

168321

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


ÇUKUROVA BÖLGESİNDE YETİŞEN
YERFISTIĞINDA AFLATOKSİN
MİKTAR TAYİNİ

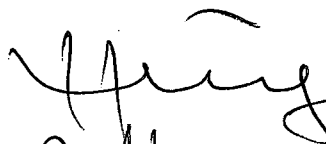
Kimyager Eda AKEL

F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İnci ARISAN ATAÇ


Doç. Dr. İnci Arisan


Prof. Dr. Hüseyin Arzu


Doç. Dr. Zehal Turgut

İSTANBUL, 2005

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|------|
| SİMGE LİSTESİ..... | i |
| KISALTMA LİSTESİ..... | ii |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | iii |
| ÇİZELGE LİSTESİ..... | iv |
| ÖNSÖZ..... | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. YERFİSTİĞİ..... | 3 |
| 2.1 Yerfistüğının Kökeni..... | 4 |
| 2.2 Yerfistüğının Hasadı ve Kurutulması..... | 4 |
| 2.3 Yerfistüğü ve Aflatoksin Sorunu..... | 4 |
| 3. ASPERGİLLUS TÜRÜ KÜF MANTARLARI..... | 6 |
| 3.1 Aspergillus Flavus..... | 7 |
| 3.2 Aspergillus Parasiticus..... | 8 |
| 4. MİKOTOKSİNLER..... | 9 |
| 4.1 Toksikoloji ve İnsan Sağlığı..... | 10 |
| 4.2 Mikotoksinlerin Bir Türü Olarak Aflatoksinler..... | 10 |
| 5. MATERYALLER..... | 17 |
| 5.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler..... | 17 |
| 5.2 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalıştırma Parametreleri..... | 18 |
| 5.3 Kullanılan Kimyasallar..... | 18 |
| 5.4 Kullanılan Referans Standartlar..... | 19 |
| 5.4.1 Aflatoksin G ₂ Referans Standardı..... | 19 |
| 5.4.2 Aflatoksin G ₁ Referans Standardı..... | 19 |
| 5.4.3 Aflatoksin B ₂ Referans Standardı..... | 20 |
| 5.4.4 Aflatoksin B ₁ Referans Standardı..... | 20 |

| | | |
|---------|--|----|
| 6. | DENEYSEL ÇALIŞMA..... | 21 |
| 6.1 | Genel Prensip..... | 21 |
| 6.2 | Çalışma Ortamı..... | 21 |
| 6.3 | Mobil Fazın Hazırlanması..... | 21 |
| 6.4 | Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması..... | 21 |
| 6.4.1 | Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (pH = 7.4)..... | 21 |
| 6.4.2 | Nitrik Asit Çözeltisi (4 mol/L)..... | 22 |
| 6.4.3 | Ekstraksiyon Çözeltisi..... | 22 |
| 6.4.4 | Seyreltme Çözeltisi (Metanol-Su Karışımı)..... | 22 |
| 6.4.5 | Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Referans Standart Çözeltilerinin Hazırlanması..... | 22 |
| 6.4.5.1 | Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Referans Standartlarının Stok Çözeltileri..... | 22 |
| 6.4.5.2 | Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Referans Standartlarının 1.Mix Ara Stok Çözeltisi (150 µg/L)..... | 22 |
| 6.4.5.3 | Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Referans Standartlarının 2.Mix Ara Stok Çözeltisi (75 µg/L)..... | 22 |
| 6.4.5.4 | Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Referans Standartlarının 3.Mix Ara Stok Çözeltisi (60 µg/L)..... | 23 |
| 6.4.5.5 | Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Referans Standartlarının 4.Mix Ara Stok Çözeltisi (6 µg/L)..... | 23 |
| 6.4.6 | Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Mix Referans Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması (0.36 µg/L, 0.72 µg/L, 1.2 µg/L, 1.5 µg/L, 2.4 µg/L ve 3.6 µg/L)..... | 23 |
| 6.4.6.1 | 1.2 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması..... | 23 |
| 6.4.6.2 | 1.5 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması..... | 23 |
| 6.4.6.3 | 2.4 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması..... | 23 |
| 6.4.6.4 | 3.6 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması..... | 24 |
| 6.4.6.5 | 0.36 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması..... | 24 |
| 6.4.6.6 | 0.72 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması..... | 24 |
| 6.4.7 | Yerfıstığı Örnek Çözeltisinin Hazırlanması..... | 24 |
| 6.5 | İmmünoafinite Kolonlarının Hazırlanması-Şartlanması..... | 24 |
| 6.6 | Örnek Ekstraktının Temizlenmesi ve Aflatoksin Elusyonu..... | 25 |
| 6.6.1 | Örnek Ekstraktının Temizlenmesi..... | 25 |
| 6.6.2 | Aflatoksinlerin Elusyonu..... | 25 |
| 6.7 | Yapılan Validasyon Çalışmalarının Kapsamı..... | 25 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 6.7.1 | Seçicilik alışmaları (Selectivity – Specifity)..... | 25 |
| 6.7.1.1 | İmmünoaffinite Kolonu Kullanımının Piklerin ıkış Zamanları Üzerine Etkisinin İncelenmesi..... | 25 |
| 6.7.1.2 | Matriksten (yerfıstığı), Enjeksiyon Solventinden ve Mobil Fazdan Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi..... | 26 |
| 6.7.1.2.1 | Matriksten (yerfıstığı) Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi..... | 26 |
| 6.7.1.2.2 | Enjeksiyon Solventinden Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi..... | 26 |
| 6.7.1.2.3 | Mobil Fazdan Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi..... | 26 |
| 6.7.2 | Doğruluk ve Geri Kazanım alışmaları (Accuracy and Recovery)..... | 26 |
| 6.7.2.1 | %50’lik Konsantrasyon Değerinde (2.4 µg/L) Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ İçerecek Örnekleerin Hazırlanması..... | 27 |
| 6.7.2.2 | %100’lük Konsantrasyon Değerinde (4.8 µg/L) Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ İçerecek Örnekleerin Hazırlanması..... | 27 |
| 6.7.2.3 | %150’lik Konsantrasyon Değerinde (7.2 µg/L) Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ İçerecek Örnekleerin Hazırlanması..... | 27 |
| 6.7.3 | Kesinlik (Precision)..... | 28 |
| 6.7.3.1 | Metod Tekrarlanabilirliği..... | 28 |
| 6.7.3.2 | Cihaz Tekrarlanabilirliği | 28 |
| 6.7.4 | Sistem Uygunluk alışmaları (System Suitability Studies)..... | 28 |
| 6.7.5 | Tayin Limiti alışmaları (LoD)..... | 29 |
| 6.7.6 | Ölçüm Limiti alışmaları (LoQ)..... | 29 |
| 6.7.7 | Doğrusallık ve Aralık alışmaları..... | 29 |
| 6.7.8 | Stabilite alışmaları..... | 29 |
| 7. | SONUÇLAR..... | 31 |
| 7.1 | Seçicilik alışmaları (Selectivity – Specifity)..... | 31 |
| 7.1.1 | İmmünoaffinite Kolonu Kullanımının Piklerin ıkış Zamanları Üzerine Etkisinin İncelenmesi..... | 31 |
| 7.1.2 | Matriksten (yerfıstığı), Enjeksiyon Solventinden ve Mobil Fazdan Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi..... | 31 |
| 7.1.2.1 | Matriksten (yerfıstığı) Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi | 31 |
| 7.1.2.2 | Enjeksiyon Solventinden Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi | 32 |
| 7.1.2.3 | Mobil Fazdan Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi..... | 32 |
| 7.2 | Doğruluk ve Geri Kazanım alışmaları (Accuracy and Recovery)..... | 32 |
| 7.2.1 | %50’lik Konsantrasyon Değerinde (2.4 µg/L) Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ İçeren Örnekleerle Yapılan alışmalar..... | 32 |
| 7.2.2 | %100’lük Konsantrasyon Değerinde (4.8 µg/L) Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ İçeren Örnekleerle Yapılan alışmalar..... | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.2.3 | %150'lik Konsantrasyon Değerinde (7.2 µg/L) Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ İçeren Örneklerle Yapılan alışmalar..... | 34 |
| 7.3 | Kesinlik (Precision)..... | 35 |
| 7.4 | Sistem Uygunluk alışmaları (System Suitability Studies)..... | 37 |
| 7.5 | Tayin Limiti alışmaları (LoD)..... | 41 |
| 7.6 | Ölçüm Limiti alışmaları (LoQ)..... | 41 |
| 7.7 | Doğrusallık ve Aralık alışmaları..... | 41 |
| 7.8 | Stabilite alışmaları..... | 49 |
| 8. | TARTIşMA..... | 57 |
| | KAYNAKLAR..... | 59 |
| | ÖZGEMIş..... | 64 |



SİMGE LİSTESİ

| | |
|----------------------------------|----------------------------|
| °C | Santigrat derece |
| Ca | Kalsiyum |
| CH ₃ CN | Asetonitril |
| CH ₃ OH | Metanol |
| cm | Santimetre |
| d | Çap |
| g | Gram |
| HNO ₃ | Nitrik asit |
| K | Potasyum |
| KBr | Potasyum bromür |
| KCl | Potasyum klorür |
| KH ₂ PO ₄ | Potasyum dihidrojen fosfat |
| kg | Kilogram |
| L | Litre |
| M | Molar |
| mg | Miligram |
| Mg | Magnezyum |
| mL | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| N | Azot |
| NaCl | Sodyum klorür |
| Na ₂ HPO ₄ | Disodyum hidrojen fosfat |
| P | Potasyum |
| S | Kükürt |
| μ | Mikro |
| μg | Mikrogram |
| μL | Mikrolitre |

KISALTMA LİSTESİ

| | |
|-----|-----------------------------|
| AB | Avrupa Birliği |
| ABD | Amerika Birleşik Devletleri |
| dak | Dakika |
| DNA | Deoksiribo nükleik asit |
| Dr | Doktor |
| GC | Guanin-Sitozin |
| TA | Timin-Adenin |
| Ha | Hektar |
| LoD | Saptama Limiti |
| LoQ | Hesaplama Limiti |
| UV | Ultraviyole |



ŞEKİL LİSTESİ

| | | |
|-----------|---|----|
| Şekil 2.1 | A. flavus'un yerfistığı taneleri üzerinde gelişimi..... | 5 |
| Şekil 3.1 | Elektron mikroskobu altında Aspergillus flavus'un görünüşü..... | 7 |
| Şekil3.2 | Aspergillus flavus'un görünüşü..... | 7 |
| Şekil 3.3 | Elektron mikroskobu altında Aspergillus parasiticus'un görünüşü..... | 8 |
| Şekil 3.4 | Aspergillus parasiticus'un görünüşü..... | 8 |
| Şekil 4.1 | UV ışık altında aflatoksin B ₁ | 11 |
| Şekil 4.2 | Aflatoksin B ₁ 'in kimyasal yapısı..... | 11 |
| Şekil 4.3 | Aflatoksin B ₂ 'nin kimyasal yapısı..... | 11 |
| Şekil 4.4 | Aflatoksin G ₁ 'in kimyasal yapısı..... | 12 |
| Şekil 4.5 | Aflatoksin G ₂ 'nin kimyasal yapısı..... | 12 |
| Şekil 4.6 | Aflatoksin-N ⁷ guanin'in ve aflatoksin M ₁ 'in sentez şeması..... | 14 |
| Şekil 7.1 | Aflatoksin G ₂ 'ye ait doğrusallık grafiği..... | 42 |
| Şekil 7.2 | Aflatoksin G ₁ 'e ait doğrusallık grafiği..... | 43 |
| Şekil 7.3 | Aflatoksin B ₂ 'ye ait doğrusallık grafiği..... | 44 |
| Şekil 7.4 | Aflatoksin B ₁ 'e ait doğrusallık grafiği..... | 45 |

ÇİZELGE LİSTESİ

| | | |
|--------------|---|----|
| Çizelge 5.1 | Kullanılan kimyasal maddeler..... | 18 |
| Çizelge 7.1 | İmmünoaffinite kolonunun aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ piklerinin çıkış zamanlarına etkisi..... | 31 |
| Çizelge 7.2 | 2.4 µg/L aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ içecek şekilde ilk gün hazırlanan iki paralel örneğe ait sonuçlar..... | 32 |
| Çizelge 7.3 | 2.4 µg/L aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ içecek şekilde ikinci gün hazırlanan iki paralel örneğe ait sonuçlar..... | 33 |
| Çizelge 7.4 | 4.8 µg/L aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ içecek şekilde ilk gün hazırlanan iki paralel örneğe ait sonuçlar..... | 33 |
| Çizelge 7.5 | 4.8 µg/L aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ içecek şekilde ikinci gün hazırlanan iki paralel örneğe ait sonuçlar..... | 34 |
| Çizelge 7.6 | 7.2 µg/L aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ içecek şekilde ilk gün hazırlanan iki paralel örneğe ait sonuçlar..... | 34 |
| Çizelge 7.7 | 7.2 µg/L aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ içeren iki paralel örneğin ikinci gün yapılan çalışmalarına ait sonuçlar..... | 35 |
| Çizelge 7.8 | Birinci ve ikinci gün yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların ortalaması..... | 35 |
| Çizelge 7.9 | Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ piklerinin çıkış zamanları..... | 36 |
| Çizelge 7.10 | Aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ piklerinin alanları..... | 36 |
| Çizelge 7.11 | Aflatoksin G ₂ pikinin alıkonma zamanı, alanı, yüksekliği ve bulunan kapasite faktörü, rezolüsyon ve de teorik plaka sayısı..... | 37 |
| Çizelge 7.12 | Aflatoksin G ₁ pikinin alıkonma zamanı, alanı, yüksekliği ve bulunan kapasite faktörü, rezolüsyon ve de teorik plaka sayısı..... | 38 |
| Çizelge 7.13 | Aflatoksin B ₂ pikinin alıkonma zamanı, alanı, yüksekliği ve bulunan kapasite faktörü, rezolüsyon ve de teorik plaka sayısı..... | 39 |
| Çizelge 7.14 | Aflatoksin B ₁ pikinin alıkonma zamanı, alanı, yüksekliği ve bulunan kapasite faktörü, rezolüsyon ve de teorik plaka sayısı..... | 40 |
| Çizelge 7.15 | Yer fıstığında aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ için tayin limitleri..... | 41 |
| Çizelge 7.16 | Yer fıstığında aflatoksin G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁ için ölçüm limitleri..... | 41 |
| Çizelge 7.17 | Aflatoksin G ₂ piki için elde edilen alan değerleri..... | 42 |
| Çizelge 7.18 | Aflatoksin G ₁ piki için elde edilen alan değerleri..... | 43 |
| Çizelge 7.19 | Aflatoksin B ₂ piki için elde edilen alan değerleri..... | 44 |
| Çizelge 7.20 | Aflatoksin B ₁ piki için elde edilen alan değerleri..... | 45 |
| Çizelge 7.21 | Renksiz vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında yapılan stabilite çalışmasında aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) piklerinin çıkış zamanları..... | 46 |
| Çizelge 7.22 | Renksiz vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında yapılan stabilite çalışması sırasında elde edilen aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) miktarları..... | 47 |

| | | |
|--------------|--|----|
| Çizelge 7.23 | Amber renkli vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında yapılan stabilite çalışmasında aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) piklerinin çıkış zamanları..... | 48 |
| Çizelge 7.24 | Amber renkli vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında yapılan stabilite çalışması sırasında elde edilen aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) miktarları..... | 49 |
| Çizelge 7.25 | Renksiz vialler içerisinde, buzdolabında bekletilerek gerçekleştirilen stabilite çalışmasında aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) piklerinin çıkış zamanları..... | 50 |
| Çizelge 7.26 | Renksiz vialler içerisinde, buzdolabında bekletilerek gerçekleştirilen stabilite çalışması sırasında elde edilen aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) miktarları..... | 51 |
| Çizelge 7.27 | Amber renkli vialler içerisinde, buzdolabında bekletilerek gerçekleştirilen stabilite çalışmasında aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) piklerinin çıkış zamanları..... | 52 |
| Çizelge 7.28 | Amber renkli vialler içerisinde, buzdolabında bekletilerek gerçekleştirilen stabilite çalışması sırasında elde edilen aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) miktarları..... | 53 |

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans çalışmam sırasında çalışmamı yönlendiren, değerlendiren ve her konuda bana çözümler üreterek desteğini benden esirgemeyen sevgili Hocam Doç. Dr. İnci Arısan Ataç'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans çalışmamı yürüttüğüm Çevre Endüstriyel Analiz Laboratuvarı'na ve de laboratuvarda bana verdikleri destekten dolayı iş arkadaşlarım Selen Özel ve Didem Özdemir'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her zaman maddi, manevi desteğini benden esirgemeyen anne ve babama sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.



ÖZET

Küflerin sekonder metabolitleri olan mikotoksinler insanlarda ve de hayvanlarda hastalıklara ve ölüme neden olabilirler. Bazı mikotoksinler veya bunların türevleri farmakolojik aktiviteleri nedeniyle antibiyotik olarak kullanılırken bazıları ise kimyasal savaş ajanları olarak kullanılmaktadırlar. Bu çalışmada mikotoksinlerin önemli bir türü olan aflatoksinlerin üzerinde duruldu.

Aflatoksinlerin neden oldukları hastalıklar genel olarak aflatoksikozis olarak adlandırılırlar. Akut aflatoksikozis hemen ölüme sonuçlanırken; kronik aflatoksikozis kansere, bağışıklık sisteminin baskılanmasına ve başka “yavaş” gelişen patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Aflatoksinlerin keşfi ile bu toksinlerin gıdalardaki konsantrasyonlarının tespiti için çeşitli metodlar geliştirilmiştir, ancak aflatoksinler dünyadaki bütün gıdalar için bir problem oluşturmaktadır. Bu nedenden dolayı aflatoksinlerin kimyasal tespiti standardize edilmiştir.

Bu çalışmada standardize metodlardan biri kullanıldı ve mevcut laboratuvar şartlarında, yarfıstığı örnekleri kullanarak metodun doğrulaması yapıldı. Ayrıca metodun güvenilir sonuçlar verdiği ispatlandı.

Anahtar Kelimeler: Mikotoksin, aflatoksin, yarfıstığı, doğrulama

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by microfungi that are capable of causing disease and death in humans and other animals. Because of their pharmacological activity, some mycotoxins or their derivatives have found use as antibiotics; still others have been implicated as chemical warfare agents. This review focuses on one of the most important mycotoxin called aflatoxin.

The diseases caused by aflatoxins are loosely called aflatoxicoses. Acute aflatoxicosis results in death; chronic aflatoxicosis results in cancer, immune suppression, and other “slow” pathological conditions.

Since the discovery of aflatoxins, several methods were developed to detect their concentration in foods, but aflatoxins are global problem in common foods. Because of this chemical determination of aflatoxins has become standardized.

In this study, one of this standardized methods have been used and have been validated in current laboratory conditions by using peanut samples. It has been proven, that the validated method gives correct results.

Keywords: Mycotoxin, aflatoxin, peanut, validation

1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde ve sanayide önemli bir yeri olan yağlar iki sınıf altında toplanır. Bunlar; hayvansal ve bitkisel yağlardır. Hayvansal yağlar, üretiminin sınırlı ve maliyetinin yüksek olması nedeniyle, dünya yağ üretiminin ancak %10-20'sini oluşturabilmekte, %80-90'nını ise bitkisel yağlar karşılamaktadır.

Dünyada yağ elde etmek amacı ile yetiştirilen bitkiler yaklaşık 14-15 tanedir. Bunlar içinde önemli olanlar: ayçiçeği, susam, yerfıstığı, soya, kolza, aspir, ızgın ve ketencik gibi bitkilerdir (Gül vd., 1995).

Önemli bir yağ ve gıda maddesi olan yerfıstığı dünyada 2000 yılı itibariyle 24 milyon ha alanda yetiştirilmektedir. Soya ve pamuktan sonra dünyanın en önemli üçüncü yağlı tohum bitkisidir (Putnam vd., 1991).

Dünya yerfıstığı verimindeki gelişmeler değerlendirildiğinde, ele alınan 20 yıllık periyotta dünya ortalama yerfıstığı veriminde artış olduğu gözlenmektedir. Türkiye yerfıstığı veriminde de yaklaşık %20'lik bir artış dikkati çekmektedir. 2000 yılı itibariyle 2.571 kg/ha olan Türkiye yerfıstığı verimi dünya ortalamasının %77.5 üzerinde gerçekleşmiştir (Gül, 2001).

Unutulmamalıdır ki, gelişmekte olan birçok ülkenin olduğu gibi Türkiye'nin ekonomisinin temelini de tarım sektörü oluşturmaktadır. Ulusal gelirimizin artırılmasında yerfıstığı gibi dış satıma yönelik tarım ürünlerinin yetiştirilmesinde ve bunların farklı ürünlere işlenmesinde gerekli dikkatin gösterilmesi ve tedbirlerin alınması AB'ye girmeye hazırladığımız bu günlerde yadsınamaz bir gereklilik halini almıştır. Tarım Bakanlığı "Avrupa Birliği'ne Katılım Müzakereleri ve Türk Tarımının Uyumunu" başlıklı yeni bir çalışma yaptı. Yeni çalışma, müzakere sürecinin teknik akışını, bu süreçte Polonya'nın yaptıklarını ve Türkiye'nin yapması gerekenleri genel hatlarıyla çizmekte. Çalışmada, çok acil olarak "gıda sağlığı, hayvan sağlığı ve bitki sağlığı" konularına dikkat etmezsek, hem AB'ye mal satamayacağımız, hem de iç pazarımızda kendi insanımızı sağlıksızlığa mahkum edeceğimiz hatırlatılıyor. Yediğimiz ürün ve gıdaların AB'nin sağlık standartlarından çok uzakta seyrettiği bir kez daha bu çalışmayla saptanmakta; gıdalarımızın en büyük sorununun ise aflatoksinler olduğunun altı çizilmektedir [3].

Aflatoksin, özellikle yerfıstığı ve diğer yağlı tohumların uygun olmayan depolama ve taşıma dönemlerinde taneler üzerinde büyüyüp gelişen *Aspergillus flavus* ve de *Aspergillus parasiticus* türü küf mantarları tarafından üretilen bir zehirdir. Bu zehirle bulaşık ürünlerin yenmesinin insan ve hayvanlar için tehlikeli olduğu saptanmıştır (Biçici, 2001).

Aflatoksinler neden oldukları ekonomik kayıplar yanında, insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle de çok önemli mikrobiyal ürünlerdir (Derici, 1997). Aflatoksin oluşumunda; ortamdaki küf gelişimine uygun substratlar, bu substratlara bulaşan küflerin çeşidi, sıcaklık ve nem gibi çevre koşulları, toprak işleme, zararlılarla mücadele, sulama gibi yetiştirme vasıtaları son derece etkin roller oynamaktadır. Aflatoksin oluşumunu tamamen önlemek veya kısıtlamak için aflatoksin oluşumuna neden olan koşulları kontrol altına almak gerekir (Derici, 1997).

Ürüne küf sporlarının bulaşması ve bunu takiben aflatoksin üretiminin gerçekleşmesinden sonra normal şartlarda ürünün yapısını bozmadan kimyasallar ile aflatoksinleri elemine etmek mümkün değildir. Ayrıca sıcaklığa oldukça dayanıklı olan aflatoksinler pastörizasyonla da üründe azaltılamamaktadır (Tosun, 1996).

İnsan sağlığını korumak için, tüketime sunulacak üründen örnekler alınarak aflatoksin analizi yapılmalıdır. Tolerans seviyesinin üzerinde aflatoksin kirliliği içeren ürünlerin pazarlanması önlenmelidir. Aflatoksin için tolerans seviyesi ülkelere göre değişmektedir. Örneğin bu seviye ABD'de 20 µg/L olurken Avrupa ülkelerinde daha düşüktür. Ülkemizde fındık, yerfıstığı ve diğer yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, incir, üzüm ve kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen kurutulmuş gıdalar için belirlenmiş olan aflatoksin B₁ limiti 5 µg/L iken toplam aflatoksin limiti (B₁+B₂+G₁+G₂) 10 µg/L'dir (Türk Gıda Kodeksi).

Gıdalardaki aflatoksin miktarının tespitinde kullanılan metod da çok önemlidir. Avrupa Birliği Ülkelerine ihracat yapabilmemiz için, kullanılan metodun uluslar arası standartlara uygun olması ve bulunan sonuçların da uluslar arası otoritelerce kabul görmesi bir zorunluluk halini almıştır.

Bu çalışmada yerfıstığında HPLC ile aflatoksin tespiti için kullanılan metodun uluslar arası düzeyde olduğunun ispatlanması amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda, kullanılan HPLC sisteminin yerfıstığında aflatoksin analizine uygun olduğuna, kullanılan metodun ve sistemin performansının tekrarlanabilir olduğuna ve çalışılan konsantrasyon aralığında (0.36-3.6 µg/L) yapılan ölçümlerin doğrusal olduğuna kanıtlandı. Ayrıca yerfıstığında aflatoksin analizi için tayin ve ölçüm limitleri (LoD-LoQ) saptandı. Yapılan stabilite çalışmaları ile de, belirli koşullarda bekletilen enjeksiyona hazır yerfıstığı numunelerinde bekleme sonucunda meydana gelen değişiklikler saptandı.

2. YERFISTIĞI

Yerfistiği, baklagiller familyasından otsu, senelik, yazlık bir yağ bitkisidir. Bezelye, bakla, fasulye ile akrabadır, ancak bunlardan meyvelerini toprak içinde meydana getirmesi ile ayrılır (Öğütçü, 1969).

Yerfistiği baklagil bitkisi olduğundan, diğer baklagillerde olduğu gibi, havanın serbest azotunu toprağa bağlar ve kendisinden sonra ekilecek bitkiye azot ve organik maddece zengin bir toprak bırakır. Yerfistiği aynı zamanda bir çapa bitkisi de olduğundan yetişme süresi boyunca toprak devamlı çapalar, yabancı otları temizler ve toprağı havalandırır. Bu nedenle de iyi bir ekim nöbeti bitkisidir (Arnoğlu, 1999).

Yerfistiği tohumları, çeşitlerine göre değişmekle beraber %44-56 oranında yağ içermektedir. Yerfistiği yağı; tadı ve dayanıklılık özellikleri bakımından pek çok bitkisel yağdan daha üstündür.

Yerfistiği tohumlarında yaklaşık % 18 oranında karbonhidrat ile bol miktarda K, Ca, Mg, P ve S gibi madensel maddeler bulunmaktadır. Ayrıca, yerfistiği; A, B ve E gibi vitaminlerce de oldukça zengindir.

Yerfistiği bir baklagil bitkisi olduğu için, bitki kısmı çok değerli bir hayvan yemidir. Yeşil yem olarak doğrudan hayvanlara yedirildiği gibi, kurutularak kış mevsiminde de hayvanlara yedirilmektedir. Yerfistiği kuru otunda %11 protein, %5 yağ, %22 ham selüloz, %42 azotsuz öz maddeler, %10 kül ve %10 su bulunmaktadır.

Yerfistiği meyvelerinden tohumun çıkarılması ile geriye kalan kabukta; % 6-7 ham protein, %1-2 yağ, % 60-70 ham lif, %35-45 selüloz, %27-33 lignin ve %2-4 kül bulunmaktadır. Bu nedenle yerfistiği kabukları; sunta yapımında, yem dolgu maddesi olarak, mantar yetiştiriciliğinde, yakacak olarak, yapay odun yapımında dolgu maddesi olarak, yapay kömür yapımında, sığır yetiştiriciliğinde kaba yem olarak, kümes hayvanları yetiştiriciliğinde altlık olarak ve mulch olarak değerlendirilmektedir.

Kültürü yapılan yerfistiği çeşitleri, pazar tiplerine göre dört grup altında toplanmaktadır. Bunlar; Valancia, Spanish, Virginia ve Runner çeşitleridir. Bunlardan Spanish ve Valancia çeşitleri dik gelişme gösterir, Runner tipi çeşitler yatık, Virginia tipindeki çeşitler ise yarı yatık ve yatık gelişme gösterirler. Bugün ülkemizde üretimi yapılan çeşitler Virginia grubundan olup, yatık ve yarı yatık olarak gelişmektedir (Arnoğlu,1999).

2.1 Yerfıstığının Kökeni

Yerfıstığının kökeni ve yayılışı hakkında son yıllarda yapılan yoğun çalışmalar sonucunda, gen merkezi oldukça aydınlatılmıştır. Buna göre, yerfıstığının gen merkezi olarak Güney Amerika kıtası kabul edilmiştir (Güney Bolıvya–Kuzey Batı Arjantin).

Yerfıstığının Türkiye'ye ne zaman ve nasıl girdiği kesin olarak bilinmemektedir. Ancak  lkemizde ilk defa Trakya bölgesinde yetiştirilmeye başlandığı, daha sonra ise Ege, Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu bölgelerine yayıldığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Arıoğlu, 1999).

2.2 Yerfıstığının Hasadı ve Kurutulması

Ülkemizde tarımı yapılan yerfıstığı eşitleri 150-160 günde hasat olgunluğuna gelmektedirler. Yerfıstığının hasat zamanının doğru olarak belirlenmesi verimi ve de hasat kaybını önemli ölçüde etkilemektedir.

Yerfıstığı hasadının sonbahar dönemine rastlaması nedeniyle, kurutma önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Yeni hasat edilen yerfıstığında %50 dolaylarında rutubet bulunmaktadır. Bu nedenle, hasat sonrası elde edilen ürünün kurutulması gerekmektedir. Yerfıstığının uzun süre bozulmadan saklanabilmesi için, kabuklu olarak %9'un altında, i olarak ise %7'nin altında nem içermesi gerekmektedir. Bu ise, sonbahardaki tabi şartlardaki kurutma ile çoğu kez mümkün olmamaktadır. Uzun süre saklanacak yerfıstığı ürünleri kesinlikle kurutma tesislerinde kurutulmalıdır. Yukarda verilen rutubet oranlarının üzerinde nem içeren yerfıstıkları kısa sürede k flenirler, aflatoksin oluşur ve böceklenme başlar (Woodnoof, 1973).

2.3 Yerfıstığı ve Aflatoksin Sorunu

Aflatoksin, özellikle yerfıstığı ve diğer yağlı tohumların uygun olmayan depolama ve taşıma dönemlerinde taneler üzerinde büyüyüp gelişen *Aspergillus flavus* ve de *Aspergillus parasiticus* türü k f mantarları tarafından üretilen bir zehirdir. Bu zehirle bulaşık ürünlerin yenmesinin insan ve hayvanlar için tehlikeli olduğu saptanmıştır.  r n tarlada iken uzun süren hasat öncesi kuraklıklar toksin gelişimini uygun kılabilir. Bu gibi durumlarda sulama yapılarak bu kurak döneme ara verilebilir. *A. flavus*'un çok iyi büyüyüp geliştiği yerfıstığı ürünü (şekil 2.1) hasadı müteakip hemen, güvenli nem içeriğine kadar kurutularak düşük sıcaklık ve nisbi nem koşullarına sahip depolarda bekletilmelidir. Özellikle ilkel koşullarda yol kenarlarında veya boş arazilerde doğrudan toprak üzerinde günler süren bir kurutma

işlemi aflatoksin gelişimi yönünden sakıncalıdır. Hasadı takiben kurutma tesislerinde kabuklu haldeki yerfıstığı %10 nem içeriğine gelinceye kadar kurutulmalıdır. Hasat edilmiş yerfıstığı ürünü %60 ve daha aşağısındaki nisbi nem düzeylerine ve 15°C gibi düşük sıcaklığa sahip depolarda tutulmalıdır. Tarladan gelen bozuk ve böcek zararına uğramış meyveler seçilerek ayrılmalı ve sağlam ürünle birlikte depoya sokulmamalıdır. İç yerfıstığında güvenli nem içeriği % 7'dir (Biçici, 2001).

Tüketime sunulacak üründen örnekler alınarak aflatoksin analizi yapılmalıdır. Tolerans seviyesinin üzerinde aflatoksin kirliliği içeren ürünlerin pazarlanması önemlidir. Aflatoksin için tolerans seviyesi ülkelere göre değişmektedir. Örneğin bu seviye ABD'de 20 µg/L olurken avrupa ülkelerinde seviye daha düşüktür. Ülkemizde fındık, yerfıstığı ve diğer yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, incir, üzüm ve kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen kurutulmuş gıdalar için belirlenmiş olan aflatoksin B₁ limiti 5 µg/L iken toplam aflatoksin limiti (B₁+B₂+G₁+G₂) 10 µg/L'dir (Türk Gıda Kodeksi).



Şekil 2.1 *A. flavus*'un yerfıstığı taneleri üzerinde gelişimi

3. ASPERGİLLUS TÜRÜ KÜF MANTARLARI

Aspergillus'lar yeryüzünde her yerde yaygın olarak bulunan hidfil mantarlardır; doğal yaşam ortamları toprak ve çürüyen bitki materyalidir; doğadaki temel işlevleri karbon ve nitrojen çevrimiyle ilgilidir, biyodegradasyonda rol alırlar. Bu mantarlar ürettikleri enzimler sayesinde tüm organik maddeleri ayrıştırarak kullanır ve saprofit olarak yaşarlar; uygun koşullarda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilirler. Yaşam çevrimlerini tamamlamak için konak olarak insan gereksinimleri yoktur. Üreme hızı ve kapasiteleri yüksektir. Atmosferde dağılan konidyumlar havada asılı kalabilir, toz ve diğer parçacıklarla her yere taşınabilirler (Chazalet vd., 1998; Hospenthal vd., 1998).

Mantarların etkisiyle bazı besinlerde oluşan zehirlerin yenmesiyle ortaya çıkan mikotoksikozis'de de bu mantarın önemli bir yeri vardır. *Aspergillus flavus* ve benzeri mantarların ürettiği tahıl ve meyvelerde gelişen aflatoksinlerle aflatoksikoz; aflatoksin B ile karaciğerde adenoma ve kanser oluşumu; *A.ochraceus*'un ürettiği okratoksin A ve B'nin hayvanlarda böbrek ve karaciğerleri bozduğu bildirilmiştir (Bennett, 1987; 1991; Vesonder vd., 1991; Unat vd., 1995; Lopez-Diaz ve Flannigan, 1997).

Alerji ve mikotoksikoz dışında *Aspergillus* türlerinin sebep oldukları hastalıklar aspergilloz olarak tanımlanmaktadır. Bu mantarlar tüberküloz, sarkoidoz, bronşektazi, pnömonilerin ardından akciğerlerde aspergilloma denilen mantar topu oluşturabilirler. *Aspergillus*'ların mantar sinüzitlerinin en sık karşılaşılan etkeni olduğu bildirilmektedir. Deri tutulumları ve sindirim sistemi özüllü kişilerdeki enfeksiyonlar da diğer aspergilloz şekilleri arasında sayılmaktadır (Kwon Chung ve Bennett, 1992; Richardson ve Warnock, 1997; Verschraegen vd., 1997).

Aspergillus cinsi ile ilgili olarak Raper ve Fennel'in (1965) yayınladıkları monografya 132 tür sayılmıştır. Bugün bu cinsin kabul edilmiş 180'den fazla türü bulunmaktadır ve yeni türler de tanımlanmaktadır (Samson ve Pitt, 1990; Samson vd.,1995). Aspergilloza en sıklıkla sebep olduğu bildirilen türler *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulus*'dır. Daha nadir olarak hastalığa sebep olanlar arasında ise *A. amstelodami*, *A. avenaceus*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. chevalieri*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. granulatus*, *A. oryzae*, *A. quadrilineatus*, *A. restrictus*, *A. sydowi*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. wentii* sayılmaktadır (Kwon Chung ve Bennett, 1992; Denning, 1998; Latgé, 1999).

Aspergillus türlerinin sınıflandırılması kültür ve morfoloji özelliklerindeki farklılıklara dayanır; kimya ve biyokimya yöntemlerinin tanım değeri düşüktür. *Aspergillus* hücre duvarlarında N-asetilglukozamin, glukoz, mannoz ve galaktoz bulunduğu belirlenmiştir.

Moleküler biyoloji ve genetik yaklaşımlar daha güvenilir bulunmaktaysa da henüz bilgi birikimi yeterli değildir (Samson ve Pitt, 1990; Kwon Chung ve Bennett, 1992; Samson vd.,1995; Latgé, 1999).

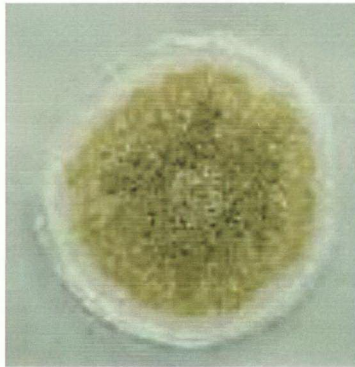
3.1 *Aspergillus Flavus*

Aspergillus flavus türü küf mantarı aynı zamanda “firavunların laneti” olarak da bilinmektedir. Tutench-Amun’un mezarında bol miktarda *aspergillus flavus* sporu bulunmaktaydı ve bu sporların ürettiği mikotoksinler kazı çalışmalarına katılan 30 arkeologun hayatını kaybetmesine neden oldu. *Aspergillus flavus* alerjik reaksiyonlara sebep olabildiği gibi akciğer, mide, bağırsak gibi organların yanı sıra sinir sistemine de saldırabilir [1].

Aspergillus flavus türü küf mantarları, ya aflatoksin B’yi (aflatoksin B₁ ve B₂) ve siklopiazonik asidi bir arada üretirler ya da ikisini birden üretmezler (Pitt, 1993; Horn ve Grene, 1995; Vaamonde vd.,1995).



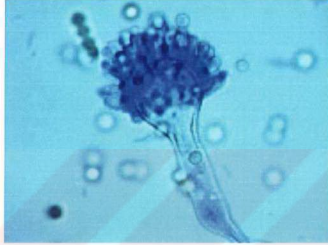
Şekil 3.1 Elektron mikroskopu altında *Aspergillus flavus*'un görünüşünü



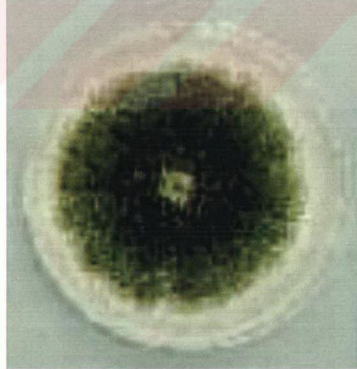
Şekil3.2 *Aspergillus flavus*'un görünüşü

3.2 *Aspergillus Parasiticus*

Aspergillus parasiticus genellikle işlenmiş topraktan, tohumlardan, diğer bitkilerden ve böceklerden izole edilebilmektedir. *Aspergillus parasiticus* alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır, ancak bugüne kadar nöbetli bir hastalığa neden olduğu belgelenmemiştir. *Aspergillus parasiticus* aflatoksin B₁ ve B₂'nin yanı sıra aflatoksin G₁ ve G₂ de üretebilir, ancak siklopiazonik asid üretemez [2].



Şekil 3.3 Elektron mikroskobu altında *Aspergillus parasiticus*'un görünüşü



Şekil 3.4 *Aspergillus parasiticus*'un görünüşü

4. MİKOTOKSİNLER

Mikotoksinler, hifli mantarlar tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Bütün mitotoksinler düşük moleküler ağırlığa sahiptir. Mikotoksinler insanlarda ve diğer hayvanlarda hastalığa ve de ölüme neden olabilirler. Bazı mikotoksinler ya da mitotoksin türevleri farmakolojik aktiviteleri nedeniyle antibiyotik olarak kullanılırken, bazılarıysa kimyasal savaş ajanı olarak kullanılmaktadır (Bennett, 1987).

Toksik fungal metabolitlerin yenmesi, solunması, deri yoluyla ve diğer yollarla vücuda alınması sonucunda ise mikotoksikozis olarak adlandırılan hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Mikotoksikozis'in belirtileri, mikotoksinin türüne, toksine maruz kalınan süreye, yaşa, sağlık durumuna ve de maruz kalan kişinin cinsiyetine bağlıdır.

Mitotoksin terimi, 1962 yılında Londra, İngiltere'de 100,000 hindinin beklenmedik şekilde ölmesinden sonra ortaya çıkmıştır (Blout, 1961; Forgacs, 1962). Bu esrarengiz hindi X hastalığının nedeni, hindilerin *Aspergillus flavusa* ait ikincil metabolitler (afلاتoksinler) ile kontamine olmuş yerfıstığı içerikli yemle beslenmeleriydi. Bu durum bilim adamlarında küflere ait başka metabolitlerin de ölümcül olabileceği fikrini uyandırdı ve çok geçmeden daha önceden bilinen fungal toksinlere okratoksin A gibi ikincil metabolitler ilave edildi.

Çok sayıda bilim adamının toksijenik ajanların keşfine katılması nedeniyle, 1960-1975 arasındaki dönem mikotoksinlerin altın çağı olarak adlandırılmaktadır (Maggon vd., 1977). Kullanılan tanıma bağlı olarak, günümüzde 300-400 kadar bileşen mikotoksin olarak adlandırılmaktadır (Cole ve Cox, 1981).

Bütün mikotoksinler mantar kaynaklı olmasına rağmen, mantarlar tarafından üretilen bütün toksik bileşenler mikotoksin olarak adlandırılmaz. Burada hem hedef organizma, hem de metabolitin konsantrasyonu önemlidir (Graniti,1972). Mikotoksinler, mantarlar tarafından üretilmektedirler ve de bunların düşük konsantrasyonları omurgalılar için toksiktir. Etanol gibi düşük moleküler ağırlığa sahip diğer metabolitler ise, sadece yüksek konsantrasyonlarda alındığında toksik etki gösterdiklerinden mikotoksin olarak değerlendirilmemektedirler (Bennett, 1987).

Mikotoksinleri tanımlamak zor olduğu gibi onları sınıflandırmak da zordur. Mikotoksinler, çeşitli kimyasal yapılarda olmaları, sayısız biyolojik etkiye sahip olmaları ve de birçok değişik mantar türü tarafından üretiliyor olmaları nedeniyle, bu toksinlerin sınıflandırılması genellikle sınıflandırmayı yapan kişinin aldığı eğitime bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin doktorlar mikotoksinleri sebep oldukları hastalıklara göre sınıflandırırken, hücre

biyologları bu toksinleri sentezlendikleri biyolojik materyale göre sınıflandırmaktadırlar. Yapılan sınıflandırmaların hiç biri tam olarak tatmin edici değildir.

4.1 Toksikoloji ve İnsan Sağlığı

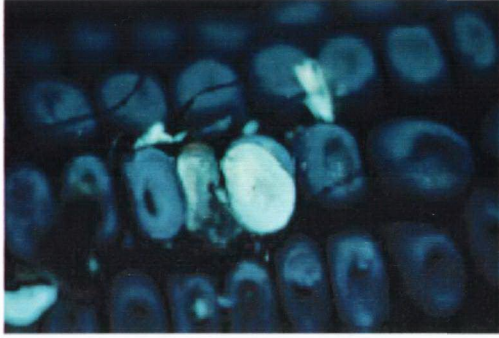
Diğer tüm toksikolojik sendromlar gibi mikotoksikozis de akut ve kronik olarak karakterize edilebilir. Akut zehirlenmeler hemen etkilerini gösterirler ve bunlara belirgin bir toksik cevap oluşur. Kronik zehirlenmeler ise, küçük dozlardaki toksine uzun süre maruz kalındığı zaman ortaya çıkar. Kronik zehirlenmelerin genellikle kanser gibi geri dönüşü olmayan sonuçları vardır (James, 1985).

Dünyada genelinde besinlerin işlenmesi ve depolanması sırasında ilkel metotların kullanıldığı yerlerde yaşayan popülasyonlar daha çok mikotoksine maruz kalmaktadır. Bunun yanı sıra, gelişmiş ülkelerdeki bazı etnik grupların da geleneksel alışkanlıklarından dolayı mikotoksinlere daha çok maruz kaldıkları saptanmıştır (Barrett, 2000).

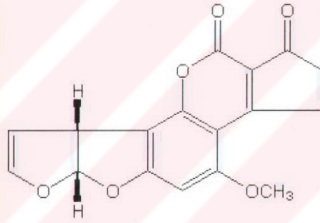
Mikotoksinleri kontrol altına almaya yönelik olan metotların çoğu mikotoksin oluşumunu engellemeye yöneliktir. Bu metotlar arasında iyi tarımsal uygulamalar ve hasat sonrası elde edilen ürünün yeterli düzeyde kurutulması bulunmaktadır (Lisker ve Lillehoj, 1991). Günümüzde ise ürünlerde hasat öncesi kontaminasyonu önlemeye yönelik pek çok araştırma yapılmaktadır. Bu yapılan çalışmalar arasında mikotoksin oluşumuna neden olan genlerin kontrol altına alınması ve de genetik olarak mikotoksin yapan mantarlara karşı dirençli ırkların gen mühendisliği yoluyla üretilmesi bulunmaktadır (Brown vd., 1998). Bugüne kadar önerilen bu yöntemlerden hiç biri bu problemi çözemedi. Mikotoksinler yiyeceklere doğal yollarla bulaştıkları için, bu toksinlerin besinler üzerinde oluşmalarını önlemek genelde mümkün değildir. Ancak, hükümetler kontrol yoluyla mikotoksinler ile kontamine olmuş yiyecekleri kontamine olmamışlardan ayırmaya çalışmaktadır.

4.2 Mikotoksinlerin Bir Türü Olarak Aflatoksinler

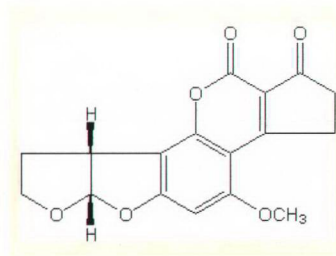
Aflatoksinlerin dört ana tipi bulunmaktadır; B₁, B₂, G₁ ve G₂. Bu dört aflatoksin ince tabaka kromatografisinde farklı R_f değerlerine sahip oldukları için birbirlerinden ayrılabilirdikleri gibi, UV ışık altında farklı renkte (mavi ya da yeşil) fluoresans ışıması (Şekil 4.1) yapmalarıyla da birbirlerinden ayırt edilebilmektedirler.



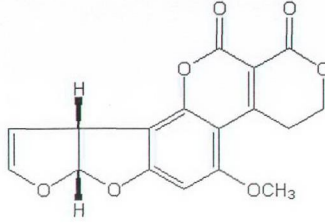
Şekil 4.1 UV ışık altında aflatoksin B₁



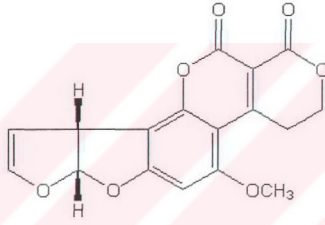
Şekil 4.2 Aflatoksin B₁'in kimyasal yapısı



Şekil 4.3 Aflatoksin B₂'nin kimyasal yapısı



Şekil 4.4 Aflatoksin G₁'in kimyasal yapısı



Şekil 4.5 Aflatoksin G₂'nin kimyasal yapısı

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen difuranokumarin türevleridirler. Tarımda en çok kontaminasyona yol açan küf mantarı *Aspergillus flavus*'tur. *Aspergillus bobycis*, *Aspergillus ochraceoroseus*, *Aspergillus nomius* ve *Aspergillus pseudotamari* de aflatoksin üreten aspergillus türleridir, ancak bu türlere daha az sıklıkla rastlanmaktadır (Goto vd., 1996; Klich vd., 2000; Peterson vd., 2001). Her bir aflatoksijenik tür de, kendi içinde çok farklı kalitatif ve kantitatif özellikler sergilemektedir. Örneğin, *Aspergillus flavus* türlerinin sadece yarısı aflatoksin üretmektedir (Kilch ve Pitt, 1988) ve bunlar 10⁶ µg/kg'dan daha fazla toksin üretebilirler (Cotty vd., 1994).

Bir çok ürün, aflatoksijenik küflerin aflatoksin üretmesine zemin hazırlamaktadır. Tahıllarda, incirde, yağlı tohumlarda, fındıkta, fıstıkta ve tütünde sıklıkla aflatoksin kontaminasyonu karşılanmaktadır (Detroy vd., 1971; Diener vd., 1987).

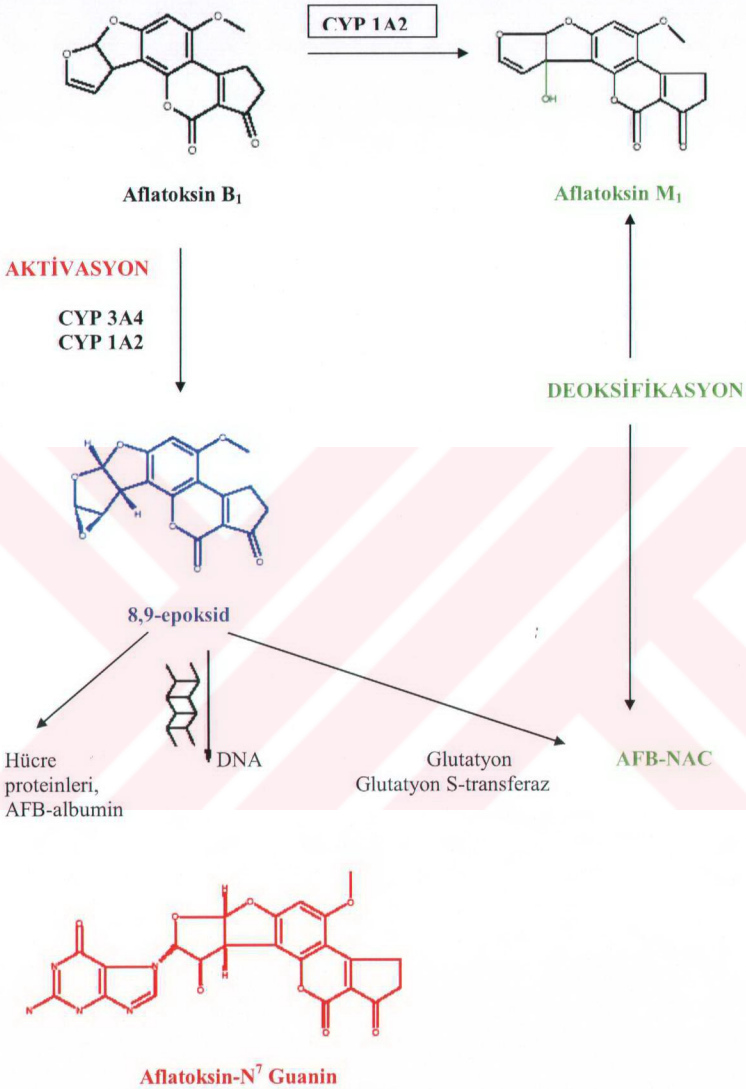
Aflatoksin kontaminasyonu bir çok yolla gerçekleşebilir. Ürün bazen hasat öncesi tarlada aflatoksin ile kontamine olur. Tarlada gerçekleşen kontaminasyonun ana sebebi kuraklıktır (Diener vd., 1987; Klich, 1987). Ancak, uygun olmayan depolama koşulları tarla

kuraklığından daha büyük bir sorun yaratmaktadır. Depolama sırasında küf oluşumunu tetikleyen iki unsurdan biri ürünün nem içeriği, diğeri ise deponun bağıl nemidir (Detroy vd., 1971; Wilson ve Payne, 1994). Çiftliklerdeki hayvan ölümlerinin artması aflatoksinlerle bağlantılıdır. Bu durum, elde edilen ürünün hem hayvan yemi olarak, hem de ihraç ürünü olarak değerini düşürmektedir (Smith ve Moss, 1985). Süt ürünleri de indirekt aflatoksin kaynağı olabilirler. İnekler aflatoksin ile kontamine olmuş yem ile beslendikleri zaman aflatoksin B₁'i aflatoksin M₁'e dönüştürmektedirler (Van Egmond, 1989).

Aflatoksinler hem insanlarda hem de hayvanlarda zehirlenmelere ve kansere yol açmaktadır (Newberne ve Butler, 1969; Shank vd., 1972; Peers ve Linsell, 1973; Eaton ve Groopman, 1994). Aflatoksin B₁, bilinen en kuvvetli doğal kanserojendir (Squire, 1981) ve toksijenik türler tarafından en çok üretilen aflotoksindir.

Aflatoksinlerin neden oldukları hastalıklar genel olarak aflotoksikozis olarak adlandırılırlar. Akut aflotoksikozis hemen ölümlü sonuçlanırken; kronik aflotoksikozis kansere, bağışıklık sisteminin baskılanmasına ve başka "yavaş" gelişen patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Hsieh, 1988). Kümes hayvanlarına, kemirgenlere, balıklara ve insan olmayan primatlara aflatoksin B₁ içeren besinler verilerek aflatoksin B₁'in hedef organının karaciğer olduğu saptandı. Ancak, bu bahsedilen türlerin aflotoksine gösterdikleri tepkinin, yaşla, cinsiyetle, vücut ağırlığıyla, beslenme şekliyle, hastalığa neden olan ajanlara maruz kalınan süreyle ve de besinlerde diğeri mikotoksinlerin varlığıyla farklılık gösterdiği saptandı (Newberne ve Butler, 1969; Cullen ve Newberne, 1994; Eaton ve Groopman, 1994).

Sitokromda bulunan P450 enzimleri aflatoksinleri aktif formları olan 8,9-epoksid formuna çevirirler. 8,9-epoksid eski yayınlarda aflatoksin-2,3 epoksid olarak geçmektedir. 8,9-epoksid hem DNA'ya hem de proteinlere bağlanabilir (Eaton ve Groopman, 1994). Aktif aflatoksin epoksidin guanine N⁷ pozisyonundan bağlandığı bilinmektedir. Aflatoksin B₁-DNA dimeri GC'nin TA ile yer değiştirmesine neden olabilir. Sitozolda ve mikrozomlarda bulunan aktif glutatyon S-transferaz sistemi, indirgenmiş glutatyonu aktif hale gelmiş olan aflatoksin ile birleştirir ve bu olay aflotoksinin vücuttan atılımla sonuçlanır. Hem glutatyon transferaz hem de sitokrom P450 sistemlerinin miktarlarındaki farklılıkların aynı canlı türünün aflotoksine verdiği tepkinin çeşitliliğini etkilediği düşünülmektedir (Eaton ve Ramsdel, 1992; Eaton ve Groopman, 1994).



Şekil 4.6 Aflatoxin-N⁷ guanin'in ve aflatoxin M₁'in sentez şeması

Test hayvanlarının aflatoksine verdikleri tepkilerin farklılığından dolayı, elde edilen verilerle aflatoksinin insanları nasıl etkileyeceğini kestirmek pek mümkün değildir. Ancak, *Homo sapiens*'lerde akut aflatoksin zehirlenmelerine çok sık rastlanmamaktadır. 1974 yılında Hindistanda görülen hepatit salgınında ölen 100 kişinin hayatını kaybetme nedeni, yoğun şekilde aflatoksinle kontamine olmuş mısırla ilişkilendirilmiştir. Ölen yetişkinlerin günde ortalama 2 ila 6 mg arasında aflatoksin tükettiği düşünülmektedir (Krishnamachari vd., 1975). Günümüzde, yetişkinler için akut ölümcül aflatoksin dozu aşağı yukarı 10-20 mg olarak hesaplanmıştır (Pitt, 2000). Ancak, fıkra gibi bir rapor bu tezi çürütmektedir. Rapor, intihar girişiminde bulunan bir kadının, bu girişim sırasında 40 mg saflaştırılmış aflatoksin tükettikten 14 yıl sonra hala yaşamını sürdürmekte olduğunu bildirmektedir. Bu kadının kanında ve idrarında yapılan bir çok test, çekilen röntgenler ve karın bölgesinde, karaciğerde ve de dalakta yapılan ultrason ve tomografi analizleri normal sonuçlar vermiştir (Willis vd., 1980).

Aflatoksin tüketiminin potansiyel bir zehirlenme yolu olması, aflatoksinlerin biyoterörizmde kullanılmasını açıklamaktadır. Irak'ın füzelerde kullanmak üzere aflatoksin stokladığı konusunda önemli kanıtlar bulunmaktadır.

Aflatoksinlerin insanlarda yarattığı kanserojenik etkiler hakkındaki veriler, aflatoksinlerin insanlardaki akut toksik etkileri hakkındaki verilerden çok daha sarsıcıdır. Diyetle alınan aflatoksinler, primer heptoselüler karsinoma oluşumunu tetikleyen önemli bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir; özellikle hepatit B geçirmiş olan kişilerde bu etki daha da yüksektir. Klasik epidemiyoloji dalında gerçekleştirilen bir çok çalışma, karaciğerde kanser oluşumunu diyetle alınan aflatoksinlerle ilişkilendirmiştir (Pers ve Linsell, 1973; Van Rensburg vd., 1985; Li vd., 2001). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar tamamen tutarlı değildir ve her bir bireyin hayatı boyunca ne kadar aflatoksine maruz kaldığını kantitatif olarak belirlemek oldukça zordur. Karşılaşılan karaciğer kanseri sayısı ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir, ancak Çin'de, Filipinler'de, Tayland'da ve bir çok Afrika ülkesinde en çok rastlanılan kanser türüdür. Hepatit B virüsünün neden olduğu enfeksiyonların varlığı, primer karaciğer kanseri için önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu olguyu kontrol etmek amacıyla Shangay ve Çin'de 3.5 yıl içinde toplanan 18,000 idrar örneği ile yapılan çalışmalar göstermişti ki; sadece aflatoksine maruz kalmış olan kişilerde relatif karaciğer kanseri oluşumu riski 2'dir; idrarında hepatit B virüsünün antijenlerine rastlananlarda bu risk 5'tir, idrar örneğinde hem aflatoksine hem de hepatit B'ye rastlananlarda bu risk 60'tur (Ross vd., 1992). Karaciğer kanseri riskini azaltmak için hepatit B aşısı yaptırmak, aflatoksinleri diyetten uzaklaştırmaktan çok daha gerçekçi ve az maliyetli bir stratejidir (Henry vd. 1999, 2002).

Biyolojik olarak aflatoksinlerin varlığı, aflatoksin metabolitlerinin kanda, idrarda ve de sütte analizenmesiyle kanıtlanabilir. Aflatoksin metabolitlerini ekstrakte edilmiş DNA dimerlerinde ve kan proteini dimerlerinde de gözlemek mümkündür. Aflatoksin B₁-N⁷-guanin dimeri idrardaki en önemli aflatoksin biomarker'ıdır ve sadece kişinin daha önceden aflatoksine maruz kalmış olduğunu kanıtlar (Eaton ve Gallagher, 1994; Eaton ve Groopman, 1994).

p53 tümör supressör geninin deaktive olmasının primer hepatoselüler karsinoma oluşumunda önemli etkisi olduğu düşünülmektedir. Afrika'daki ve Çin'deki kanser hastalarıyla gerçekleştirilen çalışmalar, p53 tümör supressör genindeki mutasyonların, guaninlerin timinlerle yer değiştirmesiyle sonuçlandığını göstermiştir (Bressac vd., 1991; Hsu, vd., 1991). Aktif olan aflatoksin epoksidin Guanin'e N⁷ pozisyonundan bağlandığı bilinmektedir. Ayrıca aflatoksin B₁-DNA dimerlerinin GC'nin TA ile yer değiştirmesine neden olduğu da bilinmektedir. p53 geninin 249 nolu kodonunda gerçekleşen spesifik mutasyon ise, tümör dokusuna bağlı kalan ilk "karsinojen-spesifik" biyomarker örneği olarak adlandırılmaktadır (Eaton ve Gallagher, 1994).

Aflatoksinlerin biyosentezi ve moleküler biyolojisi ile ilgili bir çok önemli çalışma bulunmaktadır. Asya mutfağında soya sosu fermentasyonunda kullanılan *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus sojae* türü organizmalar aflatoksijenik türler olan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* ile yakın akrabadırlar. Yemek yapımında kullanılan bu mantar türlerinin hiçbir zaman aflatoksin ürettiği gözlenmediyse de (Wei ve Jong, 1986), bu mantarlar aflatoksin sentezi sırasında gerekli olan genlerin homologlarına sahiptirler (Klich vd., 1995). Silinmeler ve diğer genetik hatalar sonucunda *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus sojae*'de aflatoksin oluşumu durmuştur (Watson vd., 1999; Takahashi vd., 2002).

5. MATERYALLER

5.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

| | |
|--------------------------|---|
| Laboratuvar terazisi | : Sartorius LP1200 |
| Ultraturrax blender | : Janke&Kunkel-Ika T25 |
| Mekanik çalkalayıcı | : Eberbach |
| Su destilasyon sistemi | : Schott gerate |
| Ultra saf su sistemi | : Sartorius arium 611UV |
| Cam malzemeler | : Isolab, class A |
| - Erlen | : 500 mL, kapaklı |
| - Mezür | : 50, 100, 250, 500 mL |
| - Pipet | : Bullu 1, 2, 3, 5, 10 mL |
| - Dereceli pipet | : 5 mL |
| - Ölçülü balon | : 5, 10, 20, 25, 50, 100, 1000 mL, amber renkli |
| - Beher | : 100 mL |
| - Huni | : 8 cm çapında |
| - Şişe | : 250 mL, amber renkli, iç ve vida kapaklı, cam |
| Rezervuar | : İmmünoaffinite kolonları için |
| Süzgeç kağıdı | : Siyah bant (filtrak, grade: 388, d= 125mm) |
| Süzme aparatı | : J.T. Baker Inc., vakumlu |
| Filtreler | : Macherey-Nagel Chromafil Pet- 45125 |
| Otomatik pipet | : 100-1000 µL (1µL aralıklı) |
| pH metre | : Metrohm 744 |
| İmmünoaffinite kolonları | : Bio-trap immunoaffinity column BC AF 050 (Bio-crom) |
| HPLC sistemi | : Thermo Separation Product-Spectra System |

5.2 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalıştırma Parametreleri

| | |
|-----------------------|---|
| Kolon | : ODS-2 Hypersil 250 mm/ 4.6mm (Thermo separation corporation – Lot No: 6061) |
| Dedektör | : Fluorometrik (thermo separation FL 3000) |
| Dalga boyu | : Ex; 360 nm, Em; 456 nm |
| Enjeksiyon hacmi | : 200 µL |
| Akış hızı | : 1 mL/dak |
| Türevlendirme aparatı | : Kobracell (Rhone Diagnostic Tech.) |
| Kolon sıcaklığı | : 30°C |

5.3 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1 Kullanılan kimyasal maddeler

| Kimyasal Maddeler | Üretici Firma | Lot No. | Kalite |
|---|---------------|--------------|----------------|
| Metanol (CH ₃ OH) | Merck | I1017112321 | HPLC grade |
| Asetonitril (CH ₃ CN) | J.T.Baker | 314330017 | HPLC grade |
| % 65’lik nitrik asit (HNO ₃) | Merck | K32226143327 | Extra pure |
| Potasyum bromür (KBr) | Merck | K32064105332 | GR |
| Sodyum klorür (NaCl) | J.T.Baker | 213330006 | Baker analyzed |
| Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄) | Merck | 205A644971 | DAB |
| Disodyum hidrojen fosfat anhidrid (Na ₂ HPO ₄) | Merck | F1169586306 | GR |
| n-Hekzan | J.T.Baker | 305610001 | Baker analyzed |
| Potasyum klorür (KCl) | Merck | K31517236315 | GR |

5.4 Kullanılan Referans Standartlar

5.4.1 Aflatoksin G₂ Referans Standardı

| | |
|-------------------|--|
| İsmi: | : Aflatoksin G ₂ |
| Molekül ağırlığı | : 330.30 g/mol |
| Paketlenme şekli | : 1 mL'lik amber renkli cam ampul |
| Fiziksel şekli | : 3.00 mg/mL'lik metanolik çözelti |
| Tedarikçi | : Dr. Ehrenstorfer GmbH |
| Seri numarası | : LS 10047500 ME |
| Lot numarası | : 20302 ME |
| Sertifikası | : 05.03.2002 tarihinde Dr. J. Heidrich tarafından düzenlenmiştir |
| Saklama koşulları | : Işıktan korunarak, -15°C'de |
| Ampirik formülü | : C ₁₇ H ₁₄ O ₇ |
| CAS numarası | : 7241-98-7 |

5.4.2 Aflatoksin G₁ Referans Standardı

| | |
|-------------------|--|
| İsmi: | : Aflatoksin G ₁ |
| Molekül ağırlığı | : 328.30 g/mol |
| Paketlenme şekli | : 1 mL'lik amber renkli cam ampul |
| Fiziksel şekli | : 3.00 mg/mL'lik metanolik çözelti |
| Tedarikçi | : Dr. Ehrenstorfer GmbH |
| Seri numarası | : LS 10047500 ME |
| Lot numarası | : 20302 ME |
| Sertifikası | : 05.03.2002 tarihinde Dr. J. Heidrich tarafından düzenlenmiştir |
| Saklama koşulları | : Işıktan korunarak, -15°C'de |
| Ampirik formülü | : C ₁₇ H ₁₂ O ₇ |
| CAS numarası | : 1165-39-5 |

5.4.3 Aflatoksin B₂ Referans Standardı

| | |
|-------------------|--|
| İsmi: | : Aflatoksin B ₂ |
| Molekül ağırlığı | : 314.30 g/mol |
| Paketlenme şekli | : 1 mL'lik amber renkli cam ampul |
| Fiziksel şekli | : 3.00 mg/mL'lik metanolik çözelti |
| Tedarikçi | : Dr. Ehrenstorfer GmbH |
| Seri numarası | : LS 10047500 ME |
| Lot numarası | : 20302 ME |
| Sertifikası | : 05.03.2002 tarihinde Dr. J. Heidrich tarafından düzenlenmiştir |
| Saklama koşulları | : Işıktan korunarak, -15°C'de |
| Ampirik formülü | : C ₁₇ H ₁₄ O ₆ |
| CAS numarası | : 7220-81-7 |

5.4.4 Aflatoksin B₁ Referans Standardı

| | |
|-------------------|--|
| İsmi: | : Aflatoksin B ₁ |
| Molekül ağırlığı | : 312.30 g/mol |
| Paketlenme şekli | : 1 mL'lik amber renkli cam ampul |
| Fiziksel şekli | : 3.00 mg/mL'lik metanolik çözelti |
| Tedarikçi | : Dr. Ehrenstorfer GmbH |
| Seri numarası | : LS 10047500 ME |
| Lot numarası | : 20302 ME |
| Sertifikası | : 05.03.2002 tarihinde Dr. J. Heidrich tarafından düzenlenmiştir |
| Saklama koşulları | : Işıktan korunarak, -15°C'de |
| Ampirik formülü | : C ₁₇ H ₁₄ O ₆ |
| CAS numarası | : 7220-81-7 |

6. DENEYSEL ÇALIŞMA

6.1 Genel Prensip

Yerfistığında aflatoksin miktar tayini için hazırlanan test metodu AOAC Official Method 17th. Ed. (2000)'den alınıp modifiye edilmiştir. Bu test metodunun laboratuvar şartları altındaki validasyon çalışmaları kapsamında seçicilik, doğruluk ve geri kazanım, kesinlik, sistem uygunluğu, tayin limiti (LoD), ölçüm limiti (LoQ), doğrusallık ve aralık ve de stabilite bulunmaktadır.

6.2 Çalışma Ortamı

Validasyon çalışmaları $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, camları UV korumalı film ile kaplı, direkt flüoresans ışığı almayan laboratuvar ortamında yapılmıştır. Analizler sırasında amber renkli cam malzeme kullanılmasına özen gösterilmiştir. Amber renkli olarak temin edilemeyen cam malzemeler çalışma esnasında alüminyum folyo ile sarılmıştır.

6.3 Mobil Fazın Hazırlanması

Bu işlem için Çizelge 5.1'de belirtilmiş olan kimyasallar ve de ultra saf su sistemi 611UV'den elde edilen su kullanılmıştır.

620 mL su, 160 mL aseto nitril ve 220 mL metanol 1 litrelik ölçülü balona alınarak karıştırıldı. 120 mg KBr ve 350 μL 4M HNO_3 ilave edildi. KBr çalkalanarak çözüldü. Bu şekilde elde edilen mobil faz 0.45 μ 'luk filtreden süzüldü.

6.4 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Çözeltilerin hazırlanmasında destile su kullanılmıştır.

6.4.1 Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (pH = 7.4)

0.20 g potasyum klorür, 0.20 g potasyum dihidrojen fosfat, 1.16 g disodyum hidrojen fosfat ve 8.00 g sodyum klorür 1L'lik ölçülü balona tartıldı. 900 mL su ilave edilerek iyice çözüldü. Tuzlar tamamen çözüldükten sonra, 0.1 mol/L konsantrasyonundaki hidroklorik asit ya da 0.1 mol/L konsantrasyonundaki sodyumhidroksit kullanılarak pH 7.4'e ayarlandı. Ölçülü balonun hacmi suyla 1 L'ye tamamlandı.

6.4.2 Nitrik Asit Çözeltisi (4 mol/L)

% 65'lik (v/v) nitrik asitten 28.1 mL alındı, ölçülü balonun hacimi su ile 100 mL'ye tamamlandı.

6.4.3 Ekstraksiyon Çözeltisi

80 hacim metanol 20 hacim su ile karıştırıldı.

6.4.4 Seyreltme Çözeltisi (Metanol-Su Karışımı)

40 hacim metanol 60 hacim su ile karıştırıldı.

6.4.5 Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Referans Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Aflatoksin referans standardı çözeltilerinin hazırlanmasında ultra saf su sistemi Sartorius arium 611UV'den elde edilen su kullanılmıştır.

6.4.5.1 Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Referans Standartlarının Stok Çözeltileri

Dr. Ehrenstorfer GmbH'den 1 mL'lik amber renkli cam ampullerde, metanol içinde, 3.00 mg/L konsantrasyonunda temin edilen aflatoksin G₂, aflatoksin G₁, aflatoksin B₂ ve aflatoksin B₁ sertifikalı referans standartları stok çözeltileri olarak kullanılmıştır.

6.4.5.2 Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Referans Standartlarının 1.Mix Ara Stok Çözeltisi (150 µg/L)

Ayrı ayrı ampuller içerisinde metanolde çözülmüş olarak bulunan 3.00 mg/L konsantrasyonundaki aflatoksin G₂, aflatoksin G₁, aflatoksin B₂ ve aflatoksin B₁ referans standart stok çözeltilerinin her birinden 1.0 mL'lik porsiyonlar alınarak 20 mL'lik amber renkli bir ölçülü balona aktarıldı. Balon hacmi metanol ile 20 mL'ye tamamladı.

6.4.5.3 Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Referans Standartlarının 2.Mix Ara Stok Çözeltisi (75 µg/L)

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının 1. mix ara stok çözeltisinden (150 µg/L) 5 mL'lik bir porsiyon 10 mL'lik amber renkli bir ölçülü balona alındı ve balonun hacmi metanol ile tamamlandı.

6.4.5.4 Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Referans Standartlarının 3. Mix Ara Stok Çözeltisi (60 µg/L)

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının 1. mix ara stok çözeltisinden (150 µg/L) 10 mL'lik bir porsiyon 25 mL'lik amber renkli bir ölçülü balona alındı ve balonun hacmi su ile tamamlandı.

6.4.5.5 Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Referans Standartlarının 4. Mix Ara Stok Çözeltisi (6 µg/L)

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının 3. mix ara stok çözeltisinden (60 µg/L) 1 mL'lik bir porsiyon 10 mL'lik amber renkli bir ölçülü balona alındı ve balonun hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı.

6.4.6 Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Mix Referans Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması (0.36 µg/L, 0.72 µg/L, 1.2 µg/L, 1.5 µg/L, 2.4 µg/L ve 3.6 µg/L)

6.4.6.1 1.2 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının, madde 6.4.5.4'te belirtilen şekilde hazırlanmış 3. mix ara stok çözeltisinden (60 µg/L) 2.0 mL'lik bir porsiyon alınarak 100 mL'lik amber renkli ölçülü balona aktarıldı ve balon seyreltme çözeltisi ile hacimine tamamlandı.

6.4.6.2 1.5 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının, madde 6.4.5.4'te belirtilen şekilde hazırlanmış 3. mix ara stok çözeltisinden (60 µg/L) 5.0 mL'lik bir porsiyon alınarak 200 mL'lik amber renkli ölçülü balona aktarıldı ve balon seyreltme çözeltisi ile hacimine tamamlandı.

6.4.6.3 2.4 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının, madde 6.4.5.4'te belirtilen şekilde hazırlanmış 3. mix ara stok çözeltisinden (60 µg/L) 4.0 mL'lik bir porsiyon alınarak

100 mL'lik amber renkli ölçülü balona aktarıldı ve balon seyreltme çözeltisi ile hacimine tamamlandı.

6.4.6.4 3.6 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının, madde 6.4.5.4'te belirtilen şekilde hazırlanmış 3. mix ara stok çözeltisinden (60 µg/L) 6.0 mL'lik bir porsiyon alınarak 100 mL'lik amber renkli ölçülü balona aktarıldı ve balon seyreltme çözeltisi ile hacimine tamamlandı.

6.4.6.5 0.36 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının, madde 6.4.6.4'te belirtilen şekilde hazırlanmış, 3.6 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içeren mix referans çalışma çözeltisinden 1.0 mL'lik bir porsiyon alınarak 10 mL'lik amber renkli ölçülü balona aktarıldı ve balon seyreltme çözeltisi ile hacimine tamamlandı.

6.4.6.6 0.72 µg/L Konsantrasyonundaki Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ Mix Referans Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının, madde 6.4.6.4'te belirtilen şekilde hazırlanmış, 3.6 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içeren mix referans çalışma çözeltisinden 2.0 mL'lik bir porsiyon alınarak 10 mL'lik amber renkli ölçülü balona aktarıldı ve balon seyreltme çözeltisi ile hacimine tamamlandı.

6.4.7 Yerfıstığı Örnek Çözeltisinin Hazırlanması

Aşağıdaki çalışmalar madde 6.2'de belirtilen laboratuvar şartları altında yapılmıştır.

Yaklaşık 1.5 kg iç yerfıstığı örneği iç piyasadan temin edildi ve ultraturrax blender'da porsiyonlar halinde öğütüldü. Öğütülen porsiyonlar karıştırılarak homojen hale getirildi. 50.0 g 'lık bir test örneği 0.001 g hassasiyetle 500 mL'lik şilifli erlene tartıldı. 5 g sodyum klorür, 300 mL ekstraksiyon çözeltisi ve 100 mL n-Hekzan ilave edildi. Karışım elde 30 saniye şiddetle, daha sonra ise 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çalkalandı. n-Hekzan fazının ayrılması için beklendi. Alt faz kaba filtre kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 20 mL'si atıldı. Kalan süzüntü amber renkli kapaklı bir cam şişeye alındı. Amber renkli cam şişeye aktarılan bu süzüntü örnek çözeltisi olarak kullanıldı.

6.5 İmmünoaffinite Kolonlarının Hazırlanması – Şartlanması

Buzdolabında saklanmakta olan immünoaffinite kolonları dolaptan çıkarıldı ve kolonların oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Oda sıcaklığına gelen immünoaffinite kolonları rezervuara bağlandı. Kolonlardan 2-3 mL/dak akış hızıyla önce 10 mL su daha sonra ise 10 mL madde 6.4.1’de belirtildiği şekilde hazırlanmış fosfat tamponlu tuz çözeltisi (pH = 7.4) geçirildi. Kolon dolgu maddesi üzerinde yaklaşık 0.5 mL çözelti kalınca rezervuarın vanası kapatıldı.

6.6 Örnek Ekstraktının Temizlenmesi ve Aflatoksinlerin Elusyonu

Aşağıdaki çalışmalar madde 6.2’de belirtilen laboratuvar şartları altında yapılmıştır.

6.6.1 Örnek Ekstraktının Temizlenmesi

Şartlanmış immünoaffinite kolonunun rezervuarına 60 mL fosfat tamponlu tuz çözeltisi (pH = 7.4) aktarıldı. Yerfistiği örnek çözeltisinden 10.0 mL’lik bir porsiyon alınarak rezervuardaki çözeltilere ilave edildi ve çözeltiler karıştırıldı. Akış hızı 1 damla/saniye (~3 mL/dak) olacak şekilde rezervuardaki çözelti kolondan geçirildi eluat atıldı. Kolon 15 mL destile su ile yıkandı, eluat atıldı. Kolondan 15-20 saniye süreyle hava geçirilerek kolon kurutuldu.

6.6.2 Aflatoksinlerin Elusyonu

İmmünoaffinite kolonunun altına 5 mL’lik amber renkli bir ölçülü balon yerleştirildi. Kolondan 1 mL metanol geçirildi ve eluat toplandı. 1 dakika beklendikten sonra kolondan 1 mL daha metanol geçirildi ve eluat toplandı. Ölçülü balonun hacmi destile su ile 5 mL’ye tamamlandı. Çözelti 0.45 µm’lik filtreden süzüldü. Böylece enjekte edilecek örnek çözeltisi elde edildi.

6.7 Yapılan Validasyon Çalışmalarının Kapsamı

Aşağıdaki çalışmalar madde 6.2’de belirtilen laboratuvar şartları altında yapılmıştır.

6.7.1 Seçicilik Çalışmaları (Selectivity – Specificity)

6.7.1.1 İmmünoaffinite Kolonu Kullanımının Piklerin Çıkış Zamanları Üzerine Etkisinin İncelenmesi

1.5 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içeren mix referans çalışma çözeltisi immünoaffinite kolonundan geçirilmeden ve de geçirilerek birer kez sisteme enjekte edildi. İmmünoaffinite

kolonundan geçirilerek ve de geçirilmeden elde edilen enjeksiyon çözeltilerindeki aflatoksin G₂, G₁, B₂ ve B₁ piklerinin çıkış zamanları bulundu.

6.7.1.2 Matriksten (yerfistiği), Enjeksiyon Solventinden ve Mobil Fazdan Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi

Matriksten (yerfistiği), enjeksiyon solventinden ve mobil fazdan gelen interferansların değerlendirilmesi için aşağıdaki çalışmalar yapıldı:

6.7.1.2.1 Matriksten (yerfistiği) Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içermeyen bir yerfistiği örneği ile 200 µL'lik bir enjeksiyon yapıldı. Yapılan enjeksiyona ait örnek kromatogramında, aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanlarındaki yabancı pikler değerlendirildi.

6.7.1.2.2 Enjeksiyon Solventinden Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi

Enjeksiyon solvent karışımı olarak kullanılan metanol:su (40:60) karışımından 200 µL sisteme enjekte edildi. Yapılan enjeksiyona ait örnek kromatogramında, aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanlarındaki yabancı pikler değerlendirildi.

6.7.1.2.3 Mobil Fazdan Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi

Madde 6.3'te belirtilen şekilde hazırlanmış mobil fazdan 200 µL sisteme enjekte edildi. Yapılan enjeksiyona ait örnek kromatogramında, aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanlarındaki yabancı pikler değerlendirildi.

6.7.2 Doğruluk ve Geri Kazanım Çalışmaları (Accuracy and Recovery)

Yerfistiğinde bulunabilecek ortalama aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ konsantrasyonu 4.8 µg/L olarak kabul edildi. 4.8 µg/L'lik konsantrasyon %100'lük konsantrasyon değeridir ve buna bağlı olarak %50'lik değer 2.4 µg/L ve %150'lik değer ise 7.2 µg/L olarak kabul edildi.

Yapılan çalışmalar ile gerçek bir geri kazanım değerlendirmesi yapıldı ve mevcut kromatografik şartlar altında yerfistiği matriksinin analiz üzerindeki etkisi incelendi.

Örnekler ve paralelleri ile yapılan test çalışmaları sonucunda elde edilen aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ miktarları, laboratuvar şartları altında valide edilen test metodunun doğruluğunu belirledi.

%50, %100 ve %150'lik konsantrasyon değerlerinde aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içerecek şekilde kirlenmiş örnekler ile aşağıdaki çalışmalar yapıldı. Her konsantrasyon değeri için (% 50, % 100 ve % 150) iki ayrı günde ikişer paralel olmak üzere toplam dört numune hazırlandı.

6.7.2.1 % 50'lik Konsantrasyon Değerinde (2.4 µg/L) Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ İçerecek Örneklerin Hazırlanması

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içermediği bilinen öğütülmüş yerfıstığı örneğinden 1mg hassasiyetle 50g'lık iki porsiyon tartıldı. Her bir örneğe madde 6.4.5.4'te belirtilen şekilde hazırlanan aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının 3. mix ara stok çözeltisi'nden (60 µg/L) 2.0 mL ilave edilerek örnek kirlendi. Kirlenmiş örneğe 5 g sodyum klorür, 300 mL ekstraksiyon çözeltisi ve 100 mL n-Hekzan ilave edildi. Karışım elde 30 saniye şiddetle, daha sonra ise 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çalkalandı. n-Hekzan fazının ayrılması için beklendi. Alt faz kaba filtre kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 20 mL'si atıldı. Bu şekilde elde edilen çözeltiliye madde 6.6.1 ve madde 6.6.2'de belirtilen işlemler uygulandı. Elde edilen her bir örnek çözeltisi iki defa sisteme enjekte edildi.

2.4 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içerecek şekilde kirlenmiş olan örneğin enjeksiyon çözeltisi 0.8 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içermektedir.

6.7.2.2 %100'lük Konsantrasyon Değerinde (4.8 µg/L) Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ İçerecek Örneklerin Hazırlanması

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içermediği bilinen öğütülmüş yerfıstığı örneğinden 1mg hassasiyetle 50g'lık iki porsiyon tartıldı. Her bir örneğe madde 6.4.5.4'te belirtilen şekilde hazırlanan aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının 3. mix ara stok çözeltisi'nden (60 µg/L) 4.0 mL ilave edilerek örnek kirlendi. Kirlenmiş örneğe 5 g sodyum klorür, 300 mL ekstraksiyon çözeltisi ve 100 mL n-Hekzan ilave edildi. Karışım elde 30 saniye şiddetle, daha sonra ise 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çalkalandı. n-Hekzan fazının ayrılması için beklendi. Alt faz kaba filtre kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 20 mL'si atıldı. Bu şekilde elde edilen çözeltiliye madde 6.6.1 ve madde 6.6.2'de belirtilen işlemler uygulandı. Elde edilen her bir örnek çözeltisi iki defa sisteme enjekte edildi.

4.8 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içerecek şekilde kirlenmiş olan örneğin enjeksiyon çözeltisi 1.6 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içermektedir.

6.7.2.3 % 150'lik Konsantrasyon Değerinde (7.2 µg/L) Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ İçerecek rneklerin Hazırlanması

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içermediği bilinen gütlmüş yerfıstığı örneğinden 1mg hassasiyetle 50g'lık iki porsiyon tartıldı. Her bir örneğe madde 6.4.5.4'te belirtilen şekilde hazırlanan aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının 3. mix ara stok çözeltisi'nden (60 µg/L) 6.0 mL ilave edilerek örnek kirletildi. Kirletilmiş örneğe 5 g sodyum klorür, 300 mL ekstraksiyon çözeltisi ve 100 mL n-Hekzan ilave edildi. Karışım elde 30 saniye şiddetle, daha sonra ise 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çalkalandı. n-Hekzan fazının ayrılması için beklendi. Alt faz kaba filtre kağından süzüldü. Süzüntünün ilk 20 mL'si atıldı. Bu şekilde elde edilen çözeltiye madde 6.6.1 ve madde 6.6.2'de belirtilen işlemler uygulandı. Elde edilen her bir örnek çözeltisi iki defa sisteme enjekte edildi.

7.2 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içerecek şekilde kirletilmiş olan örneğin enjeksiyon çözeltisi 2.4 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içermektedir.

6.7.3 Kesinlik (Precision)

Kesinlik iki alt bölüm halinde incelendi. Bu bölümler sistemin tekrarlanabilirliği ve de metodun tekrarlanabilirliğidir.

Kesinlik, standart sapma (SD) ve % relatif standart sapma (%RSD) cinsinden ifade edilmiştir.

6.7.3.1 Metod Tekrarlanabilirliği

Metodun tekrarlanabilirliği; aynı analitik şartlar altında yapılan belirli bir sayıdaki ölçümün sonucunda elde edilen aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ miktarlarının birbirlerine yakınlığının ölçüsüdür.

Metodun tekrarlanabilirliğini kanıtlamak için, madde 6.7.2.2'de belirtildiği gibi, 4.8 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içerecek şekilde kirletilmiş örnekten elde elden çözelti, ard arda 7 defa sisteme enjekte edildi.

6.7.3.2 Cihaz Tekrarlanabilirliği

Cihazın tekrarlanabilirliği ise yapılan enjeksiyonlar sonucu elde edilen aflatoksin piklerinin çıkış zamanlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür.

Cihazın tekrarlanabilirliğini kanıtlamak için, madde 6.7.3.1'de belirtilen şekilde yapılan enjeksiyonlar dikkate alındı.

6.7.4 Sistem Uygunluk Çalışmaları (System Suitability Studies)

Sistem uygunluk çalışmaları sırasında madde 6.4.6.2'de belirtilen şekilde hazırlanmış, 1.5 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içeren, mix referans çalışma çözeltisi sisteme ard arda 11 kere enjekte edildi. Sonuçlar alıkonma zamanı, pik alanı, pik yüksekliği, kapasite faktörü, rezolüsyon ve de teorik plaka sayısı açısından incelendi.

6.7.5 Tayin Limiti Çalışmaları (LoD)

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içermediği bilinen öğütülmüş yarfıstığı örneğinden 1 mg hassasiyetle 50 g tartıldı. Bu örneğe, madde 6.4.5.5'te belirtilen şekilde hazırlanan aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının 4. mix ara stok çözeltisinden (6 µg/L) 9.0 mL ilave edilerek örnek kirletildi. Kirletilmiş örneğe 5 g sodyum klorür, 300 mL ekstraksiyon çözeltisi ve 100 mL n-Hekzan ilave edildi. Karışım elde 30 saniye süreyle şiddetle, daha sonra ise 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çalkalandı. n-Hekzan fazının ayrılması için beklendi. Alt faz kaba filtre kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 20 mL'si atıldı. Bu şekilde elde edilen çözeltiye madde 6.6.1 ve madde 6.6.2'de belirtilen işlemler uygulandı. Böylece 0.36 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içeren bir örnek enjeksiyon çözeltisi elde edildi. Hazırlanan bu örnek çözeltisi ard arda 12 defa sisteme enjekte edildi. Bulunan aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ miktarlarının standart sapması hesaplandı. Standart sapmanın 3 katı tayin limiti olarak kabul edildi.

6.7.6 Ölçüm Limiti Çalışmaları (LoQ)

Madde 6.7.5'te yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen standart sapma değerinin 10 katı ölçüm limiti olarak kabul edildi.

6.7.7 Doğrusallık ve Aralık Çalışmaları

Madde 6.4.6'da belirtilen şekilde hazırlanan, 0.36 µg/L, 0.72 µg/L, 1.2 µg/L, 1.5 µg/L, 2.4 µg/L ve 3.6 µg/L konsantrasyonlarındaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ mix referans çalışma çözeltileri kullanılarak enjeksiyonlar yapıldı. Bu enjeksiyonlardan elde edilen sonuçlar kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizildi ve kalibrasyon eğrilerinin bağıntı katsayıları (R²) hesaplandı.

6.7.8 Stabilité Çalışmaları

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içermediği bilinen öğütülmüş yarfıstığı örneğinden 1mg hassasiyetle 50g tartıldı. Örneğe, madde 6.4.5.5'te belirtilen şekilde hazırlanan aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarının 3. mix ara stok çözeltisinden (60 µg/L) 4.0 mL ilave edilerek örnek

kirletildi. Kirletilmiş örneğe 5 g sodyum klorür, 300 mL ekstraksiyon çözeltisi ve 100 mL n-Hekzan ilave edildi. Karışım elde 30 saniye süreyle şiddetle, daha sonra ise 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çalkalandı. n-Hekzan fazının ayrılması için beklendi. Alt faz kaba filtre kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 20 mL'si atıldı. Bu şekilde elde edilen çözeltiliye madde 6.6.1 ve madde 6.6.2'de belirtilen işlemler uygulandı. Bu şekilde hazırlanan 4.8 µg/L konsantrasyonundaki örnek çözeltisi ve de madde 6.4.6.2'de belirtilen şekilde hazırlanmış 1.5 µg/L konsantrasyonundaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ mix referans çalışma çözeltisi, hem renksiz hem de amber renkli viallere alındı. Viallerin bir seti floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında bekletildi, viallerin diğer seti ise buzdolabında bekletildi ve her iki vial setinden belirli aralıklarla enjeksiyonlar yapıldı. Belirtilen koşulların piklerin çıkış zamanını ve aflatoksin miktarlarını nasıl etkilediği incelendi.



7. SONUÇLAR

7.1 Seçicilik Çalışmaları (Selectivity – Specificity)

7.1.1 İmmünoaffinite Kolonu Kullanımının Piklerin Çıkış Zamanları Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Seçicilik çalışmaları sırasında, immünoaffinite kolonunun piklerin çıkış zamanları üzerine etkisini incelemek amacıyla, madde 6.7.1.1’de belirtilen mix referans çalışma çözeltisi, immünoaffinite kolonundan geçirilerek ve de geçirilmeden sisteme enjekte edildi. Yapılan enjeksiyonlar sonucunda; her iki çalışmadan elde edilen piklerin çıkış zamanları arasında kayda değer bir fark olmadığı görüldü (Çizelge 7.1).

Çizelge 7.1 İmmünoaffinite kolonunun aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanlarına etkisi

| Aflatoksinler | İmmünoaffinite Kolonundan Geçirilmeden | İmmünoaffinite Kolonundan Geçirildikten Sonra |
|----------------|--|---|
| | Çıkış Zamanı (dak) | Çıkış Zamanı (dak) |
| G ₂ | 9.677 | 9.682 |
| G ₁ | 11.938 | 11.930 |
| B ₂ | 13.337 | 13.362 |
| B ₁ | 16.768 | 16.782 |

7.1.2 Matriksten (yerfıstığı), Enjeksiyon Solventinden ve Mobil Fazdan Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi

Seçicilik çalışmaları sırasında matriksten (yerfıstığı), enjeksiyon solventinden ve mobil fazdan gelen interferansların değerlendirilmesi için yapılan çalışmalar sonucunda:

7.1.2.1 Matriksten (yerfıstığı) Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi

Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içermeyen bir yerfıstığı örneği ile yapılan 200 µL’lik enjeksiyon sonucunda bir örnek kromatogramı elde edildi. Örnek olarak kullanılan yerfıstığına ait bu kromatogramda aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanlarında herhangi bir yabancı pik gözlenmedi. Böylece yerfıstığı matriksinin aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ miktarlarını etkilemediği kanıtlanmış oldu.

7.1.2.2 Enjeksiyon Solventinden Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi

Enjeksiyon solvent karışımı olarak kullanılan metanol:su (40:60) karışımından yapılan 200 µL'lik enjeksiyona ait örnek kromatogramında, aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanlarında herhangi bir yabancı pik gözlenmedi. Böylece enjeksiyon solventinin aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ miktarlarını etkilemediği kanıtlanmış oldu.

7.1.2.3 Mobil Fazdan Gelen İnterferansların Değerlendirilmesi

Kullanılan mobil fazdan (bkz. madde 6.3) yapılan 200 µL'lik enjeksiyona ait örnek kromatogramında, aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanlarında herhangi bir yabancı pik gözlenmedi. Böylece mobil fazın aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ miktarlarını etkilemediği kanıtlanmış oldu.

7.2 Doğruluk ve Geri Kazanım Çalışmaları (Accuracy and Recovery)

Yapılan çalışmalarda; % geri kazanım hesapları için kullanılan denklem aşağıda verilmiştir.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan konsantrasyon}}{\text{Teorik konsantrasyon}} \times 100 \quad (7.1)$$

7.2.1 %50'lik Konsantrasyon Değerinde (2.4 µg/L) Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ İçeren Örneklerle Yapılan Çalışmalar

i) %50'lik konsantrasyon değerinde aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ilk gün hazırlanan örneklerle yapılan enjeksiyonların sonuçları Çizelge 7.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 7.2 2.4 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ilk gün hazırlanan iki paralel örneğe ait sonuçlar.

| Örnekler | Aflatoksinlerin % Geri Kazanımı | | | |
|-------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| Kirletilmiş Örnek No: 1 | 87.08 | 103.33 | 105.42 | 107.50 |
| Kirletilmiş Örnek No: 2 | 90.00 | 107.50 | 105.80 | 110.80 |
| Ortalama % Geri Kazanım | 88.54 | 105.42 | 105.61 | 109.15 |

ii) %50'lik konsantrasyon değerinde aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ikinci gün hazırlanan örneklerle yapılan enjeksiyonların sonuçları izelge 7.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 7.3 2.4 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ikinci gün hazırlanan iki paralel örneğe ait sonuçlar

| rnekler | Aflatoksinlerin % Geri Kazanımı | | | |
|-------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| Kirletilmiş rnek No: 1 | 84.71 | 100.40 | 103.15 | 111.38 |
| Kirletilmiş rnek No: 2 | 91.14 | 104.95 | 105.01 | 106.72 |
| Ortalama % Geri Kazanım | 87.93 | 102.68 | 104.08 | 109.05 |

7.2.2 %100'lk Konsantrasyon Değerinde (4.8 µg/L) Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ İçeren rneklerle Yapılan alışmalar

i) %100'lk konsantrasyon değerinde aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ilk gün hazırlanan örneklerle yapılan enjeksiyonların sonuçları izelge 7.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 7.4 4.8 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ilk gün hazırlanan iki paralel örneğe ait sonuçlar

| rnekler | Aflatoksinlerin % Geri Kazanımı | | | |
|-------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| Kirletilmiş rnek No: 1 | 96.71 | 103.60 | 102.12 | 103.16 |
| Kirletilmiş rnek No: 2 | 97.41 | 103.36 | 99.79 | 100.55 |
| Ortalama % Geri Kazanım | 97.06 | 103.48 | 100.96 | 101.86 |

ii) %100'lk konsantrasyon değerinde aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ikinci gün hazırlanan örneklerle yapılan enjeksiyonların sonuçları izelge 7.5'te belirtilmiştir.

Çizelge 7.5 4.8 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ikinci gün hazırlanan iki paralel örneğe ait sonuçlar

| Örnekler | Aflatoksinlerin % Geri Kazanımı | | | |
|-------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| Kirletilmiş Örnek No: 1 | 94.29 | 99.98 | 97.89 | 97.99 |
| Kirletilmiş Örnek No: 2 | 82.08 | 87.58 | 83.97 | 83.52 |
| Ortalama % Geri Kazanım | 88.19 | 93.78 | 90.93 | 90.76 |

7.2.3 %150'lik Konsantrasyon Değerinde (7.2 µg/L) Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ İçeren Örneklerle Yapılan Çalışmalar

i) %150'lik konsantrasyon değerinde aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ilk gün hazırlanan örneklerle yapılan enjeksiyonların sonuçları çizelge 7.6'da belirtilmiştir.

Çizelge 7.6 7.2 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ilk gün hazırlanan iki paralel örneğe ait sonuçlar

| Örnekler | Aflatoksinlerin % Geri Kazanımı | | | |
|-------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| Kirletilmiş Örnek No: 1 | 93.33 | 97.58 | 96.59 | 96.61 |
| Kirletilmiş Örnek No: 2 | 92.32 | 96.65 | 94.52 | 95.67 |
| Ortalama % Geri Kazanım | 92.83 | 97.12 | 95.55 | 96.14 |

ii) % 150'lik konsantrasyon değerinde aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içecek şekilde ikinci gün hazırlanan örneklerle yapılan enjeksiyonların sonuçları çizelge 7.7'de belirtilmiştir.

Çizelge 7.7 7.2 µg/L aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ içeren iki paralel örneğin ikinci gün yapılan çalışmalarına ait sonuçlar

| Örnekler | Aflatoksinlerin % Geri Kazanımı | | | |
|-------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| Kirletilmiş Örnek No: 1 | 97.55 | 100.93 | 102.47 | 99.12 |
| Kirletilmiş Örnek No: 2 | 93.67 | 97.52 | 97.57 | 98.20 |
| Ortalama % Geri Kazanım | 95.61 | 99.23 | 100.02 | 98.66 |

Birinci ve ikinci gün gerçekleştirilen 4 analize ait ortalama % geri kazanım değerleri Çizelge 7.8’de belirtilmiştir.

Çizelge 7.8 Birinci ve ikinci gün yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların ortalaması

| Örnekler | Aflatoksinlerin Ortalama % Geri Kazanımı | | | | |
|----------------------------------|--|----------------|----------------|----------------|--------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ | TOTAL |
| 2.4 µg/L aflatoksin içeren örnek | 88.24 | 104.05 | 104.85 | 109.10 | 101.59 |
| 4.8 µg/L aflatoksin içeren örnek | 92.63 | 98.63 | 95.95 | 96.31 | 92.56 |
| 7.2 µg/L aflatoksin içeren örnek | 94.22 | 98.18 | 97.79 | 97.40 | 97.71 |

7.3 Kesinlik (Precision)

Madde 6.7.3.1 ve madde 6.7.3.2’de belirtilen çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Çizelge 7.9 ve Çizelge 7.10’da belirtilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar hem metodun hem de sistemin tekrarlanabilirliğini kanıtladı.

Çizelge 7.9 Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanları

| Enjeksiyon | Çıkış Zamanı (dak) | | | |
|-----------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| 1 | 9.352 | 11.408 | 12.772 | 15.898 |
| 2 | 9.323 | 11.377 | 12.743 | 15.858 |
| 3 | 9.323 | 11.367 | 12.737 | 15.825 |
| 4 | 9.303 | 11.347 | 12.713 | 15.835 |
| 5 | 9.425 | 11.358 | 12.733 | 15.872 |
| 6 | 9.383 | 11.520 | 12.887 | 16.067 |
| 7 | 9.345 | 11.458 | 12.832 | 16.010 |
| Ortalama | 9.345 | 11.405 | 12.774 | 15.909 |
| SD | 0.042 | 0.058 | 0.058 | 0.086 |
| % RSD | 0.452 | 0.513 | 0.455 | 0.540 |

Çizelge 7.10 Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin alanları

| Enjeksiyon | Pik Alanları | | | |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| 1 | 75273 | 71845 | 132630 | 76745 |
| 2 | 76566 | 71692 | 130544 | 76672 |
| 3 | 78537 | 73692 | 132701 | 76011 |
| 4 | 76387 | 74065 | 129267 | 75312 |
| 5 | 74995 | 70464 | 126654 | 72914 |
| 6 | 78975 | 73545 | 137086 | 78212 |
| 7 | 76493 | 71671 | 133282 | 77536 |
| Ortalama | 76746 | 72424.94 | 131737.7 | 76200.84 |
| SD | 1507.6 | 1343.94 | 3318.8 | 1730.84 |
| % RSD | 1.96 | 1.86 | 2.52 | 2.27 |

7.4 Sistem Uygunluk Çalışmaları (System Suitability Studies)

Madde 6.7.4'te belirtilen şekilde 11 enjeksiyon yapıldı. Yapılan çalışma ile aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ referans standartlarına ait piklerin çıkış zamanlarının, alanlarının, yüksekliklerinin tekrarlanabilir olduğu ispatlandı. Piklere ait bu özelliklerin tekrarlanabilirliği sistemin yapılan çalışma için uygun olduğunu kanıtladı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.11, Çizelge 7.12, Çizelge 7.13 ve Çizelge 7.14'te gösterilmiştir.

Çizelge 7.11 Aflatoksin G₂ pikinin alıkonma zamanı, alanı, yüksekliği ve bulunan kapasite faktörü, rezolüsyonu ve de teorik plaka sayısı

| Enjeksiyon | Alıkonma Zamanı (dak) | Pik Alanı | Pik Yüksekliği (mAU) | Kapasite Faktörü | Rezolüsyon | Teorik Plaka Sayısı (N) |
|-----------------|-----------------------|-----------|----------------------|------------------|------------|-------------------------|
| 1 | 9.802 | 102527 | 4744 | 3.90083 | 0.000 | 4692 |
| 2 | 9.778 | 104936 | 4738 | 3.88917 | 0.000 | 4629 |
| 3 | 9.803 | 100990 | 4670 | 3.90167 | 0.000 | 4752 |
| 4 | 9.788 | 102938 | 4701 | 3.89417 | 0.000 | 4514 |
| 5 | 9.788 | 99926 | 4693 | 3.89417 | 0.000 | 4594 |
| 6 | 9.782 | 99638 | 4553 | 3.89083 | 0.000 | 4697 |
| 7 | 9.797 | 103566 | 4651 | 3.89833 | 0.000 | 4693 |
| 8 | 9.803 | 100243 | 4578 | 3.90167 | 0.000 | 4652 |
| 9 | 9.780 | 101574 | 4729 | 3.89000 | 0.000 | 4768 |
| 10 | 9.697 | 101914 | 4671 | 3.84833 | 0.000 | 4648 |
| 11 | 9.670 | 100126 | 4658 | 3.83500 | 0.000 | 4550 |
| Ortalama | 9.772 | 101670.73 | 4671.45 | 3.88583 | 0.000 | 4653.545 |
| SD | 0.04 | 1694.87 | 61.41 | 0.02 | 0.00 | 78.80 |
| % RSD | 0.44 | 1.67 | 1.31 | 0.58 | 0.00 | 1.69 |

Çizelge 7.12 Aflatoxin G₁ pikinin alıkonma zamanı, alanı, yüksekliği ve bulunan kapasite faktörü, rezolüsyonu ve de teorik plaka sayısı

| Enjeksiyon | Alıkonma Zamanı (dak) | Pik Alanı | Pik Yüksekliği (mAU) | Kapasite Faktörü | Rezolüsyon | Teorik Plaka Sayısı (N) |
|-----------------|-----------------------|-----------|----------------------|------------------|------------|-------------------------|
| 1 | 12.043 | 94450 | 3957 | 5.02167 | 3.71763 | 5781 |
| 2 | 12.027 | 95103 | 3951 | 5.01333 | 3.72983 | 5818 |
| 3 | 12.045 | 95120 | 3973 | 5.02250 | 3.73745 | 5836 |
| 4 | 12.037 | 96079 | 3889 | 5.01833 | 3.69517 | 5765 |
| 5 | 12.023 | 92350 | 3861 | 5.01167 | 3.7017 | 5830 |
| 6 | 12.038 | 96325 | 3904 | 5.01917 | 3.72422 | 5698 |
| 7 | 12.033 | 95035 | 3884 | 5.01667 | 3.64345 | 5388 |
| 8 | 12.052 | 94502 | 3847 | 5.02583 | 3.66166 | 5448 |
| 9 | 12.017 | 95151 | 3946 | 5.00833 | 3.68694 | 5524 |
| 10 | 11.843 | 93902 | 3940 | 4.94667 | 3.66511 | 5706 |
| 11 | 11.858 | 94335 | 3932 | 4.92917 | 3.58556 | 5372 |
| Ortalama | 12.006 | 94459.27 | 3916.73 | 5.00303 | 3.68625 | 5651.455 |
| SD | 0.063 | 1074.82 | 41.91 | 0.03 | 0.05 | 182.66 |
| % RSD | 0.52 | 1.13 | 1.07 | 0.66 | 1.22 | 3.23 |

Çizelge 7.13 Aflatoksin B₂ pikinin alıkonma zamanı, alanı, yüksekliği ve bulunan kapasite faktörü, rezolüsyonu ve de teorik plaka sayısı

| Enjeksiyon | Alıkonma Zamanı (dak) | Pik Alanı | Pik Yüksekliği (mAU) | Kapasite Faktörü | Rezolüsyon | Teorik Plaka Sayısı (N) |
|-----------------|-----------------------|-----------|----------------------|------------------|------------|-------------------------|
| 1 | 13.462 | 151832 | 6369 | 5.73083 | 2.2451 | 7307 |
| 2 | 13.450 | 150227 | 6300 | 5.72500 | 2.25718 | 7282 |
| 3 | 13.470 | 149417 | 6274 | 5.73500 | 2.25998 | 7306 |
| 4 | 13.465 | 152828 | 6289 | 5.73250 | 2.24762 | 7152 |
| 5 | 13.458 | 151927 | 6400 | 5.72917 | 2.27773 | 7273 |
| 6 | 13.462 | 151917 | 6316 | 5.73083 | 2.23761 | 7207 |
| 7 | 13.447 | 152438 | 6347 | 5.72333 | 2.19057 | 7183 |
| 8 | 13.473 | 150753 | 6266 | 5.73667 | 2.21475 | 7301 |
| 9 | 13.433 | 146582 | 6292 | 5.71667 | 2.22291 | 7324 |
| 10 | 13.298 | 144319 | 6160 | 5.64917 | 2.22534 | 7062 |
| 11 | 13.253 | 147651 | 6241 | 5.62667 | 2.18885 | 7138 |
| Ortalama | 13.425 | 149990.1 | 6495.82 | 5.71235 | 2.23324 | 7230.455 |
| SD | 0.072 | 2740.76 | 64.91 | 0.04 | 0.03 | 86.97 |
| % RSD | 0.53 | 1.83 | 1.03 | 0.66 | 1.25 | 1.20 |

Çizelge 7.14 Aflatoksin B₁ pikinin alıkonma zamanı, alanı, yüksekliği ve bulunan kapasite faktörü, rezolüsyonu ve de teorik plaka sayısı

| Enjeksiyon | Alıkonma Zamanı (dak) | Pik Alanı | Pik Yüksekliği (mAU) | Kapasite Faktörü | Rezolüsyon | Teorik Plaka Sayısı (N) |
|-----------------|-----------------------|-----------|----------------------|------------------|------------|-------------------------|
| 1 | 16.873 | 88622 | 3258 | 7.43667 | 5.05585 | 8795 |
| 2 | 16.863 | 86681 | 3250 | 7.43167 | 5.09293 | 9027 |
| 3 | 16.877 | 85553 | 3207 | 7.43833 | 5.06215 | 8900 |
| 4 | 16.893 | 86507 | 3229 | 7.44667 | 5.08329 | 9007 |
| 5 | 16.870 | 86772 | 3273 | 7.43500 | 5.11351 | 9210 |
| 6 | 16.857 | 86635 | 3214 | 7.42833 | 5.02424 | 8839 |
| 7 | 16.858 | 87779 | 3277 | 7.42917 | 5.11979 | 9331 |
| 8 | 16.880 | 88554 | 3227 | 7.44000 | 5.07210 | 8978 |
| 9 | 16.630 | 84931 | 3216 | 7.41500 | 5.10561 | 9178 |
| 10 | 16.567 | 81619 | 3117 | 7.31500 | 4.99032 | 8972 |
| 11 | 16.818 | 81878 | 3168 | 7.28333 | 4.92626 | 8525 |
| Ortalama | 16.818 | 85957.36 | 3221.45 | 7.40902 | 5.05873 | 8978.364 |
| SD | 0.106 | 23.6138 | 46.95 | 0.06 | 0.06 | 220.41 |
| % RSD | 0.63 | 2.75 | 1.46 | 0.75 | 1.16 | 2.45 |

7.5 Tayin Limiti Çalışmaları (LoD)

Madde 6.7.5'te belirtilen şekilde hazırlanan, 0.36 µg/L konsantrasyonundaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ örnek çözeltisi sisteme 12 defa enjekte edildi. Bulunan aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ miktarlarının standart sapması hesaplandı. Standart sapmanın 3 katı tayin limiti olarak kabul edildi.

Çizelge 7.15 Yerfıstığında aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ için tayin limitleri

| | Aflatoksinler | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| Ard arda 12 miktar tayini için standart sapma | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 |
| Tayin Limiti (µg/L) | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.09 |

7.6 Ölçüm Limiti Çalışmaları (LoQ)

Madde 6.7.5'te yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen standart sapma değerinin 10 katı ölçüm limiti olarak kabul edildi. Aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ için hesaplanan ölçüm limitleri Çizelge 7.16'da belirtilmiştir.

Çizelge 7.16 Yerfıstığında aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ için ölçüm limitleri

| | Aflatoksinler | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| Ard arda 12 miktar tayini için standart sapma | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 |
| Tayin Limiti (µg/L) | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.30 |

7.7 Doğrusallık ve Aralık Çalışmaları

Madde 6.4.6'da belirtildiği şekilde 0.36 µg/L, 0.72 µg/L, 1.2 µg/L, 1.5 µg/L, 2.4 µg/L ve 3.6 µg/L konsantrasyonlarında hazırlanan aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ mix referans çalışma çözeltileri kullanılarak her bir konsantrasyon değeri için 5 enjeksiyon yapıldı. Bu

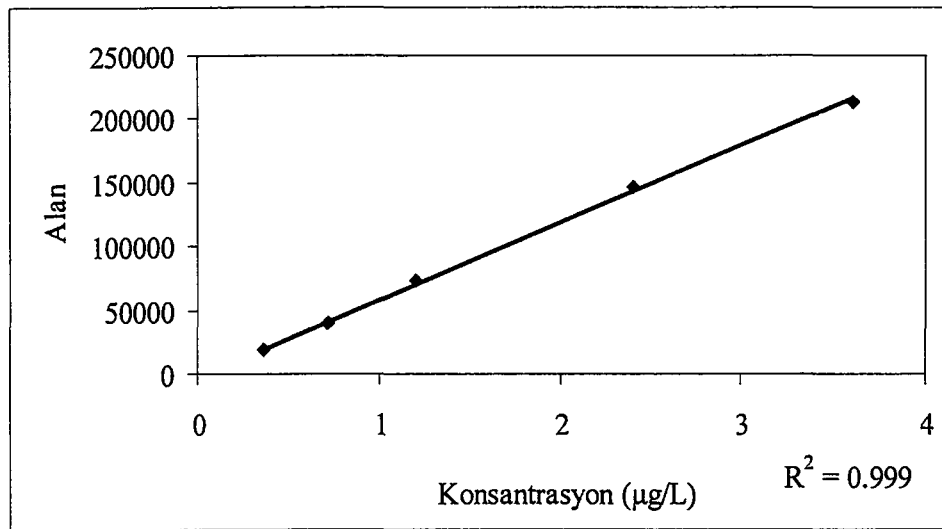
enjeksiyonlardan elde edilen sonuçlar kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizildi ve kalibrasyon eğrilerinin bağıntı katsayıları (R^2) hesaplandı.

Bağıntı katsayısının (R^2) minimum 0.995 değerinde olması gerekmektedir.

Her bir aflatoksin için hesaplanan bağıntı katsayıları yukarıda belirtilen R^2 koşulunu yerine getirmektedir.

Çizelge 7.17 Aflatoksin G₂ piki için elde edilen alan değerleri

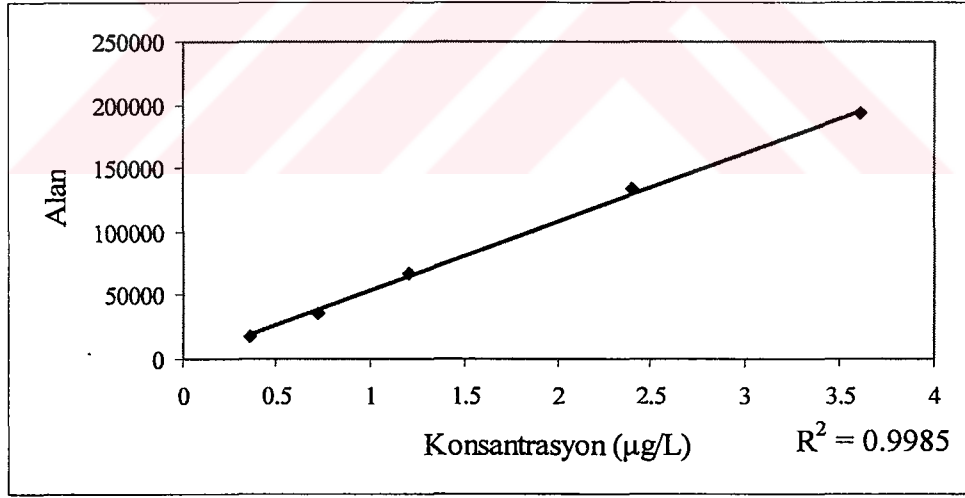
| Alanlar | Konsantrasyonlar ($\mu\text{g/L}$) | | | | |
|-----------------|--------------------------------------|---------|-------|----------|----------|
| | 0.36 | 0.72 | 1.2 | 2.4 | 3.6 |
| 1 | 21292 | 40410 | 74669 | 147485 | 214358 |
| 2 | 18495 | 39324 | 72921 | 146168 | 210825 |
| 3 | 18440 | 39530 | 70697 | 144598 | 215877 |
| 4 | 17623 | 38655 | 73444 | 145978 | 213940 |
| 5 | 17448 | 37624 | 71214 | 147604 | 212507 |
| Ortalama | 18659.6 | 39108.6 | 72589 | 146366.6 | 213501.4 |



Şekil 7.1 Aflatoksin G₂'ye ait doğrusallık grafiği

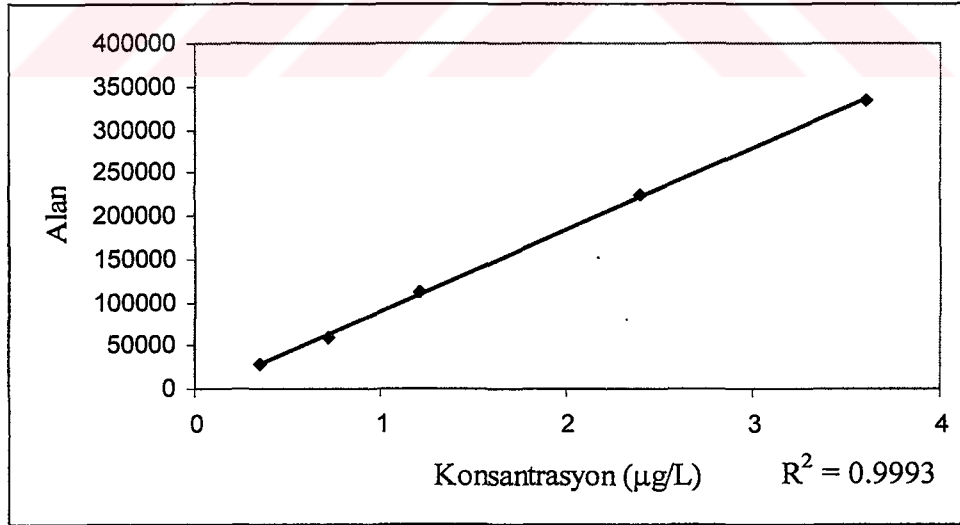
Çizelge 7.18 Aflatoksin G₁ piki için elde edilen alan değerleri

| Alanlar | Konsantrasyonlar (µg/L) | | | | |
|-----------------|-------------------------|---------|---------|--------|----------|
| | 0.36 | 0.72 | 1.2 | 2.4 | 3.6 |
| 1 | 19296 | 36869 | 66663 | 132679 | 196377 |
| 2 | 18231 | 36560 | 68145 | 134088 | 192293 |
| 3 | 18803 | 35255 | 67512 | 133355 | 193900 |
| 4 | 16991 | 38516 | 66312 | 134159 | 191123 |
| 5 | 17621 | 34813 | 68152 | 134744 | 191778 |
| Ortalama | 18188.4 | 36402.6 | 67356.8 | 133805 | 193094.2 |

Şekil 7.2 Aflatoksin G₁'e ait doğrusallık grafiği

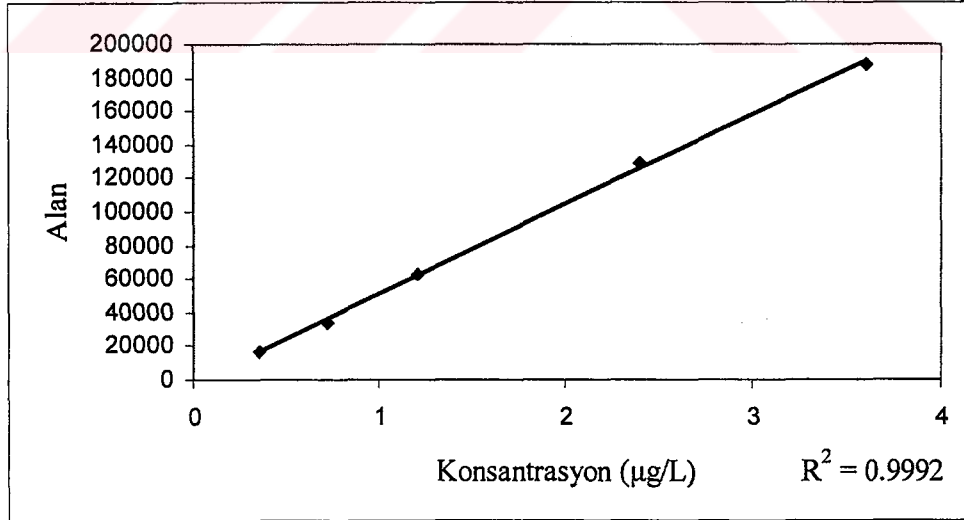
Çizelge 7.19 Aflatoksin B₂ piki için elde edilen alan değerleri

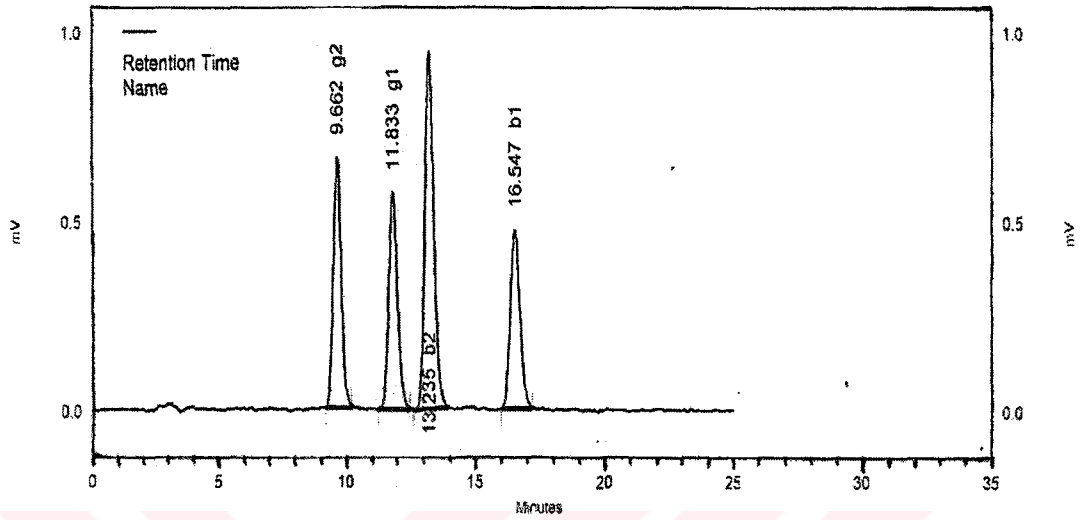
| Alanlar | Konsantrasyonlar (µg/L) | | | | |
|-----------------|-------------------------|---------|----------|--------|----------|
| | 0.36 | 0.72 | 1.2 | 2.4 | 3.6 |
| 1 | 31397 | 58685 | 112692 | 225523 | 334065 |
| 2 | 29385 | 58285 | 110223 | 225175 | 333102 |
| 3 | 26250 | 59788 | 112408 | 224786 | 335904 |
| 4 | 27688 | 61506 | 112445 | 225379 | 330754 |
| 5 | 27274 | 59799 | 115200 | 224492 | 333189 |
| Ortalama | 28398.8 | 59612.6 | 112593.6 | 225071 | 333402.8 |

Şekil 7.3 Aflatoksin B₂'ye ait doğrusallık grafiği

Çizelge 7.20 Aflatoksin B₁ piki için elde edilen alan değerleri

| Alanlar | Konsantrasyonlar (µg/L) | | | | |
|-----------------|-------------------------|---------|---------|----------|--------|
| | 0.36 | 0.72 | 1.2 | 2.4 | 3.6 |
| 1 | 15131 | 34115 | 63147 | 130862 | 190366 |
| 2 | 16783 | 36413 | 63125 | 127763 | 187855 |
| 3 | 16805 | 34015 | 63390 | 125165 | 188932 |
| 4 | 18160 | 35292 | 61910 | 131963 | 185745 |
| 5 | 15375 | 31448 | 64576 | 128173 | 189487 |
| Ortalama | 16450.8 | 34256.6 | 63229.6 | 128785.2 | 188477 |

Şekil 7.4 Aflatoksin B₁'e ait doğrusallık grafiği

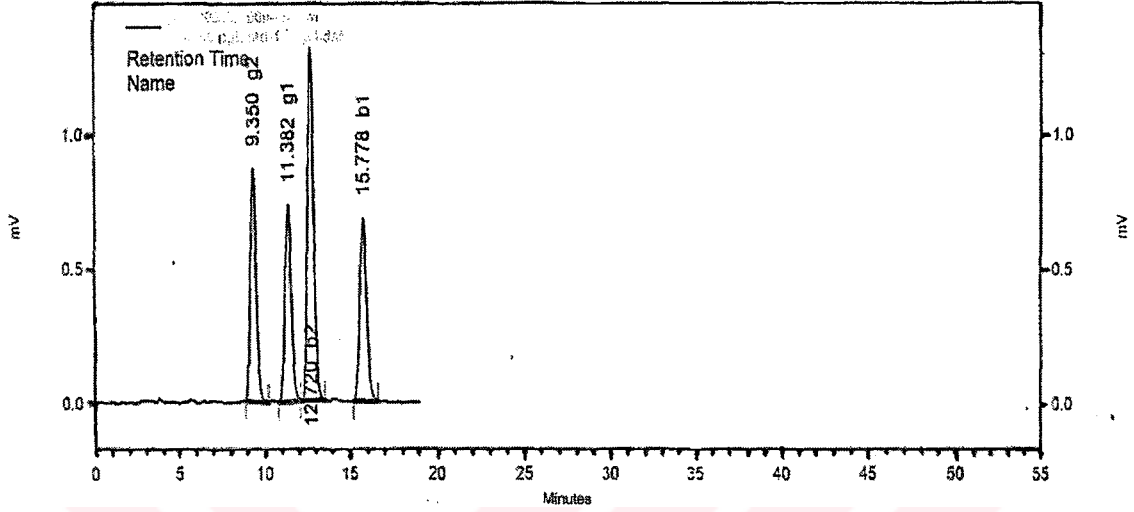


w sample (g) = 1
 mult. factor = 1
 seq name = D:\HPLC-FL\Sequence\fidistik val\260404 fidistik.seq

FL2000/FL3000-456n
 m Results (system
 (4/26/2004 10:52:50
 AM) (Reprocessed))

| Name | R.T. (min) | Area | Height | ESTD concentration |
|---------------|------------|---------------|--------------|--------------------|
| g2 | 9.662 | 144598 | 6633 | 2.400 CAL |
| g1 | 11.833 | 135355 | 5743 | 2.400 CAL |
| b2 | 13.235 | 224786 | 9416 | 2.400 CAL |
| b1 | 16.547 | 125165 | 4733 | 2.400 CAL |
| Totals | | 629904 | 26525 | 9.600 CAL |

Şekil 7.5 2.4 µg/L konsantrasyonundaki örnek çözeltisine ait kromotogram

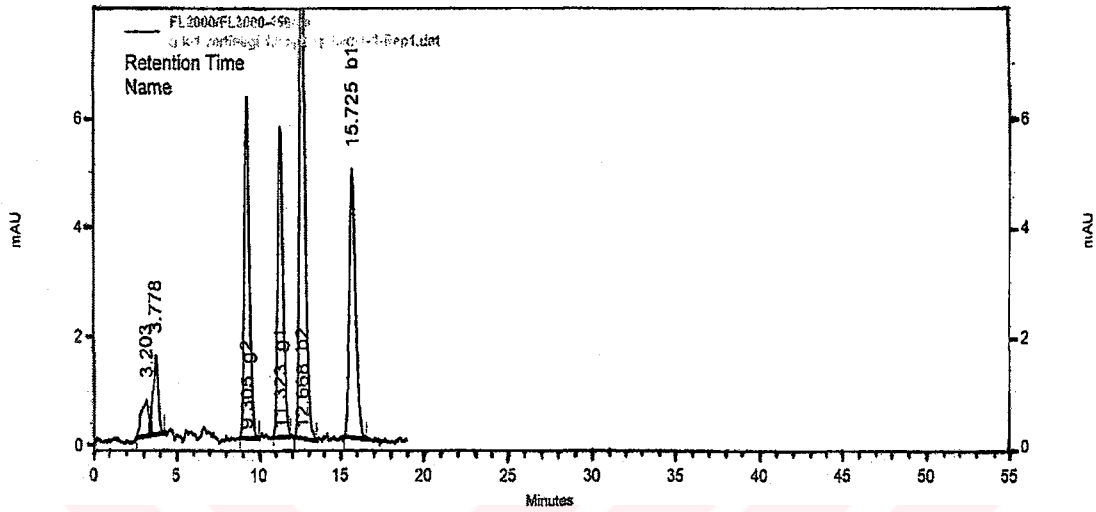


Sequence Name= D:\HPLC-FL\Sequence\istik val280404.seq
w Sample(g)= 1
Mult.= 1

FL2000/FL3000-456n
m Results (system
(5/3/2004 10:57:19
AM) (Reprocessed))

| Name | R.T. (min) | Area | Height | ESTD concentration |
|---------------|------------|--------|--------|-----------------------|
| g2 | 9.350 | 207812 | 8659 | 3.600 CAL |
| g1 | 11.382 | 189399 | 7300 | 3.600 CAL |
| b2 | 12.720 | 334175 | 13099 | 3.600 CAL |
| b1 | 15.778 | 191348 | 6794 | 3.600 CAL |
| Totals | | 922734 | 35852 | 14.400 CAL |

Şekil 7.6 3.6 µg/L konsantrasyonundaki örnek çözeltisine ait kromotogram



Sequence Name= D:\HPLC-FL\Sequence\fistik val\280404.seq
 w Sample(g)= 50.224
 Mult.= 150

FL2000/FL3000-456n
 m Results (system
 (5/3/2004 10:09:08
 AM) (Reprocessed))

| Name | R.T. (min) | Area | Height | ESTD concentration |
|---------------|------------|---------------|--------------|-----------------------|
| g2 | 9.305 | 88331 | 4168 | 4.711 |
| g1 | 11.323 | 85373 | 3786 | 4.920 |
| b2 | 12.668 | 150097 | 6422 | 4.924 |
| b1 | 15.725 | 84054 | 3274 | 4.912 |
| Totals | | 407855 | 17650 | 19.467 |

Şekil 7.7 4.8 µg/L konsantrasyonundaki örnek çözeltisine ait kromotogram

7.8 Stabilite Çalışmaları

Madde 6.7.8'de belirtildiği şekilde hazırlanan 4.8 µg/L konsantrasyonundaki örnek çözeltisi ve de madde 6.4.6.2'de belirtilen şekilde hazırlanan 1.5 µg/L konsantrasyonundaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ mix referans çalışma çözeltisi hem renksiz hem de amber renkli viallere alındı. Viallerin bir seti floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında bekletildi, viallerin diğer seti ise buzdolabında bekletildi ve her iki vial setinden belirli aralıklarla enjeksiyonlar yapıldı. Belirtilen koşulların piklerin çıkış zamanını ve aflatoksin miktarlarını nasıl etkilediği incelendi.

i) Renksiz vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında bekletilen numune ve standart çözeltilerinden sekizer saat arayla enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen kromotogramlardaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanları belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.21'de verilmiştir.

Çizelge 7.21 Renksiz vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında yapılan stabilite çalışmasında aflatoksin (G₂-G₁-B₂-B₁) piklerinin çıkış zamanları

| Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) Mix Referans Standart Çalışma Çözeltisi (1.5 µg/L) | | | | | 4.8 µg/L Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) İçerecek Şekilde Kirletilmiş Örnek | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Çıkış Zamanları (dak) | | | | | Çıkış Zamanları (dak) | | | | |
| Aflatoksinler | | | | | Aflatoksinler | | | | |
| Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ | Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| 0 | 9.802 | 12.043 | 13.462 | 16.873 | 0 | 9.810 | 12.049 | 13.465 | 16.875 |
| 8 | 9.778 | 11.923 | 13.015 | 16.463 | 8 | 9.761 | 11.801 | 13.002 | 16.363 |
| 16 | 9.603 | 11.748 | 12.903 | 16.177 | 16 | 9.653 | 11.691 | 12.845 | 16.007 |
| 24 | 9.588 | 11.045 | 13.465 | 15.993 | 24 | 9.568 | 11.037 | 12.489 | 15.893 |

ii) Renksiz vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında bekletilen numune ve standart çözeltilerinden sekizer saat arayla enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen kromotogramlardaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁'in miktarları belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.22'de verilmiştir.

Çizelge 7.22 Renksiz vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında yapılan stabilite çalışması sırasında elde edilen aflatoksin (G₂-G₁-B₂-B₁) miktarları

| Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) Mix Referans Standart Çalışma Çözeltisi (1.5 µg/L) | | | | | 4.8 µg/L Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) İçerecek Şekilde Kirletilmiş Örnek | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Bulunan Miktarlar (µg/L) | | | | | Bulunan Miktarlar (µg/L) | | | | |
| Aflatoksinler | | | | | Aflatoksinler | | | | |
| Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ | Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| 0 | 1.498 | 1.506 | 1.489 | 1.441 | 0 | 4.224 | 4.501 | 4.365 | 4.356 |
| 8 | 1.423 | 1.371 | 1.474 | 1.297 | 8 | 3.928 | 3.961 | 4.103 | 3.964 |
| 16 | 1.348 | 1.235 | 1.444 | 1.138 | 16 | 3.548 | 3.241 | 3.623 | 3.441 |
| 24 | 1.124 | 0.934 | 1.221 | 0.807 | 24 | 2.746 | 2.476 | 3.623 | 2.701 |
| 8. saatin sonundaki kayıp | %5 | %9 | %1 | %10 | 8. saatin sonundaki kayıp | %7 | %12 | %6 | %9 |
| 16. saatin sonundaki kayıp | %10 | %18 | %3 | %21 | 16. saatin sonundaki kayıp | %16 | %28 | %13 | %21 |
| 24. saatin sonundaki kayıp | %25 | %38 | %18 | %44 | 24. saatin sonundaki kayıp | %35 | %45 | %17 | %38 |

Renksiz vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında bekletilen numune ve standart çözeltilerinden yapılan enjeksiyonlar sonucunda, piklerin çıkış zamanlarının öne doğru kayma eğiliminde olduğu ve çözeltilerdeki aflatoksin miktarlarının bozunma sonucu giderek azaldığı gözlemlendi.

iii) Amber renkli vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında bekletilen numune ve standart çözeltilerinden sekizer saat arayla enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen kromotogramlardaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanları belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.23'te verilmiştir.

Çizelge 7.23 Amber renkli vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında yapılan stabilite çalışmasında aflatoksin (G₂-G₁-B₂-B₁) piklerinin çıkış zamanları

| Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) Mix Referans Standart Çalışma Çözeltisi (1.5 µg/L) | | | | | 4.8 µg/L Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) İçecek Şekilde Kirletilmiş Örnek | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Çıkış Zamanları (dak) | | | | | Çıkış Zamanları (dak) | | | | |
| Aflatoksinler | | | | | Aflatoksinler | | | | |
| Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ | Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| 0 | 9.780 | 12.038 | 13.450 | 16.873 | 0 | 9.780 | 12.038 | 13.450 | 16.873 |
| 8 | 9.697 | 12.033 | 13.470 | 16.863 | 8 | 9.689 | 12.033 | 13.470 | 16.863 |
| 16 | 9.670 | 12.052 | 13.465 | 16.877 | 16 | 9.654 | 12.052 | 13.465 | 16.877 |
| 24 | 9.772 | 12.017 | 13.458 | 16.893 | 24 | 9.790 | 12.017 | 13.458 | 16.893 |

iv) Amber renkli vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında bekletilen numune ve standart çözeltilerinden sekizer saat arayla enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen kromotogramlardaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁'in miktarları belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.24'te verilmiştir.

Amber renkli vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında bekletilen numune ve standart çözeltilerinden yapılan enjeksiyonlar sonucunda, piklerin çıkış zamanlarında kayda değer bir değişim olmamıştır, ancak çözeltilerdeki aflatoksin miktarlarının bozunma sonucu giderek azaldığı gözlemlendi. Ancak, aflatoksin miktarlarında gözlenen azalma renksiz viallerde yapılan stabilite çalışmalarına göre daha azdır.

Çizelge 7.24 Amber renkli vialler içerisinde, floresans lamba ile aydınlatılan laboratuvar ortamında yapılan stabilite çalışması sırasında elde edilen aflatoksin (G₂-G₁-B₂-B₁) miktarları

| Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) Mix Referans Standart Çalışma Çözeltisi (1.5 µg/L) | | | | | 4.8 µg/L Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) İçecek Şekilde Kirletilmiş Örnek | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Bulunan Miktarlar (µg/L) | | | | | Bulunan Miktarlar (µg/L) | | | | |
| Aflatoksinler | | | | | Aflatoksinler | | | | |
| Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ | Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| 0 | 1.499 | 1.501 | 1.510 | 1.422 | 0 | 4.225 | 4.499 | 4.375 | 4.366 |
| 8 | 1.454 | 1.441 | 1.508 | 1.323 | 8 | 4.014 | 4.049 | 4.244 | 4.104 |
| 16 | 1.394 | 1.351 | 1.450 | 1.266 | 16 | 3.718 | 3.644 | 3.862 | 3.580 |
| 24 | 1.304 | 1.231 | 1.253 | 1.052 | 24 | 2.958 | 2.924 | 3.763 | 3.100 |
| 8. saatin sonundaki kayıp | %3 | %4 | - | %7 | 8. saatin sonundaki kayıp | %5 | %10 | %3 | %6 |
| 16. saatin sonundaki kayıp | %7 | %10 | %4 | %11 | 16. saatin sonundaki kayıp | %12 | %19 | %9 | %18 |
| 24. saatin sonundaki kayıp | %13 | %18 | %17 | %26 | 24. saatin sonundaki kayıp | %30 | %35 | %14 | %29 |

v) Renksiz vialler içerisinde, buzdolabında bekletilen numune ve standart çözeltilerinden sekizer saat arayla enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen kromotogramlardaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanları belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.25'te verilmiştir.

Çizelge 7.25 Renksiz vialler içerisinde, buzdolabında bekletilerek gerçekleştirilen stabilite çalışmasında aflatoksin (G₂-G₁-B₂-B₁) piklerinin çıkış zamanları

| Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) Mix Referans Standart Çalışma Çözeltisi (1.5 µg/L) | | | | | 4.8 µg/L Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) İçecek Şekilde Kirletilmiş Örnek | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Çıkış Zamanları (dak) | | | | | Çıkış Zamanları (dak) | | | | |
| Aflatoksinler | | | | | Aflatoksinler | | | | |
| Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ | Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| 0 | 9.802 | 12.043 | 13.462 | 16.873 | 0 | 9.809 | 12.049 | 13.465 | 16.875 |
| 8 | 9.799 | 11.923 | 13.015 | 16.463 | 8 | 9.790 | 11.801 | 13.002 | 16.363 |
| 16 | 9.743 | 11.748 | 12.903 | 16.177 | 16 | 9.753 | 11.691 | 12.845 | 16.007 |
| 24 | 9.678 | 11.045 | 13.465 | 15.993 | 24 | 9.668 | 11.037 | 12.489 | 15.893 |

vi) Renksiz vialler içerisinde, buzdolabında bekletilen numune ve standart çözeltilerinden sekizer saat arayla enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen kromotogramlardaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁'in miktarları belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.26'da verilmiştir.

Bu çalışma sonucunda, buzdolabında bekletilen aflatoksin çözeltilerindeki bozunmanın laboratuvar ortamında bekletilen çözeltilerdeki bozunmaya göre daha az olduğu gözlemlenmiştir. Piklerin çıkış zamanlarında yine öne doğru bir kayma gözlemlendi, ancak bu kayma miktarı laboratuvar ortamında bekletilen çözeltilerdeki kadar fazla değildir. Esas olarak hazırlanan çözeltilerin taze olarak enjekte edilmesi tavsiye edilmektedir. Ancak, eğer çözeltiler taze olarak enjekte edilemiyorsa, çözeltilerin buzdolabı koşullarında bekletilerek enjekte edilmesi daha doğru sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır.

Çizelge 7.26 Renksiz vialler içerisinde, buzdolabında bekletilerek gerçekleştirilen stabilite çalışması sırasında elde edilen aflatoksin (G₂-G₁-B₂-B₁) miktarları

| Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) Mix Referans Standart Çalışma Çözeltisi (1.5 µg/L) | | | | | 4.8 µg/L Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) İçerecek Şekilde Kirletilmiş Örnek | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Bulunan Miktarlar (µg/L) | | | | | Bulunan Miktarlar (µg/L) | | | | |
| Aflatoksinler | | | | | Aflatoksinler | | | | |
| Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ | Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| 0 | 1.505 | 1.496 | 1.439 | 1.491 | 0 | 4.214 | 4.521 | 4.395 | 4.350 |
| 8 | 1.460 | 1.466 | 1.435 | 1.417 | 8 | 4.003 | 4.385 | 4.263 | 4.089 |
| 16 | 1.400 | 1.436 | 1.353 | 1.357 | 16 | 3.708 | 4.159 | 4.000 | 3.872 |
| 24 | 1.340 | 1.346 | 1.252 | 1.252 | 24 | 3.498 | 3.843 | 3.692 | 3.480 |
| 8. saatin sonundaki kayıp | %3 | %2 | - | %5 | 8. saatin sonundaki kayıp | %5 | %3 | %3 | %6 |
| 16. saatin sonundaki kayıp | %7 | %4 | %6 | %9 | 16. saatin sonundaki kayıp | %12 | %8 | %9 | %11 |
| 24. saatin sonundaki kayıp | %11 | %10 | %13 | %16 | 24. saatin sonundaki kayıp | %17 | %15 | %16 | %20 |

vii) Amber renkli vialler içerisinde, buzdolabında bekletilen numune ve standart çözeltilerinden sekizer saat arayla enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen kromotogramlardaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁ piklerinin çıkış zamanları belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.27'de verilmiştir.

Çizelge 7.27 Amber renkli vialler içerisinde, buzdolabında bekletilerek gerçekleştirilen stabilite çalışmasında aflatoksin (G₂-G₁-B₂-B₁) piklerinin çıkış zamanları

| Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) Mix Referans Standart Çalışma Çözeltisi (1.5 µg/L) | | | | | 4.8 µg/L Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) İçecek Şekilde Kirletilmiş Örnek | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Çıkış Zamanları (dak) | | | | | Çıkış Zamanları (dak) | | | | |
| Aflatoksinler | | | | | Aflatoksinler | | | | |
| Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ | Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| 0 | 9.789 | 12.038 | 13.450 | 16.873 | 0 | 9.780 | 12.038 | 13.450 | 16.873 |
| 8 | 9.770 | 12.033 | 13.470 | 16.863 | 8 | 9.689 | 12.033 | 13.470 | 16.863 |
| 16 | 9.759 | 12.052 | 13.465 | 16.877 | 16 | 9.654 | 12.052 | 13.465 | 16.877 |
| 24 | 9.772 | 12.017 | 13.458 | 16.893 | 24 | 9.790 | 12.017 | 13.458 | 16.893 |

viii) Amber renkli vialler içerisinde, buzdolabında bekletilen numune ve standart çözeltilerinden sekizer saat arayla enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen kromotogramlardaki aflatoksin G₂-G₁-B₂-B₁'in miktarları belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.28'de verilmiştir.

Çizelge 7.28 Amber renkli vialler içerisinde, buzdolabında bekletilerek gerçekleştirilen stabilite çalışması sırasında elde edilen aflatoksin (G₂-G₁-B₂-B₁) miktarları

| Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) Mix Referans Standart Çalışma Çözeltisi (1.5 µg/L) | | | | | 4.8 µg/L Aflatoksin (G ₂ -G ₁ -B ₂ -B ₁) İçerecek Şekilde Kirletilmiş Örnek | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Bulunan Miktarlar (µg/L) | | | | | Bulunan Miktarlar (µg/L) | | | | |
| Aflatoksinler | | | | | Aflatoksinler | | | | |
| Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ | Zaman (saat) | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ |
| 0 | 1.508 | 1.469 | 1.499 | 1.481 | 0 | 4.229 | 4.513 | 4.395 | 4.316 |
| 8 | 1.493 | 1.440 | 1.498 | 1.451 | 8 | 4.018 | 4.423 | 4.263 | 4.057 |
| 16 | 1.433 | 1.410 | 1.409 | 1.363 | 16 | 3.722 | 4.242 | 4.043 | 3.884 |
| 24 | 1.372 | 1.337 | 1.334 | 1.259 | 24 | 3.595 | 3.881 | 3.780 | 3.539 |
| 8. saatin sonundaki kayıp | %1 | %2 | - | %2 | 8. saatin sonundaki kayıp | %5 | %2 | %3 | %6 |
| 16. saatin sonundaki kayıp | %5 | %4 | %6 | %8 | 16. saatin sonundaki kayıp | %12 | %6 | %8 | %10 |
| 24. saatin sonundaki kayıp | %9 | %9 | %11 | %15 | 24. saatin sonundaki kayıp | %15 | %14 | %14 | %18 |

Bu çalışma sonucunda, buzdolabında bekletilen aflatoksin çözeltilerindeki bozunmanın laboratuvar ortamında bekletilen çözeltilerdeki bozunmaya göre daha az olduğu gözlenmiştir. Piklerin çıkış zamanlarında belirgin bir değişiklik gözlemlendi.

8. TARTIŞMA

Toplum ekonomisinde en önemli mübadele edilen mallardan biri olarak gıda hep önemini korumuştur. İnsan hayatının vazgeçilmez ihtiyacı olan gıda aynı zamanda insan hayatının tehdidi de olabilmektedir.

Bazı küflerin toksik metabolitleri olan mikotoksinler, insanlar ve hayvanlarda istenmeyen değişik etkilerin oluşmasına neden olabilirler. 1970'li yıllardan beri bu konuyla ilgili ulusal ve uluslar arası ilgi artarak devam etmektedir.

Son yıllarda yüzlerce farklı mikotoksin tipi belirlenmiştir. Ekonomik yönden aflatoksin en iyi bilinen ve önemli olduğu varsayılan toksindir. *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus paraciticus* küf mantarları arasında en sık aflatoksin üretimine rastlanılan mantarlardır. Bu tür mantarlar yüksek nemli ve sıcak ortamlarda rahatlıkla üreyebilmektedirler. Tropikal ve subtropikal bölgelerdeki bitkiler kontaminasyona daha çok maruz kalırlar.

Aflatoksinler yerfıstığı, mısır, bazı kuru yemişler (fıstık, fındık vd. yağlı tohumlar) ve incir gibi bazı meyvelerde bulunurlar. Aflatoksin ayrıca hayvan yemlerinde bulunması durumunda, bu yemleri tüketen hayvanlardan elde edilen süt ürünlerine de geçebilmektedir. İnekler aflatoksin ile kontamine olmuş yem ile beslendikleri zaman aflatoksin B₁'i aflatoksin M₁'e dönüştürmektedirler (Van Egmond, 1989).

Aflatoksinler hem insanlarda hem de hayvanlarda zehirlenmelere ve kansere yol açmaktadır (Newberne ve Butler, 1969; Shank vd., 1972; Peers ve Linsell, 1973; Eaton ve Groopman, 1994). Aflatoksin B₁, bilinen en kuvvetli doğal kanserojendir (Squire, 1981) ve toksijenik türler tarafından en çok üretilen aflotoksindir.

Ürüne küf sporlarının bulaşması ve bunu takiben aflatoksin üretiminin gerçekleşmesinden sonra, normal şartlarda ürünün yapısını bozmadan kimyasallar ile aflatoksinleri elemine etmek mümkün değildir. Ayrıca sıcaklığa oldukça dayanıklı olan aflatoksinler pastörizasyonla da üründe azaltılamamaktadır (Tosun, 1996).

Aflatoksinlerin insan sağlığı için oluşturdukları tehdit göz önüne alındığında, gıdalardaki aflatoksin miktarının doğru belirlenmesinin ne kadar önemli olduğunu anlamak mümkündür. Bu nedenden dolayı ülkemizde de uluslar arası otoriteler tarafından kabul gören analiz metodlarının kullanılması bir zorunluluk halini almıştır.

Bu çalışmada yerfıstığında HPLC ile aflatoksin tespiti için kullanılan metodun uluslar arası düzeyde olduğunun ispatlanması amaçlanmıştır.

Yapılan alışmalar sonucunda, kullanılan HPLC sisteminin yerfistüğında aflatoksin analizlerine uygun olduğu, kullanılan metodun ve sistemin performansının tekrarlanabilir olduğu ve çalışılan konsantrasyon aralığında (0.36-3.6 µg/L) yapılan ölçümlerin doğrusal olduğu kanıtlandı. Ayrıca yerfistüğında aflatoksin analizi için tayin ve ölçüm limitleri (LoD-LoQ) saptandı.

Yapılan stabilite çalışmaları ile de, belirli koşullarda bekletilen enjeksiyona hazır yerfistüğü numunelerinde bekleme sonucunda meydana gelen değişiklikler saptandı ve bazı öneriler sunuldu. Aflatoksin analizi sırasında hazırlanan çözeltilerin taze olarak enjekte edilmesi tavsiye edilmektedir, ancak eğer çözeltiler taze olarak enjekte edilemiyorsa, çözeltilerin amber renkli viallerde, buzdolabı koşullarında bekletilerek enjekte edilmesi daha doğru sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Arıoğlu, H.H., (1999), Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı. .Ü. Ziraat Fakóltesi Ders Kitabı, Genel Yayın No: 220, Adana., s.74-109.
- Barrett, J., (2000), Mycotoxins: of Molds and Maladies, Environ, Health Perspect., 108:A20-A23.
- Bennett, J.W., (1987), Mycotoxins, Mycotoxicoses, Mycotoxycology and Mycopathologia. Mycopathologia., 100: 3-5.
- Biçici, M., (2001), "Osmaniye'nin Simgesi: Yerfıstığı, Hastalık ve Zararlıları", Osmaniye., s.69-72.
- Blout, W.P., (1961), Turkey "X" Disease. Turkeys., 9: 52, 55-58, 61, 77.
- Bressac, B., Kew, M., Wands, J. ve Ozturk, M., (1991), Selective G to T Mutations of p53 Gene in Hepatocellular CArcinoma from Southern Africa., Nature., 350: 429-431.
- Brown, R.L., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. ve Cary, J.W., (1998), Recent Advances in Preharvest Prevention of Mycotoxin Contamination., In K.K. Sinha and D. Bhatnagar, (ed.), Mycotoxins in agriculture and food safety., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., p.351-379.
- Chazalet, V., Debeaupuis, J.P., Sarfati, J., Lortholary, J., Ribaud, P., Shah, P., Cornet, M., Vu Thien, H., Gluckman, E., Brücker, G. ve Latgé, J.P., (1998), Molecular Typing of Enviromental and Patient Isolates of *Aspergillus Fumigatus* from Various Hospital Settings, J. Clin Microbiol., 36: 1494-1500.
- Cole, R.J. ve Cox, R.H., (1981), Handbook of Toxic Fungal Metabolites, Academic Press, New York, N.Y.
- Cotty, P.J., Bayman, P., Egel, D.S. ve Elias, K.S., (1994), Agriculture, Aflatoxins and Aspergillus, In K. A. Powell, A. Renwick and J.F. Peberdy (ed.), The Genus Aspergillus., Plenum Pres, New York, N.Y., p.1-27.
- Cullen, J.M. ve Newberne, P.N., (1994), Acute Heptoxotoxicity of Aflatoxins., In D.L. Eaton and J.J. Groopman (ed.), The toxicity of Aflatoxins., Human Health, Veterinary and Agricultural Significance., Academic Press, San Diego., p. 3-26.
- Denning, D.W., (1998), Invazive Aspergillosis., Clin Infect Dis., 26: 781-805.
- Derici, B., (1997), Kuru İncirlerde Aflatoksin ve Okratoksin-A Oluşumunun Bazı Besin Maddeleri ile İlişkileri Üzerinde Araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bil. Ens. Bahçe Bitkileri.
- Detroy, R.W., Lillejoh, E.B. ve Ciegler, A., (1971), Aflatoksin and Related Compounds, In A. Ciegler, S. Kadis, and S.J. Ajl (ed.), Microbial Toxins, vol. VI: Fungal Toxins., Academic Pres, New York, N.Y., p.3-178.
- Diener, U.L., Cole, R.J., Sanders, T.H., Payne, G.A., Lee, L.S. ve Klich, M.A., (1987), Epidemiology of Aflatoxin Formation by *Aspergillus Flavus*., Annu. Rev. Phytopathol., 25:249-270.
- Eaton, D.L. ve Gallagher, E.P., (1994), Mechanisms of Aflatoxin Carcinogenesis., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 34: 135-172.
- Eaton, D.L. ve Groopman J.D., (1994), The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance., In J.D. Groopman (ed.), Academic Press, San Diego, Calif.
- Eaton, D.L. ve Ramsdel, H.S., (1992), Species and Diet Related Differences in Aflatoxin Biotransformation., In D. Bhatnagar, E.B. Lillehoj and D.K. Arora (ed.), Handbook of

- Applied Mycology, Vol. 5, Mycotoxins in Ecological Systems., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., p. 157-182.
- Forgacs, J., (1962), Mycotoxicoses-the Neglected Diseases, Feedstuffs., 34:124-134.
- Gül, A., Şahin, K. Ve Direk, M., (1995), Türkiye’de Yağlı Tohumlu Bitkiler Fiyat Analizi, Ç.Ü.Z.F. Dergisi., 10, (1): 171-186.
- Gül, A., (2001), “Osmaniye’nin Simgesi: Yerfıstığı, Hastalık ve Zararlıları”, Osmaniye., s.12-15.
- Graniti, A., (1972), The Evolution of the Toxic Concept in Plant Pathology, In R.K. Wood, A. Ballio and A. Graniti (ed.), Phytotoxins in Plant Diseases, Academic Press, New York, N.Y., p.1-18.
- Goto, T., Wicklow, D.T. ve Ito, Y., (1996), Aflatoxin and Cyclopiazonic Acid Production by a Sclerotiumproducing *Aspergillus Tamarii* Strain., Appl. Environ. Microbiol., 62:4036-4038.
- Henry, S.H., Bosch, F.X. ve Bowers, J.C., (2002), Aflatoxin, Hepatitis and Worldwide Liver Cancer Risk., In J.W. DeVries, M.W. Trucksess, and L.S. Jackson (ed.), Mycotoxins and Food Safety., Kluwer Academic/Plenum Publications., New York, N.Y., p. 229-320.
- Henry, S.H., Bosch, F.X., Troxell, T.C. ve Bolger, P.M., (1999), Reducing Liver Cancer-Global Control of Aflatoxin., Science., 286: 2453-2454.
- Horn, B.W. ve Grene, R.L., (1995), Vegetative Compatibility Within Populations of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii* from a Peanut Field., Mycologia., 87: 324-332.
- Hosphental, D.R., Kwon-Chung, K.J. ve Bennett, J.E., (1998), Concentrations of Airborne *Aspergillus* Compared to the Incidence of Invazive Aspergiollosis: Lack of Correlation., Med Mycol., 36: 165-168.
- Hsieh, D., (1988), Potential Human Health Hazards of Mycotoxins, In S. Natori, K. Hashimoto, and Y. Ueno (ed.), Mycotoxins and Phytotoxins., Third Joint Food and Agriculture Organization/W.H.O./United Nations E? Program International Conference of Mycotoxins., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands., p. 69-80.
- Hsu, I.C., Metcalf, R.A., Sun, T., Welsh, J.A., Wang, N.J. ve Haris, C.C., (1991), Mutational Hotspot in the p53 Gene in Human Hepatocellular Carcinomas., Nature., 350: 377-378.
- James, R.C., (1985), General Principles of Toxicology, In P.L. Williams and J.L. Burson (ed.), Industrial Toxicology, Van Nostrand Reinhold, New York, N.Y. p.7-26.
- Klich, M.A., (1987), Relation of Plant Water Potential at Flowering to Subsequent Cottonseed Infection by *Aspergillus Flavus*., Phytopathology 77:739-741.
- Klich, M.A. ve Pitt, J.I., (1988), Differentiation of *Aspergillus Flavus* from *Aspergillus Paraciticus* and other Closely Releted Species., Trans. Br. Mycol. Soc., 91:99-108.
- Klich, M.A., Mullaney, E.J., Daly, C.B. ve Cary J.W., (2000), Molecular and Physiological Aspects of Aflatoxin and sterigmatoxystin Biosynthesis by *A. tamarii* and *A. ochraceoroseus*., Appl.Microbiol. Biotechnol., 53:605-609.
- Klich, M.A., Yu, J., Chang, P.-K., Mullaney, E.J., Bhatnagar, D. Ve Cleveland, T.E., (1995), Hybridization of Genes Involved in Aflatoxin Biosynthesis to DNA of Aflatoxigenic and Nonafllatoxigenic *Aspergilli*., Appl. Microbiol., Biotechnol., 44: 439-443.
- Krishnamachari, K.A.V.R., Bhat, R.V., Nagarajan, V. Ve Tilnak, T.M.G., (1975), Hepatitis Due to Aflatoxicosis., An Outbreak in Western India., Lancet i: 1061-1063.

- Kwon Chung, K.J. ve Bennett, J.E., (1992), *Medical Mycology*, Lea and Fabinger., Philadelphia.
- Latgé, J.P., (1999), *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis., *Clin Microbiol Rev.*, 2: 310-350.
- Li, F.-Q., Yoshizawa, T., Kawamura, S., Luo, S.-Y. Ve Li, Y.-W., (2001), Aflatoxins and Fumonisin in Corn from the High-incidence Area for Human Hepatocellular Carcinoma in Guangxi, China, *J. Agric., Food Chem.*, 49:4122-4126.
- Lisker, N. Ve Lillehoj, E.B., (1991), Prevention of Mycotoxin Contamination (Principally Aflatoxin and Fusarium Toxins) at the Preharvest Stage, In J.E: Smith and R.S. Henderson (ed.), *Mycotoxins and Animal Foods*, CRC Pres, Boca Raton, Fla., p.689-719.
- Lopez-Diaz, T.M. ve Flannigan, B., (1997), Production of Patulin and Cytochalasin E by *Aspergillus Clavatus* During Malting of Barley and Wheat, *Int J. Food Microbiol.*, 2: 129-136.
- Maggon, K.K., Gupta, S.K. ve Venkatasubramanian, T.A., (1977), Biosynthesis of Aflatoxins. *Bacteriol. Rev.*, 41: 822-855.
- Newberne, P.M. ve Butler, W.H., (1969), Acute and Chronic Effect of Aflatoxin B₁ on the Liver of Domestic and Laboratory Animals: a review., *Cancer Res.*, 29:236-250.
- Ögütçü, Z., (1969), Yerfistiği ve Ziraatı. Türkiye Ticaret Odaları Sanayi Odaları ve Ticaret Borsaları Birliği, Ankara.
- Peers, F.G. ve Linsell, C.A., (1973), Dietary Aflatoxins and Human Liver Cancer-a Population Study Based in Kenya., *Br.J. Cancer.*, 27:473-484.
- Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. ve Goto, T., (2001), *Aspergillus Bombycis*, a new Aflatoxigenic Species and Genetic Variation in its Sibling Species, *A. nomius*., *Mycologia.*, 93:689-703.
- Pitt, J.I., (1993), Corrections to Species Names in Physiological Studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*., *J. Food Prot.*, 56: 265-269.
- Pitt, J.I., (2000), Toxigenic Fungi: Which are Important? *Med. Mycol.*, 38 (Suppl.1): 17-22.
- Putnam, D.H., Oplinger, E.S., Teynor, T.M., Oelke, E.A., Kelling, K.A. ve Doll, T.D., (1991), Peanut University of Wisconsin Extension-Cooperative Extension Center for Alternative Plant and Animal Plant and Animal Products, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108.
- Raper, K.B. ve Fennell, D.I., (1965), *Aspergillus*., The Williams and Wilkins Company., Baltimore.
- Richardson, M.D. ve Warnock, D.W., (1997), Aspergillosis., In: *Fungal Infection, Diagnosis and Management.*, 2nd ed., Blackwell Science., London., 113-130.
- Ross, R.K., Yuan, J.M., Yu, M.C., Wogan, G.N., Qian, G.S., Tu, J.T., Groopman, J., Gao, Y.T. ve Henderson, B.E., (1992), Urinary Aflatoxin Biomarkers and Risk of Hepatocellular Carcinoma., *Lancet.*, 339: 1413-1414.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. ve Filtenborg, O., (1995), *Introduction to Food-borne Fungi.*, 4th ed., Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Samson, R.A. ve Pitt, J.I., (1990), *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification.* Plenum Pres, New York.
- Shank, R.C., Bhamarapravati, N., Gordon, J.E. ve Wogan, G.N., (1972), Dietary Aflatoxins and Human Liver Cancer., IV., Incidence of Primary Liver Cancer in Two Municipal Populations in Thailand., *Food Cosmet., Toxicol.*, 10:171-179.

Smith, J.E. ve Moss, M.O., (1985), *Mycotoxins, Formation, Analyses and Significance.*, John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.

Squire, R.A., (1981), *Ranking Animal Carcinogens: a Proposed Regulatory Approach.*, Science., 214:877-880.

Takahashi, T., Chang, P.-K., Matsushima, K., Yu, J., Abe, K., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. ve Koyama, Y., (2002), *Nonfunctionality of Aspergillus sojae aflR in a Strain of Aspergillus parasiticus with a Disrupted aflR Gene.*, Appl. Environ. Microbiol., 68: 3737-3743.

Tosun, N., (1996), *İncir Meyvelerinde Aspergillus Flavus Grubu Fungusların Kimyasal Yöntemlerle Önlenmesi Yoluyla Aflatoksinlerin Azaltılma Olanakları Üzerinde Araştırmalar.* Ege Üniversitesi Fen Bil. Ens. Ziraat A.B.D. Yüksek Lisans Tezi.

Türk Gıda Kodeksi, *Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşınların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ.*

Unat, E.K. ve Yücel, A., *Tıp Mikolojisi.* Unat, E., Yücel, A. ve Atlas, K., (1995), *Unat'ın Tıp Paratolojisi'nde. İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Bulaşan Hastalıkları'nda.* Beşinci baskı, Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları: Samastı M (ed), İstanbul., 15: 831-39.

Vaamonde, G., Degrossi, C., Comerio, R. ve Fernández Pinto, V., (1995), *Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus en maní Cultivado en la Provincia de Córdoba (Argentina): Características Diferenciales y Capacidad Aflatoxicogénica.*, Bol. Soc. Arg. Bot., 30: 191-198.

Van Egmond, H.P., (1989), *Aflatoxin M₁: Occurrence, Toxicity, Regulation.*, In H.P. Van Egmond (ed.), *Mycotoxins in Dairy Products.*, Elsevier Applied Science, London.

Van Rensburg, S.J., Cook-Mazaffari, P., Van Schalkwyk, D.J., van der Watt, J.J., Vincent, T.J. ve Purchase, I.F., (1985), *Heptatocellular Carcinoma and Dietary Aflatoxin in Mozambique and Transkei.*, Br. J. Cancer., 51: 713-720.

Verschraegen, C.F., van Besien, K.W., Dignani, C., Hester, J.P., Andersson, B.S. ve Anaissie, E., (1997), *Invazive Aspergillus Sinusitis During Bone Marrow Transplantation.*, Scand J Infect Dis., 4: 436-438.

Vesonder, R., Haliburton, J., Stubblefield, R., Gilmore, W. ve Peterson, S., (1991), *Aspergillus Flavus and Aflatoxins B₁, B₂ and M₁ in Corn Associated with Equine Death.* Arch Environ Contam Toxicol., 1: 151-153.

Watson, A.J., Fuller, L.J., Jeens, D.J. ve Archer, D.B., (1999), *Homologues of Aflatoxin Biosynthesis Genes and Sequence of aflR in Aspergillus oryzae and Aspergillus sojae.*, Appl. Environ. Microbiol., 65: 307-310.

Wei, D.L. ve Jong, S.C., (1986), *Production of Aflatoxins by Strains of the Aspergillus Flavus Group Maintained in ATCC.*, Mycopathologia., 93: 19-24.

Willis, R.M., Mulvihill, J.J. ve Hoofnagle, J.H., (1980), *Attempted Suicide with Purified Aflatoxin.*, Lancet, i: 1198-1199.

Wilson, D.M. ve Payne G.A., (1994), *Factors Affecting Aspergillus Flavus Group Infection and Aflatoxin Contamination of Crops.*, In D.L. Eaton and J.D. Groopman (ed.), *The Toxicology of Aflatoxins, Human Health, Veterinary and Agricultural Significance.*, Academic Pres, San Diego, Calif., p.309-325.

Woodnoof, J.C., (1973), *Peanuts: Production, Processing, Product,* The AVI Pub.Co. Westport. Conn.USA.

İNTERNET KAYNAKLARI

[1] <http://schimmel-schimmelpilze.de>

[2] <http://coenviro.com>

[3] <http://sabah.com.tr>



ÖZGEÇMİŞ

| | | |
|----------------|-----------|---|
| Doğum tarihi: | 31.01.978 | |
| Doğum yeri: | İstanbul | |
| Lise: | 1994-1998 | Özel Sankt Georg Avusturya Lisesi ve Ticaret Okulu |
| Lisans: | 1999-2003 | Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü |
| Yüksek Lisans: | 2003-2005 | Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı |

Çalıştığı Kurum(lar)

| | |
|-----------|--|
| 2003-2004 | Çevre Endüstriyel Analiz Laboratuvarları |
| 2004- ... | Abdi İbrahim İlaç Sanayi |