this study, results were given in tables and figures. Besides, aflatoxin of Afla G<sub>2</sub> was seen least and aflatoxin of Afla B<sub>1</sub> was seen most in samples. Also, in random choice of 38 samples, only 2 of the samples did not contain aflatoxin.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, karşılaştığım her türlü problemde tecrübe ve bilgisiyle yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Mustafa DEMİR'e,

TLC yöntemiyle yaptığım analizlerde, bilgisinden ve tecrübesinden çok yararlandığım Veterinerlik Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Selim SEKKİN'e,

TLC deney aşamasında, bana çok yardımcı oldukları için Tüm Farmakoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

HPLC yönteminde HPLC cihazının kullanımı ve yöntemin uygulanışı aşamalarında bilgisi ve tecrübesini eksik etmeyen Veterinerlik Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Cengiz GÖKBULUT'A,

İncir numunelerinden HPLC yöntemiyle aflatoksin analizinde, benden bilgi ve desteğini esirgemeyen Aydın Ticaret Borsası Gıda Laboratuvarı çalışanlarına,

Tezimin her aşamasında manevi desteğini eksik etmeyen ve bana, konuyla ilgili teorik bilgi edinilmesi aşamasında çok yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi ve Kimya öğretmeni arkadaşım Hatice ÖĞÜT'e,

Tezimin her aşamasında yardımcı olan Araştırma Görevlisi Gülşen GÜVEN'e, yine tezimin her aşamasında yardımcı olan, özellikle literatür çevirilerinde bana çok yardımcı dokunan Araştırma Görevlisi Fatih Alpay VURAN'a,

Ayrıca tüm çalışmalarım boyunca manevi desteğini esirgemeyen anneme, babama ve nişanlım Evrim ONAR'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

## **EKLER**

### **EK 1. CB METODU (AOAC 17th edn , 2000 Official Method 968.22 Aflatoxins in Peanuts and Peanut Products CB Method )**

50 g toz halindeki numune, 500 ml lik erlene alınır. Üzerine 25 ml su, 25 g diatome toprak ve 250 ml  $\text{CHCl}_3$  eklenerek 30 dk çalkalanır. Daha sonra da filtre kağıdından süzülür. Süzme işlemi yavaşça, ekstrakt 5mm lik diatome toprak tabakası içeren Buchner hunisine aktarılır ve hafif vakum uygulanır. Daha sonra da filtratın ilk 50 ml si alınır.

İçi susuz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  içeren silikajel ile kaplanmış 30 cm lik kromatografi kolonuna filtratın ilk 50 ml si eklenir. Üzerine maximum akış hızında akacak şekilde 150 ml hekzan ardından 150 ml susuz eter ilave edilir ve kolondan geçtikten sonra atılır. Son olarak aflatoksinler 150 ml metanol- $\text{CHCl}_3$  (3+97) ile elde edilir. Daha sonra plakaya uygulanır.

### **EK 2. BF METODU (AOAC 17th edn , 2000 Official Method 970.45 . Aflatoxins in Peanuts and Peanut Products )**

100 g yarfıstığı ya da yarfıstığı unu veya 50 g yarfıstığı yağı blendır kabına konur. Yarfıstığı yağı için 250 ml metanol-su (55+45) ve 100 ml hekzan ; yarfıstığı ya da unu için 500 ml metanol-su (55+45) 200 ml hekzan ve 4 g NaCl eklenir. Yüksek hızda 1 dk karıştırılır. Daha sonra 250 ml lik santrifüj tüpüne alınarak 2000 rpm de 5 dk santrifüjlenir. İşlem tamamlandıktan sonra alttaki metanol fazının 25 ml si ayırma hunisine pipet yardımıyla konulur. 25 ml  $\text{CHCl}_3$  eklenerek 30-60 s çalkalanır. Tabakalar ayrıldıktan sonra alttaki  $\text{CHCl}_3$  fazı, 600 ml lik paslanmaz çelik behere aktarılır. Beher azot buharına tutulur ve çözgen 2 ml kalıncaya kadar buharlaştırılır. Ekstrakt vialde alınır ve tekrar azot buharı içeren sıcak su banyosunda buharlaştırma işlemi tekrarlanır. Ekstrakt 200  $\mu\text{l}$  benzen- $\text{CH}_3\text{CN}$  (98+2) de çözümlenerek plakaya uygulanır.

### **EK 3. ROMER METODU (AOAC 17th edn, 2000 Official Method 975. 36. Aflatoxins in Food and Feeds)**

Romer metodu,  $\geq 5$  ppb toplam aflatoksin içeren badem numunelerinde,  $\geq 10$  ppb düzeyinde toplam aflatoksin içeren beyaz ve sarı mısır, yerfıstığı, pamukyağında, yerfıstığı yağında ve antepfıstığında,  $\geq 15$  ppb toplam aflatoksin içeren karma yemlerde uygulanır.

50 g numune alınır, üzerine 250 ml aseton-su (85+15) eklenerek belndırda 3 dk yüksek hızda karıştırılır. Ya da 500 ml lik erlene konulan numune, 45 dk boyunca mekanik karıştırıcı da karıştırılır. Daha sonra numune Whatman No:4 filtre kağıdından süzülerek 250 ml lik dereceli silindire alınır. Süzütünün 150 ml si alınarak 400 ml lik behere konur.

Saflaştırma aşamasında 600 ml lik behere 170 ml 0.2 N NaOH ve 30 ml FeCl<sub>3</sub> çözeltisi eklenir ve karıştırılır. Daha sonra 400 ml lik beherdeki ekstrakta 3g CuCO<sub>3</sub> eklenir, karıştırılır ve karışım üstte sözkonusu olan 600 ml lik behere eklenir. 150 ml diatome toprak karışıma eklenir ve iyice karıştırılır. Daha sonra Whatman No:4 filtre kağıdından 16cm lik huni kullanılarak süzülür.

Süzütünün 150 ml si alınarak, 500ml lik ayırıcıya konur. Üzerine 150ml % 0.03 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 10 ml CHCl<sub>3</sub> eklenerek 2 dk kadar çalkalanır ve tabakaların ayrılması beklenir. Alttaki 13-14 ml lik CHCl<sub>3</sub> tabakası alınarak 125 ml lik ayırıcıya konur. Üzerine 100 ml KOH çözeltisi eklenerek 30 sn yavaşça döndürülür ve tabakaların ayrılması beklenir.

Eğer emülsiyon oluşursa, emülsiyon 10 ml lik dereceli silindire (cam tıkaçlı) alınır ve üzerine 1g susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenerek 30 sn çalkalanır ve tabakaların ayrılması beklenir. Eğer emülsiyon bozulmazsa 125 ml lik ayırıcıya alınır ve 50 ml % 0.03 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile yıkanır. 10 ml lik dereceli silindirten (cam tıkaçlı) 3 ml CHCl<sub>3</sub> tabakası alınır.

Şırınga yardımıyla 2 ml CHCl<sub>3</sub> minikolona aktarılır. Yerçekimi yardımıyla akması beklenir. CHCl<sub>3</sub> seviyesi, adsorbanın üzerine geldiğinde 3ml CHCl<sub>3</sub>-Aseton (9+1) karışımı eklenir. Yerçekimi yardımıyla akması beklenir. Kolona UV (365 nm) lamba altında bakıldığında, kolonun altından 2.5 cm üstte, florisil tabakasının tam başlangıcında, aflatoksinden kaynaklanan mavi floresan bandı gözlenir. Daha sonra da miktarı bilinen başka bir numune ile kıyaslanır.



**EK 4. Roberts ve Patterson'a ait "Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs using a novel membrane cleanup procedure" adlı yöntemin deney aşamaları**

Karıştırma aşaması



Süzme aşaması



Doymuş NaCl çöz. ilave edilmiş numuneler



Ayırma aşaması



Ayırma hunisinde üç ayrı faz



Rotavaporda kloroformun buharlaştırması



Plakanın hazırlanması



Yürütme aşaması



Dedeksiyon aşaması



**EK 5 :** Çizelge 25. Yiyeceklerdeki Aflatoksinler için Kullanılan TLC ve HPLC Metotları (Shibamoto,1998)

Aflatoksin	Numune	Yöntem	Ekstraksiyon	Temizleme	Plaka	Çözücü	Türevlendirme	Dedeksiyon	Dedeksiyon Limiti (µg/kg)
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Mısır,Yerfıstığı Yerfıstığı yağı	TLC	MeOH-Su (85-15)	Sıvı-sıvı dağılma ve Silikajel kolon krom.	Silikajel 60	Klo-Ast (90-10)		TLC scanner	3-50
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Bitkisel yağlar	Çift yönlü TLC	Hekzan	Silikajel kolon krom.	Silikajel 60	Klo-Ast (90-10) Etet- MeOH-Su (96-3-1)		Uzun dalga Boyunda Çıplak gözle	
M <sub>1</sub>	Peynir	Çift yönlü TLC	Ast-Su (3-1)	C <sub>18</sub> ve Silika kolonları	Silikajel 60	Etet- MeOH-Su (95-4-1) Klo-Ast (7-3)		Florodensitom etre (ex:366nm em: >430nm)	0.01
M <sub>1</sub>	Peynir	TLC	Klo-NaCl çöz (100-1)	Silikajel kolon krom.	Silikajel GHR	Klo-Ast- İzop (87-10-3)		Uzun dalga Boyunda Çıplak gözle	

								veya TLC scanner ile	
M <sub>1</sub>	Süt ve Süt Ürünleri	TLC	MeOH-Ast (50-20) Klo	Silikajel kolon krom.	Silikajel 60	Klo-Ast- İzop (85-10-5)		Uzun dalga Boyunda Çıplak gözle	0.02-0.1
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Yerfıstığı yağı	HPTLC	Ast-Su	Fenil SPE kolonu	Silikajel 60 kaplı Alüminyum plaka	Diet-Klo- Ksi-Ast (6-3-1)		Florodensitom etre	
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	İncir, Brezilya fıstığı, Antep fıstığı	Çift yönlü TLC	MeOH-Su (71-29)	Sıvı-sıvı dağılma	Silikajel	Diet-Klo - Ast-Su (80-12-0.2)		Florodensitom etre (365nm->430nm)	0.2-100
B <sub>1</sub> -M <sub>1</sub>	Sığır karaciğeri	HPLC	MeOH-Su (80-20)	C <sub>18</sub> ters faz SPE kolonu	Spherisorb silika kaplı kolon	Klo-2pro-tetra		Floresans dedektör	0.1
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Yerfıstığı ürünleri	HPLC	MeOH-HCl 0.1N (4-1)	Sıvı-sıvı dağılma ve Silikajel kolon krom.	Silika (10µm-30cm) Jel kaplı	Su- Diklom- Sheg- ACN-		UV (360-365nm) ya da Floresans (ex:360-365)	0.3-1.0C

					kolon	EtOH (25-7.5-1-1.5)		(em: 400-410 )	
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Yerfistiği, Yerfistiği yağı, mısır	HPLC	Klo-Su (10-1)	Silikajel kolon krom.	Ters faz C <sub>18</sub> (10µm,25 cm)	Su-ACN- MeOH (75-15-10)	Kolon öncesi TFA	Floresans Ex:365 nm Em:450 nm	
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Çeşitli ürünler	HPLC	ACN-Su (90-10)	Çok fonksiyonlu kolon	Ters faz C <sub>8</sub> (5µm, 10 cm)	Su-ACN (80-20)	Kolon öncesi TFA	Floresans	>0.5
M <sub>1</sub> ,M <sub>2</sub>	Süt	HPLC	Ether	Silikajel kolon krom.	Ters faz C <sub>18</sub> (5µm,25c m)	Su-İzop- ACN (80-12-8)	Kolon öncesi TFA	Floresans Ex:360 nm Em:440 nm	0.07
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Yerfistiği, Yerfistiği yağı, mısır	HPLC	MeOH-Su (70-30)	IAC	Ters faz C <sub>18</sub> (5µm,25c m)	Su-ACN- MeOH (60-20-20)	Kolon sonrası İyot çöz.	Floresans Ex:360 nm Em:>420 nm	10
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Yerfistiği yağı	HPLC	MeOH-Su (55-45)	Sıvı-sıvı dağılma	Ters faz C <sub>18</sub> (5µm,20c m)	Su- MeOH- ACN (60-24-16)	Kolon sonrası İyot Kolonu	Floresans Ex:365 nm Em:440 nm	1.0

B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Yerfistiği	HPLC	MeOH-Su (80-20)	Sıvı-sıvı dağılma	Ters faz C <sub>18</sub> (4µm,15 cm)	Su-MeOH (60-40)	Kolon sonrası Kobracell	Floresans Ex:365 nm Em:440 nm	0.1
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Baharatlar	HPLC	MeOH-Su (80-20)	IAC	Ters faz C <sub>18</sub> (5µm,25c m)	Su-ACN- MeOH (60-22.2- 17.8)	Kolon sonrası PBPB	Floresans Ex:362 nm Em:418 nm	1.0
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Mısır	HPLC	Klo-Su (10-1)	Silikajel kolon krom.	µBondapa k C <sub>18</sub> (30cm)	MeOH- Siklodekst rin su çöz (1-1)	Kolon sonrası 0.015 g/ml β- siklodekst rin çöz.	Floresans Ex:365 nm Em:418 nm	1.0
B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> .G <sub>1</sub> -G <sub>2</sub>	Yerfistiği	HPLC	MeOH-Su (56-44)	Sıvı-sıvı dağılma	Ters faz C <sub>18</sub> (4µm,15 cm)	Su- MeOH- But (70-35- 1.2)	Kolon sonrası Fotokimy asal	Floresans Ex:365 nm Em:440 nm	0.1

**KAYNAKLAR :**

- 1) AĞAOĞLU S.,1999- Van ilinde açıkta satılan kırmızı pul biberlerde aflatoksin B<sub>1</sub> varlığının araştırılması, Van Tıp Dergisi Cilt:6 Sayı:4 Ekim 1999
- 2) AKIYAMA H.,YUKIHIRO G.,TANAKA T.,TOYODA M.,2001- Determination of aflatoxins B<sub>1</sub>,B<sub>2</sub>,G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub> in spices using multifunctional column clean-up, Journal of Chrom.A 932, s. 153-157
- 3) AKPINAR Ş., 2003-Gıdalar, Yemler ve Mikotoksinler ([www.ordutarim.gov.tr/subeleler/kontrol/aflatoksin/toksinler.htm](http://www.ordutarim.gov.tr/subeleler/kontrol/aflatoksin/toksinler.htm))
- 4) (AOAC) Association of Official Agricultural Chemists Official Methods of Analysis 970/45 www.aoac.org
- 5) AYÇİÇEK H.,AKSOY A.,SAYGI S.,2005- Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara,Turkey, Food Control 16,s 263-266
- 6) BLESA J.,SORIANO J.,MOLTO J.,MARIN R.,MANES J., 2003- Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography, Journal of Chrom. A 1011, s. 49-54
- 7) ÇELİK B.,2001- Kuru kayısıda muhtemel aflatoksin oluşumu ve düzeylerinin tespiti, İnönü Üniv. Fen Bil. Ens. Kimya ABD Y.L. tezi
- 8) DELL M.P.K.,HASWELL S.J,ROCH O.G., COKER R.D, 1990-V.F.P Medlook, K. Tomlins , Analyst 115, 1435
- 9) DEMİR S.T.,ÖZAR A.I.,GÜLSERİ O.,ÇOKSÖYLER N.,AKSOY U., DÜZBASTILAR M., 1990-Ege bölgesinde incirlerde görülen aflatoksin ve okratoksin oluşumu ile önlenmesi üzerinde araştırmalar, 1989-1990 Proje (A) II.yıl rapor
- 10) DERİCİ B, 1997 - Kuru incirlerde aflatoksin ve okratoksin-A oluşumunun bazı besin maddeleri ile ilişkileri üzerinde araştırmalar, Ege Üniv Fen Bil. Ens. Bahçe Bitkileri ABD Y.L. Tezi
- 11) ELLIOT T. R., EMLER H. Marth- Fatty acids in Foods and Their Health Implications Second Edition

- 12) (EMAN) European Mycotoxin Awareness Network fact sheet 2 The Aflatoxins  
www.mycotoxins.org
- 13) ERDOĞAN A.,2004- The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey,  
Chemosphere 56, s. 321-325
- 14) GOLDBLATT L.A.,AMER J.,1971-Oil Chem. Soc. 48, s. 605-610
- 15) GONZALEZ M.,MATTUSCH J.,WENNRICH R., 1998- Stability and determination of  
aflatoxins by high performance liquid chromatography with amperometric Detection,  
Journal of Chrom. A 828, s. 439-444
- 16) GRİGORİADOU I.,ELEFTHERİADOU A.,MURATİDOU T.,KATİKOU P., 2005 -  
Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> milk samples and produced curd and Feta chees, Food  
Control 16, s. 257-261
- 17) GÜL N., 1992 - Sarılop incirlerde bazı kuru meyve nitelikleri ile aflatoksin ilişkisi  
üzerinde araştırmalar, Ege Üniv Fen Bil. Ens. Bahçe Bitkileri ABD Y.L. Tezi
- 18) GÜNDÜZ T.,2002- İnrümental Analiz 6. Baskı Ankara Gazi Kitabevi s.441
- 19) GÜRBAY A. ,AYDIN S. ,GİRGİN G. ,ŞAHİN G., 2004 - Assesment of Aflatoxin M<sub>1</sub>  
levels in milk in Ankara, Turkey, Food Control July 2004
- 20) HEPERKAN R. D. , İ. ALPERDEN (1989)-Kuru incir işletmelerinde küf gelişmesi ve  
aflatoksin oluşumunun önlenmesi, Kuru İncir ve Aflatoksin Sempozyumu 4-6 Nisan,  
Çeşme/İZMİR
- 21) HOLMQUIST G.U.,WALKER H.W,STOHR H.M.,1983-Influence of  
temperature,pH,water activity and antifungal agents on growth of aspergillus flavus and  
A. Parasiticus. Journal of Food Science 48, s. 778-782
- 22) HORTWİTZ W., ALBERT R., NESHEİM S., 1993- Journal of AOAC 76, 461
- 23) (İKML), İZMİR İL KONTROL LAB.-Mikotoksin Laboratuvarı (15-19 Nisan 2002)-  
Aflatoksin Analizleri Hizmetiçi Eğiti Kursu

- 24) JAİMEZ J.,FENTE C.A,VASQEZ B.I.,FRANCO C.M.,CEPEDA A.,MAHUZİER G., PROGNON P., 2000 - Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis, Journal of Chrom. A 882, s. 1-10
- 25) JAMES, CHAPMAN and HALL ,1992-Modern Food Microbiology 4. Edition Newyork s. 641-647
- 26) KELLE A., ERDAL M.E.,TEKEŞ S. ,1979 -Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile sığırkoyun ve tavuk karaciğerlerinde aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> düzeylerinin belirlenmesi,Dicle Üniv. Tıp Fak. Dergisi 16 (1) , s. 13-19
- 27) KONCA R., GÜLSERİ O., 1990- Ultraviyole Lambanın Aflatoksinli İncirlerin Ayrılmasındaki Fonksiyonunun Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar
- 28) KARAGÖZLER A.-Biyokimya Ders Notları ADU
- 29) KRISHNAMACHARI K.A.V.R.,BHAT R.V.,NAGARAJAN V.,TİLAK T.B.G.,1975- The Lancet May 10, s. 1061-1063
- 30) LEE L.S., WALL J.H., COTLY P.J., BAYMAN P., 1990- Journal of AOAC 73, 581
- 31) LİN L.,ZHANG J.,WANG P.,WANG Y., CHEN J., 1998 - Thin layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods, Journal of Chrom. A 815, 3-20
- 32) MARTIN P.J.,STAHR H.M, W. HYDE, M, DOMOTO, 1986- Journal of Liquid Chromatography 9, 1591
- 33) MİRAGLİA M.,BRERA C.,2000-Determination of mycotoxins in grains and related products (in Food Analysis by HPLC-2000 Ed. Leo Nollet) (12) 499-504 s
- 34) NOLLET LEO M.L, 2004-Handbook of Food Analysis Vol 2: Residues and Other Food Component Analysis
- 35) NURYONO N.,NOVIANDİ C.,BÖHM J.,RAZZAZİ-FAZELİ E., 2005- A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography, Food Control 16, s. 65-71



- 36)** ORUÇ H. HÜSEYİN- Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) ve Türkiye'deki Durumu
- 37)** ÖZKAYA Ş, BAŞARAN A, KAYMAK T, DİKMEN O, KOCABEY M, DEMİRKAZIK G, ALTINDIŞ N, RAMİS R (2002) -Türkiye'de Üretilmekte Olan Süt ve Peynirlerde Aflatoksin M<sub>1</sub> Aranması.
- 38)** REIF K., METZGER W., 1995- Journal of Chromatography A 692 ,131
- 39)** REİCHERT N.,STEİNMEYER S.,WEBER R.-Lebensm. Unters. Forsch. 186 (1988)
- 40)** ROBERTS B.A. and PATTERSON D.S.P. (1975)- Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs using a novel membrane cleanup procedure Journal of the AOAC 58:1178 1181
- 41)** R-BİOPHARM RHONE LTD- (KobraCell) An Electrochemical Cell For The Derivatisation Of Aflatoxins Instruction For Use 2003
- 42)** SHİBAMOTO T.,1998 -Chromatographic Analysis of Environmental and Food Toxicants
- 43)** SALUNKHE D.K., S. KADAM -Handbook of Vegetable Science and Technology
- 44)** SARİMEHMETOĞLU B. ,ÇELİK H. ,KUPLULU O. , 2004 - Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese samples by ELISA, Food Control 15, s. 45-49
- 45)** SHARMA M.,MARQUEZ C., 2001- Determination of aflatoxins in domestic pet foods using immunoaffinity column and HPLC, Animal Feed Science and Technology 93, s. 109-114
- 46)** SCOTT P. (Edit.), 2000- AOAC Official Method Natural Toxins , chapter 49,s. 1-50
- 47)** SHERMA J., FRIED B., 1999- Thin Layer Chromatography Fourth Edition , Vol. 81 Edit. B. Fried
- 48)** SHERMA J,1999- Thin Layer Chromatography, Encyclopedia of Analytical Chemistry Edit. Robert A. Meyers

- 49) SHERMA J., 2000- Thin layer chromatography in food and agricultural analysis, Journal of Chrom. A 880, 129-147
- 50) SKOOG D.,HOLLER F.,NİEMAN T.,2002-Principles of Instrumental Analysis Fifth Edit. , Çev. Bilim Yay. Böl. 28 s. 732
- 51) STEİNER E.W.,R.H. RİEKER and R. BATTAGLİA(1988)- Aflatoxin contamination in dried figs: Distribution and association with fluorescence, Journal of Agr. Food Chem. 36, 88-91
- 52) STROKA J.,ANKLAM E., 2000- Development of a simplified densitometer for determination of aflatoxins by thin layer chromatography, Journal of Chrom. A 904, s. 263-268
- 53) STROKA J.,ANKLAM E.,OTTERDİJK R.,2000- Immunoaffinity columnclean-up prior to thin layer chromatography for determination of aflatoxins in various food matrices, Journal of Chrom. A 904, s. 251-256
- 54) STROKA J., 2000- Determination of aflatoxins in food and feed with simple and optimised methods
- 55) ŞANLI Y.,CEYLAN S. ve KAYA S (1982)- Karma yemlerde aflatoksin analizi. A. Ü. Vet. Fak Derg. 29:50-70.
- 56) SCHUSTER R., SCHULENBERG-SCHELL (2000)- A new approach to lower limits of detection and easy spectral analysis -Applications of fluorescence Detection in liquid chromatography (Agilent Technologies) s.41
- 57) (TGK) Türk Gıda Kodeksi, 2002/63- Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ. [www.kkgm.gov.tr/Mevzuat/KodeksList.htm](http://www.kkgm.gov.tr/Mevzuat/KodeksList.htm)
- 58) (TKB), 2000-Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 2000 yılına ait Dünya Kuru İncir Üretimi verileri , [www.tarim.gov.tr](http://www.tarim.gov.tr)
- 59) Türk Standartları Enstitüsü (1985)-Aflatoksin Tayini Metotları-Yağlı Kuru Meyvelerde TS 4672/ Aralık 1985 baskı 1

- 60) TOSCH D., WALKING A.E.,SCHLESIER J.F., 1984- Journal of AOAC 67, 337
- 61) TZOB, Türkiye Ziraat Odaları Birliği [www.tzob.org.tr](http://www.tzob.org.tr)
- 62) USTA G., 2003-Aflatoksin Analiz Talimatı (ATBL.T.01)
- 63) WHITAKER Th.,HORWITZ W.,ALBERT R.,NESHEİM S., PARK D.L.,POHLAND, A.E.,1996- Journal of AOAC Int 79, 476
- 64) WOLF HALL E., BULLERMAN L.B., 1996- Journal of Food Prot. 59, 438
- 65) XIULAN S.,XIAOLIAN Z.,JIAN T.,JUN Z.,CHU F.S., 2005- Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in foods, Food Control October 2005
- 66) VICAM L.P, 1999-Fluorometer procedure for corn gluten meal and corn gluten feed USDA-FGIS Method, Aflatest Instruction Manual s:40
- 67) YAROĞLU T. ,ORUÇ H. ,TAYAR M. , 2005 - Aflatoxin M<sub>1</sub> levels in cheese samples from some provinces of Turkey, Food Control 16, s. 883-885
- 68) [www.fao.org](http://www.fao.org)
- 69) [www.vicam.com](http://www.vicam.com)
- 70) [www.ifra.co.uk\eman2](http://www.ifra.co.uk\eman2)
- 71) [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com)

## ÖZGEÇMİŞ

15.10.1978 tarihinde, Aydın ili Söke ilçesinde doğdu. İlkokulu, Söke Kocagözoğlu İlkokulu'nda, ortaokul ve liseyi Söke Hilmi Fırat Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2001 yılında, Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği'nden mezun oldu. 2002 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde lisansüstü eğitimine başladı. 2002 yılında Van ili Erciş ilçesi'ne Kimya öğretmeni olarak atandı. Halen Aydın ili Söke İlçesi'nde, Söke Lisesi'nde müdür yardımcısı olarak görev yapmaktadır.