KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PAKETLİ GLUTENSİZ ÜRÜNLERDE MİKOTOKSİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

ZEYNEP DEĞİRMEN

KOCAELİ 2020

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PAKETLİ GLUTENSİZ ÜRÜNLERDE MİKOTOKSİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

ZEYNEP DEĞİRMEN

Doç.Dr. Seda KARAYÜNLÜ BOZBAŞ		
Danışman,	**Kocaeli Üniversitesi**	**.....**
Doç.Dr. Ümit AY		
Jüri Üyesi,	**Kocaeli Üniversitesi**	**.....**
Doç.Dr. Esra ALTINTIĞ		
Jüri Üyesi,	**Sakarya Üniversitesi**	**.....**

Tezin Savunulduğu Tarih: 20.08.2020

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tahıl ve tahıl bazlı gıdalar tüm dünyada insanların beslenmesinde en temel gıda kaynağıdır. Tahıl ve ürünlerinde oluşan toksinler insan ve hayvan sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardan biridir. Çölyak hastalığı, glutene karşı ince bağırsakta görülen hassasiyet olması nedeniyle çölyak hastalarının gluten içeren tahılları tüketmemesi gerekmektedir. Çölyak hastalarının kullanmak zorunda olduğu glutensiz ürünler mikotoksin varlığı yönünden araştırılmıştır. Bu çalışmanın çölyak hastalarına yol göstereceğini düşünmekteyim.

Bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde deneyimlerini ve değerli bilgilerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Seda KARAYÜNLÜ BOZBAŞ'a,

Kocaeli Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü kurum müdürü Hasan AKYILDIZ ve çalışma arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan anneme, merhum babama ve tüm aileme teşekkürü borç bilirim.

Ağustos - 2020 Zeynep DEĞİRMEN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vii
ÖZET ix
ABSTRACT x
GİRİŞ 1
1. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 3
2. GENEL BİLGİLER 6
2.1. Mikotoksinler 6
2.1.1. Aflatoksin 8
2.1.2. Okratoksin 9
2.1.3. Deoksinivalenol 10
2.1.4. Zearalenon (ZON) 10
2.2. Mikotoksinlerin Oluşumunu Tetikleyen Etmenler 11
2.3. Gluten ve Çölyak 12
2.4. Validasyon 13
3. MALZEME VE YÖNTEM 17
3.1. Kullanılan Cihazlar 17
3.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromotografi (HPLC) 17
3.2. Kullanılan Kimyasallar 22
3.3. Kullanılan Gıda Örnekleri 23
3.4. Örnekleme ve Hazırlama 23
3.5. Deneysel İşlemler 24
3.5.1. Aflatoksin analizi 24
3.5.1.1. Aflatoksin analizi için kromatografik şartlar 27
3.5.2. Okratoksin analizi 27
3.5.2.1. Okratoksin analizi için kromatografik şartlar 28
3.5.3. Deoksinivalenol analizi 29
3.5.3.1. Deoksinivalenol analizi için kromatografik şartlar 30
3.5.4. Zearalenon analizi 30
3.5.4.1. Zearalenon analizi için kromatografik şartlar 31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 33
4.1. Homojenizasyon 33
4.2. Aflatoksin Analizi Metot Validasyonu 34
4.2.1. Aflatoksin LOD / LOQ tayini 35
4.2.2. Aflatoksin tekrarlanabilirlik 36
4.2.3. Aflatoksin tekrar üretilebilirlik 36
4.2.4. Aflatoksin geri kazanım (gerçeklik) sonuçları 36
4.2.5. Aflatoksin ölçüm belirsizliği 37
4.3. Okratoksin Analizi Metot Validasyonu 39
4.3.1. Okratoksin LOD / LOQ tayini 40
4.3.2. Okratoksin A tekrarlanabilirlik 41

4.3.3. Okratoksin A tekrar üretilebilirlik 41
4.3.4. Okratoksin A geri kazanım sonuçları 41
4.3.5. Okratoksin ölçüm belirsizliği 41
4.4. Deoksinivalenol Analizi Metot Validasyonu 43
4.4.1. Deoksinivalenol LOD / LOQ tayini 44
4.4.2. Deoksinivalenol tekrarlanabilirlik 44
4.4.3. Deoksinivalenol tekrar üretilebilirlik 45
4.4.4. Deoksinivalenol geri kazanım 45
4.4.5. Deoksinivalenol ölçüm belirsizliği 45
4.5. Zeralenon Analizi Metot Validasyonu 46
4.5.1. Zeralenon LOD/LOQ tayini 47
4.5.2. ZON tekrarlanabilirlik sonuçları 48
4.5.3. ZON tekrar üretilebilirlik sonuçları 48
4.5.4. ZON geri kazanım sonuçları 48
4.5.5. ZON ölçüm belirsizliği 49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 51
KAYNAKLAR 54
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 59
ÖZGEÇMİŞ 60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Aflatoksin molekül yapısı 9
Şekil 2.2. Okratoksin A'nın molekül yapısı 10
Şekil 2.3. Deoksinivalenol molekül yapısı 10
Şekil 2.4. Zearalenon molekül yapısı 11
Şekil 2.5. Türkiye'de tanı konan çölyak hastalarının bölgelere göre dağılımı 12
Şekil 2.6. Metot çalışma aralığı 14
Şekil 2.7. Cihaz çalışma aralığı 15
Şekil 3.1. HPLC cihazı (Agilent 1260, Agilent 1100) 18
Şekil 3.2. Tek numune için ölü zaman ve alıkonma zamanı 19
Şekil 3.3. Kobra-cell türevlendirme cihazı 20
Şekil 3.4 Kobra-cell iç yapısı (R-Biopharm) 21
Şekil 3.5. Aflatoksin-bromür reaksiyon mekanizması (R Biopharm) 21
Şekil 3.6. Numune öğütme ve homojenizasyonda kullanılan blendırlar 23
Şekil 3.7. Numune öğütme ve homojenizasyonda kullanılan öğütücü 24
Şekil 3.8. Aflatoksin analizi metot aşamaları 25
Şekil 3.9. Ekstrakte edilen numunelerin Whatman No:4 filtre kağıdından süzülmesi 26
Şekil 3.10. IAK Kolondan numunelerin geçirilişi ekle 26
Şekil 3.11. Seyreltilmiş numunenin cam tüpe alınışı 26
Şekil 3.12. Aflatoksin B1, B2, G1, G2 kromatogramı 27
Şekil 3.13. Okratoksin analizi metot aşamaları 28
Şekil 3.14. Okratoksin kromatogramı 29
Şekil 3.15. Deoksinivalenol analizi metot aşamaları 29
Şekil 3.16. DON kromatogramı 30
Şekil 3.17. Zeralenon analizi metot aşamaları 31
Şekil 3.18. ZON kromatogramı 32
Şekil 4.1. Homojenizasyon grafiği 33
Şekil 4.2. Aflatoksin B1, B2, G1, G2 kalibrasyon grafiği 34
Şekil 4.3. Okratoksin kalibrasyon grafiği 39
Şekil 4.4. Deoksinivalenol kalibrasyon grafiği 43
Şekil 4.5. Zeralenon kalibrasyon grafiği 47

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Başlıca mikotoksinler,bu mikotoksinleri üreten mantarlar, en sık kontamine olan ürünler ve sağlık üzerine önemli etkileri 8
Tablo 3.1. Aflatoksin ana standart konsantrasyon değerleri 24
Tablo 4.1. Aflatoksin analizinde kullanılan konsantrasyonlar 35
Tablo 4.2. Aflatoksin için performans kriterleri 35
Tablo 4.3. Aflatoksin LOQ değerleri..... 36
Tablo 4.4. Aflatoksin analizi için geri kazanım çalışmalarından gelen belirsizlik..... 37
Tablo 4.5. Aflatoksin tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik hesabı 37
Tablo 4.6. Aflatoksin analizi için tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik hesabı..... 37
Tablo 4.7. Toplam aflatoksin analizi mısır numunesi belirsizlik bileşenleri tablosu..... 38
Tablo 4.8. Aflatoksin B1analizi mısır numunesi belirsizlik bileşenleri tablosu 38
Tablo 4.9. Toplam aflatoksin analizi pirinç numunesi belirsizlik bileşenleri tablosu..... 38
Tablo 4.10. Aflatoksin B1 analizi pirinç numunesi belirsizlik bileşenleri tablosu 38
Tablo 4.11. Okratoksin A için performans kriterleri 40
Tablo 4.12. Tahıl ve tahıldan yapılmış tüm gıda ürünlerinde Okratoksin A için LOD/LOQ seviyeleri..... 40
Tablo 4.13. Tahıl ve tahıldan yapılmış tüm gıda ürünlerinde Okratoksin A analizi için geri kazanım çalışmalarından gelen belirsizlik 41
Tablo 4.14. Tahıl ve tahıldan yapılmış tüm gıda ürünlerinde Okratoksin A analizi için tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik..... 42
Tablo 4.15. Tahıl ve tahıldan yapılmış tüm gıda ürünlerinde Okratoksin A analizi için tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik 42
Tablo 4.16. Mısır Okratoksin A analizi için belirsizlik bileşenleri tablosu..... 42
Tablo 4.17. Buğday Okratoksin A analizi için belirsizlik bileşenleri tablosu 42
Tablo 4.18. Deoksinivalenol için performans kriterleri 44
Tablo 4.19. Deoksinivalenol LOD/LOQ donuçları 44
Tablo 4.20. DON analizi için geri kazanım çalışmalarından gelen belirsizlik..... 45
Tablo 4.21. DON analizi için tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik 45
Tablo 4.22. DON analizi için tekrarüretilebilirlikten gelen belirsizlik..... 46
Tablo 4.23. Buğday DON analizi için belirsizlik bileşenleri tablosu 46
Tablo 4.24. Mısır DON analizi için belirsizlik bileşenleri tablosu..... 46
Tablo 4.25. Zeralenon için performans kriterleri 47
Tablo 4.26. Zeralenon LOQ değeri 48
Tablo 4.27. Zearalenon analizi için geri kazanım çalışmalarından gelen belirsizlik..... 49
Tablo 4.28. ZON analizi için tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik..... 49
Tablo 4.29. ZON analizi için tekrarüretilebilirlikten gelen belirsizlik 49

Tablo 4.30. ZON pirinç için belirsizlik bileşenleri tablosu 49
Tablo 4.31. ZON mısır için belirsizlik bileşenleri tablosu 50
Tablo 5.1. Mikotoksinler LOD/LOQ, geri kazanım, ölçüm belirsizliği değerleri..... 51
Tablo 5.2. Glutensiz ürünlerde Afla, OTA, ZON, DON analiz sonuçları..... 52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aw : Su aktivitesi
dk : Dakika
g : Gram
kg : Kilogram
M : Molar
mg : Miligram
mL : Mililitre
nm : Nanometre
ppb : Milyarda bir kısım
ppm : Milyonda bir kısım
λem : Emisyon dalgaboyu
λex : Uyarma dalgaboyu
µA : Mikroamper
µg : Mikrogram
µL : Mikrolitre
^{0}C : Santigrat derece

Kısaltmalar

AFB1 : Aflatoksin B1
AFB2 : Aflatoksin B2
AFG1 : Aflatoksin G1
AFG2 : Aflatoksin G2
AOAC : The Association of Official Analytical Chemists (Resmi Analitik Kimyagerler Derneği)
CH_3OH : Metanol
CH_3COOH : Asetik Asit
C_2H_3N : Asetonitril
DAD : Diod-Array Dedektör
DON : Deoksinivalenol
FB : Fumonisin
FLD : Floresans Dedektör
HCOOH : Formik Asit
HNO_3 : Nitrik Asit
H_2O : Su
HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Likit Kromatografi)
IAK : İmmünoafinite Kolon
KBr : Potasyum Bromür
KCl : Potasyum Klorür
KH_2PO_4 : Potasyum Dihidrojen Fosfat
LOD : Tespit Limiti
LOQ : Ölçüm Limiti

NaCl	: Sodyum Klorür
Na_2HPO_4	: Sodyum Bifosfat
OTA	: Okratoksin-A
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
RSD	: Rölatif Standart Sapma
SD	: Standart Sapma
TDI	: Tolere Edilebilir Günlük Alım Miktarı
TEDB	: Tespit Edilebilir Düzeyde Bulunmadı
TS	: Türk Standartları
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
ZON	: Zeralenon

PAKETLİ GLUTENSİZ ÜRÜNLERDE MİKOTOKSİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Günümüzde insan ve hayvan sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardan biri toksinlerdir. Bazı küfler tarafından üretilen toksik maddelere 'mikotoksin' denir. Bu küflerin başlıcaları Aspergillus, Penicillium ve Fusariumdur. Tahıllar ve tahıl bazlı gıdalar tüm dünyada temel gıdalardır.

Bu çalışmanın amacı, çölyak hastalarının kullandığı paketli glutensiz ürünlerde bulunan aflatoksin, okratoksin, zeralenon, deoksinivalenol toksin varlığını incelemek ve bu analizlerin verifikasyon çalışmalarını yapmaktır. Analizler Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı ile yapılmış floresan (FLD) ve diyot dizinli dedektör (DAD) kullanılmıştır. Aflatoksin analizi; AOAC 991.31, okratoksin A analizi; AOAC 2000.03, deoksinivalenol analizi; R-Biopharm Deoksinivalenol tahıllarda ekstraksiyon metodu; Ref No: P50.V13 ve zeralenon analizi; Journal of AOAC Vol. 84 No.5, 2001 metotları kullanılarak yapılmıştır.

Piyasadan rastgele yöntemle, 21 parça paketli halde satılan glutensiz ürün; 2 paket makarna, 1 paket erişte, 1 paket mısır gevreği, 1 paket tarhana, 1 kutu pirinç unu, 1 kutu mısır unu, 6 paket bisküvi / kraker çeşitleri, 1 ekmek, 1 kutu kek karışımı, 1 kutu karabuğday unu, 1 kutu beyaz dut kurusu unu, 1 kutu keçiboynuzu unu, 1 kutu nohut unu, 1 kutu kestane unu, 1 kutu hindistan cevizi unu, alınmış, her numunede dörder analiz yapılmıştır. Ayrıca kör örneklere spike yapılarak verifikasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

Okratoksin A analizi yapılan ürünlerden beyaz dut kurusu ununda değer tespit edilmiş ancak bu değerin Türk Gıda Kodeksi'ne göre uygun olduğu saptanmıştır. Mısır içeren makarna örneğinde deoksinivalenol tespit edilmiş, Türk Gıda Kodeksi'ne uygun olmadığı belirlenmiş, diğer ürünlerde araştırılan toksinler tespit edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Çölyak, Gluten, HPLC, Mikotoksin.

INVESTIGATION OF MYCOTOXIN PRESENCE IN SOME PACKED GLUTEN FREE PRODUCTS

ABSTRACT

Toxins are one of the most important problems threatening human and animal health. The toxic substances produced by some molds are called 'mycotoxins'. These molds are mainly Aspergillus, Penicillium and Fusarium. Cereal products are one of the most important food sources. Celiac patients should not consume gluten-containing grains.

The aim of this study was to investigate the presence of aflatoxin, ochratoxin, zeralenone, deoxynivalenol in gluten-free products and verification of these analyzes. Fluorescence (FLD) and diode array detector (DAD) were used in High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Aflatoxin analysis made with; the AOAC 991.31, ochratoxin A analysis; AOAC 2000.03, deoxynivalenol (DON) analysis; R-Biopharm Deoxynivalenol in cereal using water extraction; Ref No: P50.V13, zearalenone (ZON) analysis; Journal Of AOAC International Vol. 84 No.5, 2001.

21 pc of gluten-free products sold in packaged form; 2 packages pasta, 1 package noodle, 1 package corn flakes, 1 package tarhana, 1 can of rice flour, 1 can of corn flour, 6 packages biscuit / cracker, 1 bread, 1 can of cake mix, 1 can of buckwheat flour, 1 can of white mulberry dried flour, 1 can of carob flour, 1 can of chickpea flour, 1 can of chestnut flour, 1 can of coconut flour, randomly purchased from the market. In addition, verification studies were completed by spiking blanck samples.

Ochratoxin-A analysis revealed toxin in white mulberry flour, but these values were found to be appropriate according to the Turkish Food Codex. Deoxinivalenol was detected in a pasta sample containing corn was not in compliance with Turkish Food Codex. Aflatoxin and zeralenone were not detectable.

Keywords: Celiac, Gluten, HPLC, Mycotoxin.

GİRİŞ

Mikotoksinler bazı küfler tarafından üretilen, toksik metabolizma ürünleridir. Küflenen her tahılda toksin gelişimi olmaz. Bir genelleme yapacak olursak zedelenmiş tahıl tanelerinde toksinlerin oluşum riski sağlam tanelerden fazladır (Charles ve Hurburgy, 1995).

Ürünlerde tohum kalitesi çok önemlidir. Toksinler; tohum ekildiği andan itibaren tarlada büyümesi sırasında, hasat edilip nakliyesi, depolama şartlarının uygun olmadığı durumlarda özetle tarladan tüketilene kadar her aşamada gelişebilir (Vidyasagar, Sujatha, Sashidhar, 1997).

Günümüzde 350 fungus türünün 400'den fazla mikotoksin ürettiği bilinmektedir. Mikotoksin üreten en önemli funguslar Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Alternaria türleridir (Kielstein, 1993). İnsan ve hayvan sağlığına etki eden en önemli toksinler ise aflatoksin, okratoksin A, trikotesenler, zeralenon ve fumonisindir.

Mikotoksinlerin insan ve hayvanlarda sebep oldukları toksik sendromlara "mikotokzikozis" adı verilmektedir (Özkaya ve diğ., 1999). Mikotoksinler vücudun organ ve dokularında bozukluklar meydana getirirken en çok karaciğeri etkilerler; bunun yanında, böbrekleri, sinir ve kasları, sindirim sistemini, deriyi, solunum sistemini ve üreme sistemini etkilerlerken bazılarının teratojenik ve karsinojenik etkileri de vardır (Kaya ve Yarsan, 1995). Mikotoksinlerin insan ve hayvanlarda sebep olduğu etki alınan doza, toksine maruz kalma süresine, yaşa ve fizikokimyasal duruma göre değişiklik göstermektedir (Galvano ve diğ., 2001).

Hububat ve ürünleri, insan beslenmesindeki en temel ürünlerdir. Hububatlar aynı zamanda hayvan yemi, tohumluk gibi alanlarda da kullanıldığı için ülkemiz ekonomisinde önemli yer tutmaktadır. Ancak hububatta gelişen küfler tohumun kalitesinin bozulmasına neden olarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Daha da önemlisi insan ve hayvan sağlığı için büyük tehdit oluşturmaktadır. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre dünyada tarım ürünlerinin %25'inde çeşitli mikotoksinlerin varlığı söz konusudur (Kabak ve diğ., 2006). ABD ve Kanada'da

yalnızca yemlerde ve çiftlik hayvanlarında mikotoksinlerin neden olduğu yıllık kaybın 5 milyar $ düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir (Smith, 2001).

Buğday, arpa, çavdar ve yulaf katkılı her türlü ürün (un, bulgur, bulgur pilavı, irmik, makarna, şehriye, kuskus, ekmek, kek, pasta, kurabiye, bisküvi, börek, çörek, gofret, simit, kraker, dondurma külahı, unlu tatlılar, gluten içeren hazır salça, ketçap, un ilave edilen çorbalar, soslar, tarhana, yarma gibi) gluten içerir. Gluten içermeyen en çok kullanılan ürünler mısır ve pirinçtir. Bununla birlikte nohut, darı, kara buğday, kinoa gibi doğal yapısında gluten içermeyen ürünler de kullanılmaktadır (hsgm.saglik.gov.tr). Çölyak hastalığının kabul gören tek tedavisi glutensiz beslenmedir. Bu nedenle çölyak hastaları için özel üretilen gıdalarda çoğunlukla mısır ve pirinç kullanılmaktadır.

Mısırda birden fazla mikotoksinin bir arada ortaya çıkması nedeniyle en riskli üründür ki mısır aynı zamanda diğer tahıl ürünlerinden farklı olarak fumonisin de içerebilir. Bu durum özellikle çölyak hastaları için endişe verici olabilir. Mısır ürünlerinin yüksek tüketicileri olarak çölyak hastaları için olası bir sağlık sorunu olabilmektedir (Brera ve diğ., 2014). Buna rağmen bu konuda çok az sayıda çalışma yapılmıştır.

Çölyak hastalığı, genetik olarak hassas bireylerde gluten alınmasıyla tetiklenen bir hastalıktır. Çölyak hastalığı olan insanlar; buğday, arpa, çavdar ve bir dereceye kadar da yulafta da bulunan bir protein olan 'Gluten' e karşı hassasiyet gösterirler (Arendt, Moroni, Zannini, 2011). Çölyak hastalığının sıklığı farklı çalışmalarda % 0,8-1 arasında bildirilmektedir (Dalgıç ve diğ., 2011).

Çölyak hastalığı görülme sıklığı bölgesel değişmekte olup Türkiye'de 250 bin ile 750 bin arasında çölyak hastası tahmin edilmektedir. Ancak bu hastaların çok azına tanı konmuştur (hsgm.saglik.gov.tr).

Bu nedenle bu tezde; dünya nüfusunun yaklaşık % 1'ini, oluşturan çölyak hastalarının tüketmek zorunda olduğu ülkemizde üretilen glutensiz ürünler mikotoksin varlığı yönünden incelenmiş, çölyak hastalarının sağlığını tehdit edip etmediği araştırılmıştır.

1. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Glutensiz ürünlerin en büyük sorunlardan birkaçı çabuk bayatlaması, protein, mineral eksikliği ve lezzet yönünden yetersizliğidir. Daha kolay bayatladığı için küf oluşumu daha hızlı olmaktadır. Bununla ilgili ve diğer glutensiz gıdalardaki toksinlerin incelenmesiyle ilgili literatür araştırmaları yapılmıştır.

Yılmaz ve Doğan (2015), gluten içermeyen farklı un, nişasta karışımlarına emülgatör, kıvam arttırıcı ilave ederek 8 farklı karışım oluşturarak glutensiz ve glutenli ekmeği karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda buğday unu ile yapılan ekmeğin raf ömrünün gluten içermeyen ekmeklere göre daha fazla olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Glutensiz karışımlarda ekmek kalitesini arttırmak için pirinç ununun karışımda mutlaka olması gerektiğini ve bu karışımların protein içeriklerini zenginleştirilerek besleyici değerinin arttırılması gerektiğini bildirmişlerdir (Yılmaz ve Doğan, 2015).

Glutensiz ürün diyeti, daha fazla mısır, pirinç ve diğer glutensiz tahıl tüketimi ile ilişkilendirilir. Son on yılda, bazı durumlarda ağır mikotoksin kontaminasyonu gösteren bazı raporlar mısır bazlı ürünlere odaklanmıştır. Daha yakın zamanlarda, glutensiz ürün diyeti ürünlerinin mikotoksin kontaminasyonu ile ilgili özel araştırmalar çelişkili sonuçlarla yayınlanmıştır (Caldas ve Silva, 2007).

Mısır bazlı glutensiz ürünler çölyaklı hastalar için büyük bir temel maddedir. Bu ürünler yüksek oranda toksin içerir. Bu; yıllar süren gluten kaynaklı hasardan sonra sağlıklarını iyileştirmeye çalışanlar için bir sorun teşkil etmektedir. Ek olarak, birçok mısır ürününün diğer ürünler ile çapraz kontamine olduğu gösterilmiştir (Osborne, 2012).

İtalyan pazarından toplanan glutensiz ürünlerde farklı mikotoksinlerin varlığına ilişkin yapılan benzer bir araştırma, makarna hariç dikkate alınan tüm ürün kategorilerinde FB ve ZON bulunduğunu göstermiştir. Özellikle, analiz edilen numunelerin % 29'unda FB'ler, %11'inde ZON bulunurken, birkaç örnekte düşük DON seviyeleri tespit edilmiştir (Brera ve diğ., 2014).

Belçika pazarında yapılan benzer bir anket, Fusarium fungusunun neden olduğu mikotoksinlerin tahıl bazlı ürünlerde, özellikle tam öğün bazlı veya lif bakımından zenginleştirilmiş ürünlerde yaygın olarak ortaya çıktığını doğrulamıştır (De Boevre ve diğ., 2013).

Valencia'da süpermarketlerden toplanan mısır bazlı kahvaltı gevreklerinde DON'un varlığı izlendi. Mısır bazlı yiyeceklerde, özellikle kızarmış ve pişmiş mısır aperatiflerinde de DON için pozitif değerler elde edilmiştir (Castillo ve diğ., 2008).

Fumonisinlerin varlığı, sertifikalı farklı mısır bazlı glutensiz ürünleri üzerinde yapılan başarılı bir çalışma sırasında gözlendi; 8/118 üründe Avrupa Komisyonu tarafından belirlenen yasal sınırı aşan FB değerleri gösterilmiştir (Dall'Asta ve diğ., 2012).

2009'da İtalya'da piyasalardan satın alınan farklı glutensiz ürünlerinde FB'lerin oluşumu araştırıldı: Bulgular, bu özel gıdalarda fumonisinlerin yaygın bir şekilde ortaya çıktığını gösterdi. Özellikle, ele alınan bazı örnekler, özellikle mısır unları ve kahvaltılık ürünlerde limiti aşmıştır (Dall'Asta ve diğ., 2009).

Mikotoksin maruziyetinin idrar biyobelirteçleri, bir grup çölyak hastasında (n = 55) ve kontrol grubundaki sağlıklı bireylerde (n = 50) alışılmış diyetlerini takiben değerlendirilmiştir. İki gruptan toplanan 105 idrar örneğinde deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZON) ve fumonisin B1 (FB1) izlenmiştir. Toplam 19 pozitif vakası çıkarken, çalışılan tüm denekler arasında en çok saptanan mikotoksin ZON idi. Sonuçlar, iki grup arasında mikotoksin maruziyetinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi ve spesifik mikotoksinlerin varlığı, herhangi bir belirli gıda kategorisinin alımı ile ilgili değildi. Glutensiz ürünler için spesifik düzenlemenin acil olmadığını göstermektedir (Cirlini ve diğ., 2017).

Çölyak hastaları diyetinin genel popülasyona göre daha fazla mısır alması nedeniyle fumonisinlere maruz kalma ihtimali daha yüksektir. FB1 dışında DON ve ZON'e odaklanılmış ve DON'un gastrointestinal mukozayı bozduğu kanıtlanmıştır (Mazzeo ve diğ., 2016), ZON'un ise araştırmaya değer bir endokrin bozucu olduğundan şüphelenilmektedir (Mally, Solfrizzo ve Degen, 2016).

Brera ve diğ. glutensiz ürünlerde makarna hariç zearalenone kontaminasyonu tespit etmiştir. Çölyak hastalarının fumonisinlere (FB) ve zearalenona (ZON) maruz kaldıkları değerlendirilmiştir. Çocuklar için bildirilen maruz kalma değerleri FB'ler ve ZON için toksikolojik eşiklere göre daha düşüktü. Sonuç olarak, çölyak hastalarının FB'lere ve ZON'a maruz kalma değerleri TDI (tolere edilebilir günlük alım miktarı) değerinin altında olduğu bu çalışmada belirtilmiştir (Brera ve diğ., 2014).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Yunanca'da 'mykes' mantar anlamına gelmektedir, Latince'de ise 'toxicum' zehir/toksin anlamına gelmektedir. Mikotoksin terimi 'mykes' ve 'toxicum' kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur (Scussel, 1998).

1960 yılı mikotoksinlerin kavranmasında dönüm noktasıdır. O tarihe kadar tarımsal ürünlerin küflenmesi sadece ekonomik yönden problem yaratırken 1960 sonrası canlılarda meydana getirdiği hastalıklar nedeniyle ilgi odağı olmuştur. 1960 yılında İngiltere'de çok sayıda kümes hayvanının ölümü ile sonuçlanan hastalık 'Turkey X' olarak adlandırılmış ve bunun nedeninin hayvan yemlerinde kullanılan Brezilya yer fıstığındaki toksin olduğu bulunmuştur. Bu tarihten sonra toksinler araştırılmaya başlanmış ve çok sayıda çalışma yapılmıştır. Aflatoksin ilk defa Aspergillus flavus'ta saptandığından bu mantarların adının ilk harfleri kullanılmış ve bu mikotoksine aflatoksin adı verilmiştir (Goldblatt, 1965; Miller 1987).

Türkiye'de aflatoksin sorununun ortaya çıkması ilk kez 1967'de Kanada'ya ihraç edilen 10 ton fındığın toksinli olduğu gerekçesiyle iade edilmesiyle olmuştur. Daha sonra 1971'de ABD'ye ihraç edilen antep fıstığında, 1973 yılında Danimarka'ya ihraç edilen incirlerde aflatoksin tespit edilmiştir (Gönül ve Boyacioğlu 1985).

Mikotoksinler; Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Alternaria ve Claviceps gibi mantar (küf) cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir. İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde güçlü ve çeşitli toksik etkiler oluşturmaktadırlar. Dünyadaki mahsüllerin dörtte birinin mikotoksin ile kontaminasyon riskinin olduğu bildirilmiştir (Steyn ve Stander, 1999; Aljicevic ve diğ., 2008).

Temizlik, böcek kontrolü, mantar önleyici ajanların kullanımı ve tohum kabuğunun bütünlüğü, mikotoksin seviyelerini en aza indirgemek veya azaltmak için önemlidir (Tarım Bilimi ve Teknolojisi Konseyi, 2003). Tarımsal ürünlerde mikotoksinler, hasat

öncesi tarladan başlayarak uygun olmayan depo koşullarında ve uzun süreli depolamalarda toksin üreten fungusların gelişmesiyle ortaya çıkmaktadırlar (Tiryaki ve diğ., 2011).

Mikotoksin üretebilen küfler; tahıllar, kurutulmuş meyveler, kuruyemişler ve baharatlar gibi sayısız gıda maddesi üzerinde büyür. Yüzlerce farklı mikotoksin tanımlanmıştır, ancak en çok gözlenen mikotoksinler, aflatoksinler, okratoksin A, fumonisinler, zearalenon ve deoksinivalenol olup insan sağlığı ve hayvan sağlığını tehdit etmektedir (WHO, 2018).

Mikotoksinler bazı fungus türleri tarafından üretilen, insan ve hayvanlarda akut veya kronik mikotoksikozizlere neden olurlar. Mikotoksinlerin neden olduğu hastalıklara 'mikotoksikoz' denir (Cardona, 2000).

Canlılarda alınan mikotoksin dozuna bağlı olarak iki farklı etki görülebilir. Yüksek dozda alındıklarında kısa sürede ölüm görülebilir. Daha az dozların uzun süre alınmaları sonucunda kronik hastalıklar görülür. Akut toksik etkiye bireyin duyarlılığı, genetik ve fizyolojik özellikleri ve çevresel faktörler etkendir (Tunail, 2000).

Akut mikotoksikozların semptomları arasında karaciğer ve böbrek hasarı, merkezi sinir sistemine saldırılar, cilt bozuklukları, hormonal etkiler, düşük, kanama, kusma, ishal ve diğerleri bulunur. Günlük beslenmede eser miktarda alınan toksinler vücuttan atılırken aflatoksin gibi bazı toksinler vücutta birikerek kansere neden olmaktadır (Carjaval-Moreno, 2015).

Teknolojik işlemlere karşı yüksek stabiliteye bağlı olarak, mantar kirliliği, üretim zinciri boyunca tarladan ham ürünlere ve daha sonra nihai ürünlere aktarılabilir. Mikotoksinler arasında Fusarium, deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZON) ve fumonisinler (FB'ler) gibi ılıman bölgelerde tahılların kirlenmesi ile ilgilidir. Bu bileşikler çok çeşitli toksik aktivitelerden ve endokrin sisteminin bozulmasından sorumludur (De Ruyck ve diğ., 2015).

Mikotoksinler; genellikle yüksek sıcaklıklara dirençlidirler, mikotoksin çeşitlerine, sıcaklık derecelerine ve uygulama sürelerine göre farklı stabilite gösterirler (Tunail 2002). Çoğunlukla renksiz, kokusuz ve tatsızdırlar. Gıdaların teknolojik olarak

işlenmesi sırasında, nihai gıda ürünlerinde kalırlar. Özellikle aflatoksinler, ısıya son derece dayanıklı maddeler olup, ancak 300°C'nin üzerindeki ısılarda tümüyle parçalanabilirler. Bu nedenle gıdaların pişirme ısılarında bozunmazlar. Aflatoksinler özellikle bu yönleriyle insan sağlığı açısından büyük risk oluştururlar (Tuncer, 1987).

Küflerin verdiği ekonomik zararlar, tarım ürünlerindeki kayıplar dikkate alındığında gerçekten azımsanamayacak düzeydedir. Yıllık üretimler baz alındığında; yağlı tohumlarda %12, pirinçte %5, yer fıstıklarında %4.2, mısırda %3, soya fasulyesinde %3 ürün kaybı meydana gelmektedir (Karaca, 2005).

Başlıca mikotoksinler, bu mikotoksinleri üreten mantarlar, en sık kontamine olan ürünler ve sağlık üzerine önemli etkileri Tablo 2.1'de bulunmaktadır.

Tablo 2.1. Başlıca mikotoksinler,bu mikotoksinleri üreten mantarlar, en sık kontamine olan ürünler ve sağlık üzerine önemli etkileri (Köppen ve diğ., 2010)

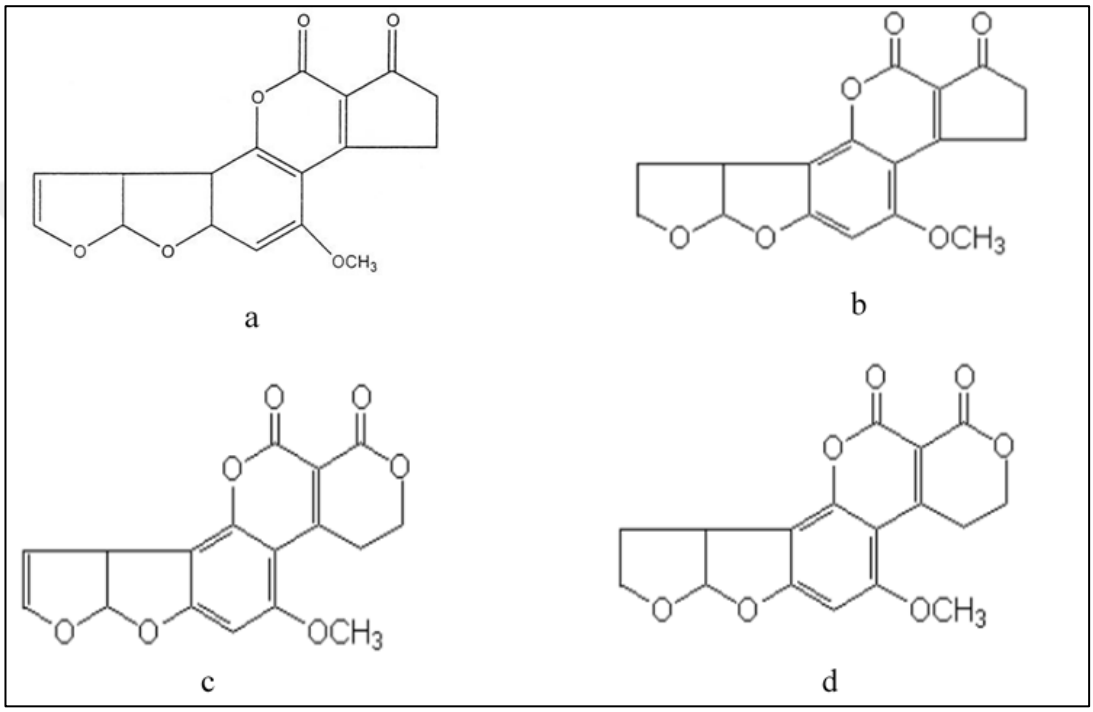
Mikotoksin	Mantar Türleri	Bulunduğu Gıda Ürünleri	Sağlık Problemleri
Aflatoksin	Aspergillus	Yağlı tohumlar (fındık, fıstık vb), tahıllar, kurutulmuş meyveler, mısır, pirinç, süt, baharatlar, bebek mamaları, yem	Kanserojen, mutajenik, teratojenik,hepatotoksik, nephrotoxic,bağışıklık, bağırsak yolunda kanamave böbrekler, karaciğer hastalığı
Trikotesenler (DON)	Fusarium	Tahıllar, tahıl bazlı ürünler, mısır, buğday,tahıl ürünleri	İmmüno depresyonlar, mutajenik, gastrointestinal kanama, nörotoksik
Zearalenon (ZON)	Fusarium	Arpa, yulaf, buğday pirinç, susam, soya fasulyesi,tahı, tahıl bazlı ürünler	Östrojenik aktivite (vajina sarkması, rahim genişlemesi),
Ochratoksin (OTA)	Penicillium and Aspergillus	Tahıllar, kurutulmuş asma meyvesi, şarap, kahve, yulaf, baharat, çavdar, kuru üzüm, üzüm suyu, baharatlar	Kanserojen, mutajenik, nefrotoksik, hepatotoksik, teratojenik, immüno baskılayıcılar, kanserojen (idrar yolu tümörleri), inhibisyon protein sentezi

2.1.1. Aflatoksin

Mikotoksinler içinde en önemlisi ve en çok araştırılanı aflatoksindir (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2). Aflatoksin molekül yapıları Özkaya ve Temiz 2003 tarihli aflatoksinler ve kimyasal yapıları adlı yayınındaki gibi Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Aspergillus flavus ve Aspergillus parasiticus türlerine ait küf mantarları tarafından oluşur (Ağaoğlu, 1999). Ultraviyole ışık altında verdikleri renge göre isimlendirilmişler ve

mavi floresans verenler AFB1 ve AFB2, yeşil floresans verenler ise AFG1 ve AFG2 olarak isimlendirilmiştir.

Toksik etkileri birbirinden farklı olup AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 şeklindedir (Soyöz ve Özçelik, 2002). Aflatoksin en çok mısır, buğday, pirinç, soya fasulyesi, baharat, fındık, fıstık, yer fıstığı, süt, yağlı tohumlar, kurutulmuş meyve, peynirlerde görülür.

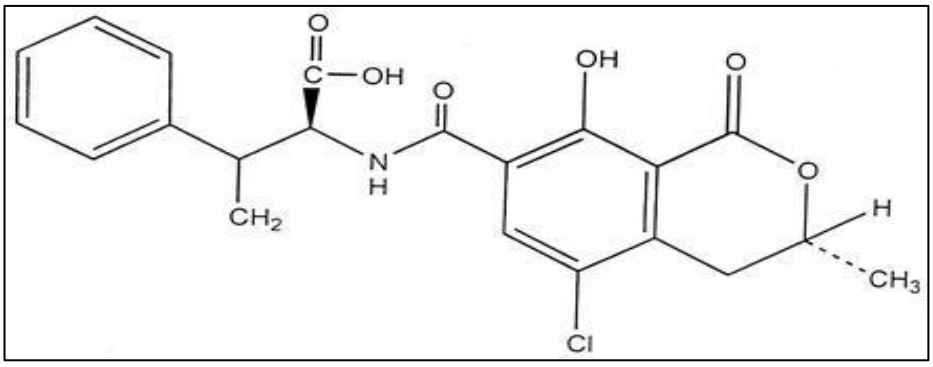


Şekil 2.1. Aflatoksin molekül yapısı a. Afla B1 b. AflaB2 c. Afla G1 d. Afla G2 molekül yapısı (Özkaya ve Temiz, 2003)

2.1.2. Okratoksin

Okratoksinlerin A ve B olmak üzere iki türü vardır ancak en yaygın formu okratoksin A (OTA)'dır. Molekül yapısı Bennett ve Klich 2003 tarihli Mycotoxins adlı yayınında Şekil 2.2.'deki gibi gösterilmiştir. OTA Aspergillus ve Penicillium grubu küfleri tarafından üretilir. OTA daha çok tahıllar, tahıl ürünleri, şarap, kahve, baharatlarda görülür.

OTA özellikle ürünlerin depolanması sırasında oluşmaktadır (Soyöz ve Özçelik, 2002; Khoury ve Atoui, 2010). Bu bileşikler kümes hayvanlarındaki nefrotoksik etkileri (böbrek hasarı) ile bilinmektedir (Manning ve Wyatt, 1984).

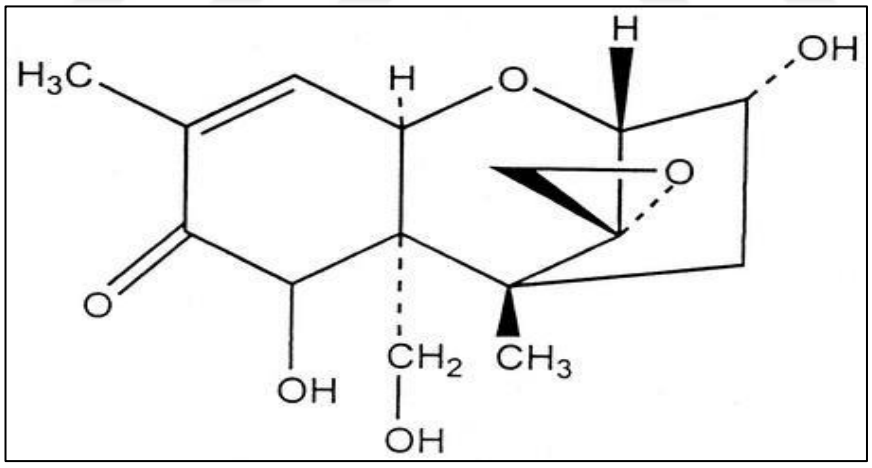


Şekil 2.2. Okratoksin A'nın molekül yapısı (Bennett ve Klich, 2003)

2.1.3. Deoksinivalenol

Deoksinivalenol trikotesenler grubuna dahil bir toksindir ki bunların en önemlisi deoksinivalenol (DON)'dur ve molekül yapısı Şekil 2.3'te gösterilmiştir (Bennett ve Klich, 2003).

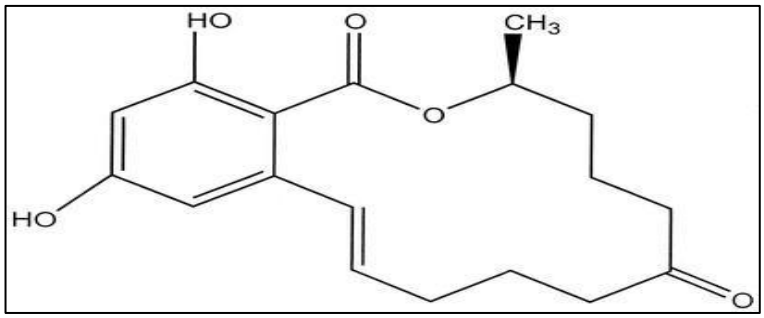
Özellikle Fusarium, grubuna dahil küfler tarafından sentezlenirler. DON yulaf, arpa, çavdar, buğday, mısır, pirinç ayrıca un, ekmek ve kahvaltılık tahıllar gibi buğday ve mısırdan üretilen gıdalarda bulunur (Josephs ve diğ., 1998).



Şekil 2.3. Deoksinivalenol molekül yapısı (Bennett ve Klich, 2003)

2.1.4. Zearalenon (ZON)

Zearalenon (ZON) molekül yapısı Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Bennett ve Klich, 2003). Fusarium küfleri tarafından sentezlenir. Başta mısır olmak üzere tüm tahıllarda bulunur. Zearalenon özellikle yağışlı ve serin mevsimlerde sentezlenir (Zinedine ve Manes, 2009).



Şekil 2.4. Zearalenon molekül yapısı (Bennett ve Klich, 2003)

2.2. Mikotoksinlerin Oluşumunu Tetikleyen Etmenler

Hem hasat öncesi hem de hasat sonrası büyüme ve mikotoksin üretimini etkileyen iki ana faktör sıcaklık ve nemdir. Bunun yanında pek çok cins mantar büyüme, gelişme ve mikotoksin üretimi için belli koşullara ihtiyaç duyar. Bu koşullar özetle; nem, sıcaklık, substrat tipi ve besinsel faktörler, atmosfer oksijen ve karbon dioksit düzeyleri, diğer mantar türlerinin varlığı, coğrafi konum, genetik şartlar olarak sıralanabilir (Concon, 1988; Ominsk ve diğ., 1994).

Tüm küfler toksin üretmediği gibi toksijenik küf türlerinin bütün suşları da toksin üretmeyebilir. Gelişen mantarın toksin üretmesi önemlidir (Evren, 1999).

Ortamın rutubeti ve su aktivitesi mantarların daha etkili olmasına neden olmaktadır. Gıdaların su aktivitesinin bağıl nemden düşük olması durumunda gıda nem çeker. Sıcaklık da toksin oluşumunu etkileyen bir değer önemli etmendir. Tüm bu nedenlerle depolama sırasında ortamın nemi ve sıcaklığı kontrol altında tutularak toksin oluşumu kontrol altına alınabilir (Ayhan, 2000).

Mantarların gelişiminde etkili olan bir diğer etmen pH değeridir. pH = 3.5-8.0 aralığında küflerin geliştiği bilinmektedir (Ayhan, 2000). Mantarların gelişimi için oksijen varlığı gerekmektedir, nitekim CO_2 miktarı %10’ un üzerine çıktığında mantarlar inhibe olur (Şahin ve Şehu 2015).

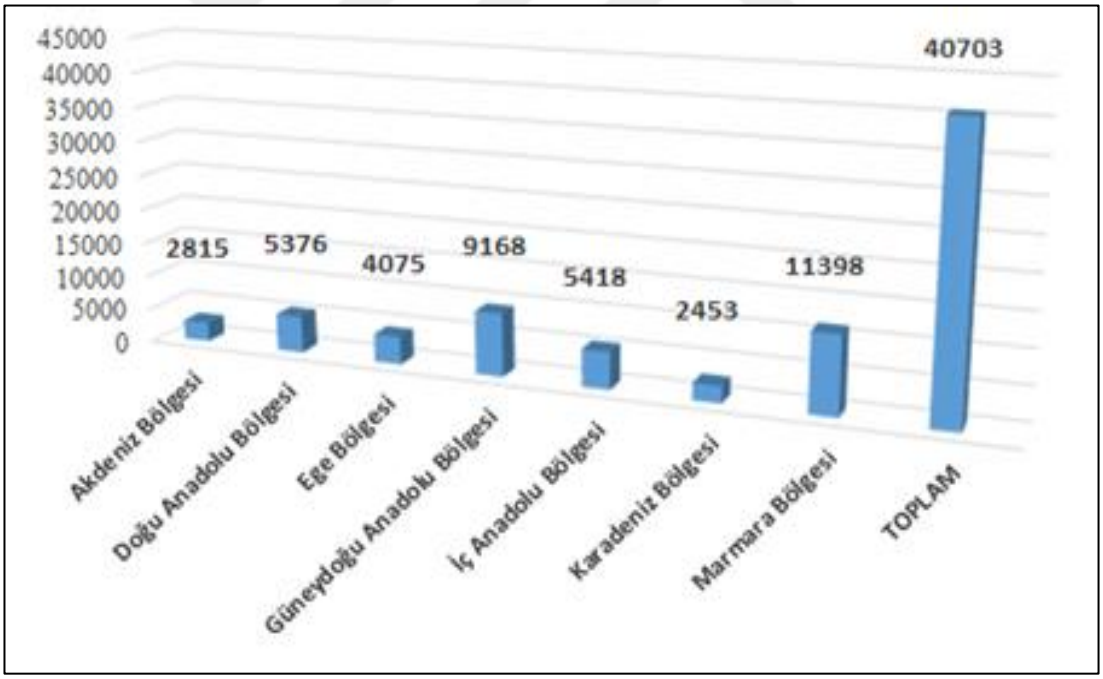
Bitkilerin gelişme döneminde çeşitli böcekler bitkilere zarar verebilmekte bu da sporların bitkiye girmesine neden olmaktadır. Bazı böcekler toksijenik küflerin dağılmasında rol almaktadır (Le Bars, 1982).

2.3. Gluten ve Çölyak

Çölyak hastalığı (ya da gluten enteropatisi), bağırsaklardaki sindirimi sağlayan villus (tüysü oluşumlar) denilen yapıların bozulmasına sebep olan ve dolayısıyla da yiyeceklerdeki besinin emilmesini engelleyen ve ince bağırsakta hasarlar oluşturan bir alerjik sindirim sistemi hastalığıdır. Yaşam boyu süren tek gıda alerjisidir (https://hsgm.saglik.gov.tr).

Çölyak bazen hiç belirti göstermeyebilir ya da çok hafif seyredebilir. Bazı bireylerde ise karın ağrısı, ishal, iştahsızlık, enfeksiyonlarda artış, kusma ve gelişim yavaşlaması gibi etkilerle kendini göstermektedir (https://hsgm.saglik.gov.tr).

Türkiye'de tanı konan çölyak hastalığı sayılarının bölgelere göre dağılımı 2017 yılı için Şekil 2.5'te verilmiştir. 2019 yılı Mayıs ayı itibari ile ülkemizdeki çölyak hasta sayısı 68123'dür.



Şekil 2.5. Türkiye'de tanı konan çölyak hastalarının bölgelere göre dağılımı (hsgm.saglik.gov.tr)

Çölyak hastaları ve intoleransı olan hastalar, gluten içeren ürünlerden uzak durmalıdır. (Lee, Andersen ve Ryu, 2014). Bunları tüketmeleri durumunda bağırsak hasarı oluşabilmektedir. Bu da yeterince besin emilimi yapılamadığından yetersiz beslenmeye neden olmaktadır (Hill ve diğ., 2002).

Tahıllardaki ana depolama proteini glutendir. Gluten özellikle buğday esaslı ürünlerin kalitesini etkileyen temel bileşendir (Özuğur ve Hayta, 2011). Buğday ununda bulunan gluten hamura hacim ve elastikiyet kazandırırken güzel bir tat ve koku verir. Glutensiz ürünlerde buğday yerine pirinç, mısır, soya fasulyesi, yer fıstığı ve nohut gibi gluten içermeyen ürünlerin unları kullanılır. Ayrıca yalancı tahıl olarak bilinen karabuğday, kinoa gibi unlar da tercih edilmektedir (Hayıt ve Gül, 2017). Çalışmamızda seçtiğimiz ürün içerikleri; glutensiz ürünler ve gluten içermeyen tahılların unlarıdır.

2.4. Validasyon

Validasyon; bir cihazın, metodun veya sistemin belirlenen amaca uygun olduğunu göstermek ve metodun performansını belirlemek için yapılan ölçme işlemleridir. Tüm metotlar için aşağıda belirtilen metot parametrelerinin validasyon çalışmaları yapılmıştır.

- LOD/LOQ
- Doğrusallık / Lineerlik
- Doğruluk
- Gerçeklik
- Geri kazanım
- Kesinlik
- Tekrarlanabilirlik
- Tekrar üretilebilirlik

LOD/LOQ: genel olarak tespit limiti (LOD), metodun laboratuvar koşullarında örnekteki varlığını tespit edebildiği ancak kesin miktarını ölçemediği en düşük analit konsantrasyonu; tayin limiti (LOQ) ise miktarsal olarak tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanabilir (Açar ve diğ., 2013).

$$LOD = SD \times 3 \quad (2.1)$$

$$LOQ = SD \times 10 \quad (2.2)$$

LOD (Limit of Detection) = Tayin Limiti

LOQ (Limit of Quantitation) = Ölçüm Limiti

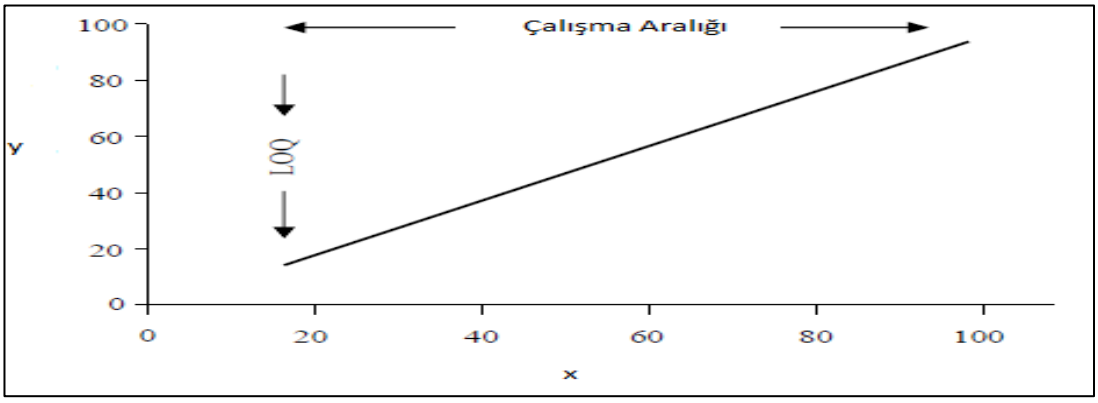
Standart sapma (SD): Bir serinin standart sapmasını bulmak için serinin aritmetik ortalaması hesaplanır, her bir sayının aritmetik ortalamadan farkının karesi alınarak toplamı bulunur. Elde edilen toplam değer eleman sayısının 1 eksiğine bölümünün karekökü alınarak SD elde edilir. Ölçüm sonuçlarının aritmetik ortalamadan ne kadar saptığının ortalamasını veren ölçüdür ve aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$S=\sqrt{\frac{\sum(x_i-\overline{x})^2}{n-1}} \tag{2.3}$$

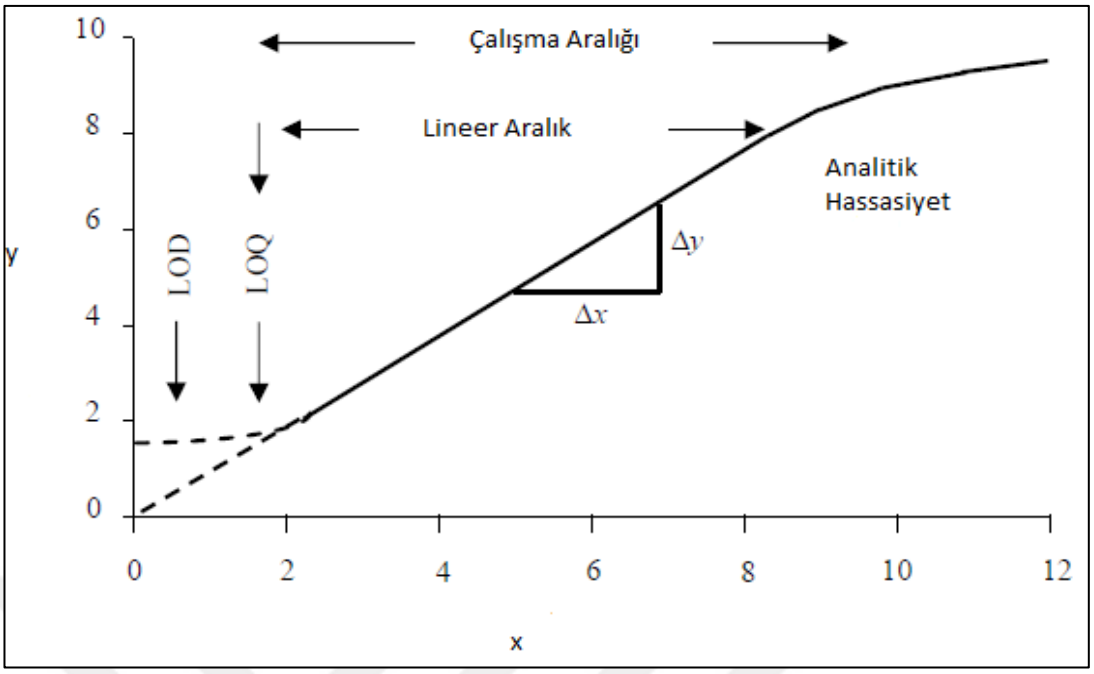
Bağıl Standart Sapma (RSD): Standart sapmanın ortalama değere bölünmesi ile elde edilir. %RSD ise RSD'nin 100 ile çarpılması ile elde edilir ve ölçülen değerin doğru ya da doğru kabul edilen değere yakınlığını gösterir. Birleştirilmiş rölatif standart sapma hesaplaması, RSDpool, aşağıdaki formül kullanılarak elde edilir.

$$RSD_{pool}=\sqrt{\frac{(n_1-1)RSD_1^2+(n_2-1)RSD_2^2+\ldots}{(n_1-1)+(n_2-1)+\ldots}} \tag{2.4}$$

Metot Çalışma Aralığı (Lineer Aralık): Metoda bağlı olarak ölçüm sonucunda hesaplama yapılabilecek alt ve üst limit aralığı. Metot çalışma aralığını belirlemek için örnek körü ve köre bilinen konsantrasyonlarda standart eklenerek cihazda okuma yaptırılır. Metot içerisinde aksi belirtilmemiş ise ISO 11095'e göre en az 3 farklı konsantrasyon seviyesinde veya metodun, mevzuatın gerektirdiği seviyelerde, standart çözelti ile, en az 2 tekrarlı yapılmalıdır. Şekil 2.6'daki gibi bir grafikle gösterilir. Metot çalışma aralığı ise Şekil 2.7'de gösterilmiştir (GTHB, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi, 2018).



Şekil 2.6. Metot çalışma aralığı x. Test örneğinin konsantrasyonu, y: Ölçülen konsantrasyon (GTHB, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi)



Şekil 2.7. Cihaz çalışma aralığı x: Kalibrasyon standartlarının konsantrasyonu, y: Cihazın sinyali (GTHB, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi)

Tekrarlanabilirlik: Tüm şartların (ölçüm metodu, kişi, cihaz, laboratuvar, çalışma koşulları, (kısa zaman) aynı olduğu koşullarda elde edilen bağımsız deney sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Standart sapmasının (SD) ve rölatif standart (RSD) sapması hesaplanarak tekrarlanabilirlik uygunluk kontrolleri yapılır.

Tekrarlanabilirlik Limiti Testi: Tekrarlanabilirlik koşulları altında kısa zaman aralıklarıyla aynı kişi tarafından yapılan analizler sonucu arasındaki (Genellikle % 95 olan belirli bir güven aralığında kalması beklenen) mutlak farkı ifade eder.

"r" değeri ilgili metotta verilmiş olabilir, verilmediyse aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$r = f(n) * SD \quad (2.5)$$

r = Tekrarlanabilirlik limiti,

f (n) = TS 5822' deki paralel sayısına denk gelen katsayı

Analiz sonuçlarının "r" değerine göre uygunluk kontrolü; elde edilen sonuçlar arasındaki mutlak fark "r" değerinden küçük veya eşitse bu analiz sonuçları uygundur.

Horwitz: Tekrarlanabilirlik standart sapması konsantrasyona bağlı olarak değişir. Kabul edilebilir değerler aşağıdaki Horwitz eşitliği ile hesaplanarak bulunur. Elde edilen tekrarlanabilirlik RSD pool değerleri Horwitz eşitliğinden bulunan değerden küçük olmalıdır;

$$PRSDr = 2^{1-0,5*\log C} \quad (2.6)$$

PRSDr: Horwitz eşitliğinden hesaplanan rölatif standart sapma

C: Çalışılan konsantrasyon seviyesi kütle fraksiyonu

Tekrar üretilebilirlik: Uygulanan koşullardan (metodun esası, ölçüm metodu, kişi, cihaz, laboratuvar, çalışma koşulları, zaman) farklı günlerde elde edilen ölçüm sonuçlarının standart sapmasının (SD) ve rölatif standart (RSD) sapmasının hesaplanarak uygunluk kontrolü yapılır. Bu çalışmada Horwitz testine tabi tutuldu.

Geri kazanım / Gerçeklik: Geri kazanım çalışmasında, bilinen konsantrasyonda analit örneğe ilave edilerek (spike / zenginleştirme) örnek analiz edilir ve tespit edilen analit konsantrasyonu ile ilave edilen miktar oranlanarak geri kazanım hesaplanır.

Geri kazanım sonuçları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{Geri kazanım} = \frac{C2}{C1} \times 100 \quad (2.7)$$

C1 = Spike yapılan konsantrasyon

C2 = Bulunan Konsantrasyon değeri

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan alet ekipmanlar şu şekildedir. Milli Q bidistile su cihazı ile (Millipore, Merck, Darmstadt, Almanya) bidistile su elde edildi. Mobil fazlar ultrasonik su banyosu (İntersonik, İstanbul, Türkiye) ile degaze edildi.

Tartımda, tüm deneyler için analitik teraziler (Sartorius CP 3202S, Goettingen, Almanya) kullanıldı. Numuneleri öğütmek ve homojenleştirmek için blender (Waring, ABD) ve öğütücü (Yazıcılar G2, Türkiye) kullanıldı.

DON analizinde Hettich 32A (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Almanya) santrifüj, DON ve OTA analizlerinde yoğunlaştırma için Parker Balston Nitro (NY, ABD) marka azot jeneratörü, viale almadan vorteks/tüp karıştırıcı (DLAB MX- S,Scientific Inc., Çin) kullanıldı.

Kromatografik analizler (Afla, ZON, DON ve OTA), bir ikili pompa, çevrimiçi degazör, otomatik örnekleyici, 2 dedektör (DAD ve FLD) ve bir kolon termostatı ile donatılmış HPLC (Agilent 1100 ve 1260, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Analitik kolonda aflatoksinlerin (B1, B2, G1, G2) tamamen ayrılması ve aflatoksin B1 ve aflatoksin G1'in floresans yoğunluğunu güçlendirmek için kolon sonrası türevlendirme için Kobra-cell/elektrokimyasal hücre (R-Biopharm-Thomson, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. Afla, OTA, ZON analizlerinde ACE C18 (250 mm x 4.6 mm) kolon (Aberdeen, Scotland), DON analizinde ODS-EP 150 mm x 4.6 mm kolon kullanıldı.

3.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromotografi (HPLC)

Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit bir faz arasından değişik hızlarla hareket etmeleri ve ayrılmaları esasına dayanır. Yüksek Performanslı Sıvı kromatografi (HPLC) cihazı Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. HPLC cihazı (Agilent 1260, Agilent 1100)

HPLC cihazı başlıca beş alt bölümden oluşur.

- Hareketli faz (Mobil faz)
- Pompa
- Enjektör
- Kolon
- Dedektör

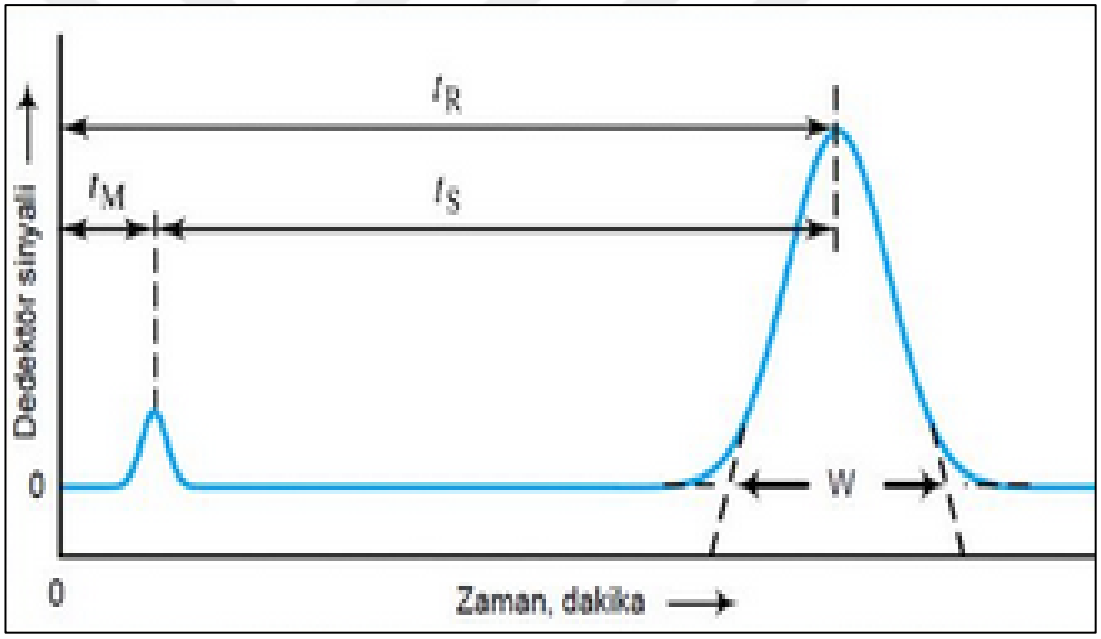
Mobil faz, HPLC'de hareket ederken numuneyi taşır. HPLC sistemlerinde kullanılacak tüm çözgenler en az HPLC saflıkta olmalıdır. İz miktardaki safsızlıklar dahi kolonu etkileyerek girişime neden olabilirler. Ayrıca tüm solventlerin gazının alınması (degaze edilmesi) zorunludur, aksi taktirde çözgende hava kabarcıklarının bulunması pompa ve kolonda problemlere neden olmaktadır. Örneğin; kolonda kabarcık oluşturarak pik genişlemesine yol açar.

Pompanın üç temel işlevi bulunmaktadır ki bunlar; doğru ve sabit akış sağlamak, doğru hareketli faz bileşimini sağlamak ve kolon içinde mobil fazı itmek için gerekli olan kuvveti sağlamaktır. Örnekleme sistemleri; kolona gönderilmesi gereken analitlerin çok yüksek basınç altında akış ve basınç koşullarını değiştirmeden sağlıklı bir biçimde enjekte edilmesini sağlar.

HPLC'de kullanılan ayırma kolonları genellikle paslanmaz çelik olup yüksek basınçlara dayanıklıdır. Sıklıkla kullanılan kolonlar 4.5-5.0 mm iç çaplı ve 10-30 cm uzunluğundaki kolonlardır. Kolon dolgu materyalleri genellikle silika ve alümina esaslıdır. Bir bileşiğin alıkonma zamanı partikül büyüklüğüne, yapısına ve kimyasına göre değişiklik gösterir.

Dedektör ise kolondan geçen bileşenleri görmemizi ve bu bileşenlerin miktarını belirlememizi sağlar.

Kromatogram, kromatografi analizlerinde elüsyon zamanı veya elüsyon hacmine numune derişimine bağlı sinyalin oluşturduğu grafiğe denir. HPLC cihazında alıkonma zamanını gösteren grafik Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Tek numune için ölü zaman ve alıkonma zamanı. t_R: kolon dolgusu içinde maddenin alıkonma zamanı, t_M : kolonda tutulmayan kısmın çıkma zamanı (t_M, ≅ kolondan geçen hareketli faz molekülünün çıkma zamanı)

Türevlendirme: Aflatoksin HPLC'de floresans dedektör kullanılarak belirlenir ancak su bazlı mobil fazlarda analitik olarak sadece B2 ve G2 floresanları yeterli yoğunlukta bulunur. Aflatoksin B1 ve G1'in HPLC FLD ile tayin edilebilmesi için floresans yayınımlarının güçlendirilmesi gerekir. Bu amaçla kuvvetli asitler, brom veya iyot gibi reaktifler kullanılır (Lawrence ve Scott, 1999).

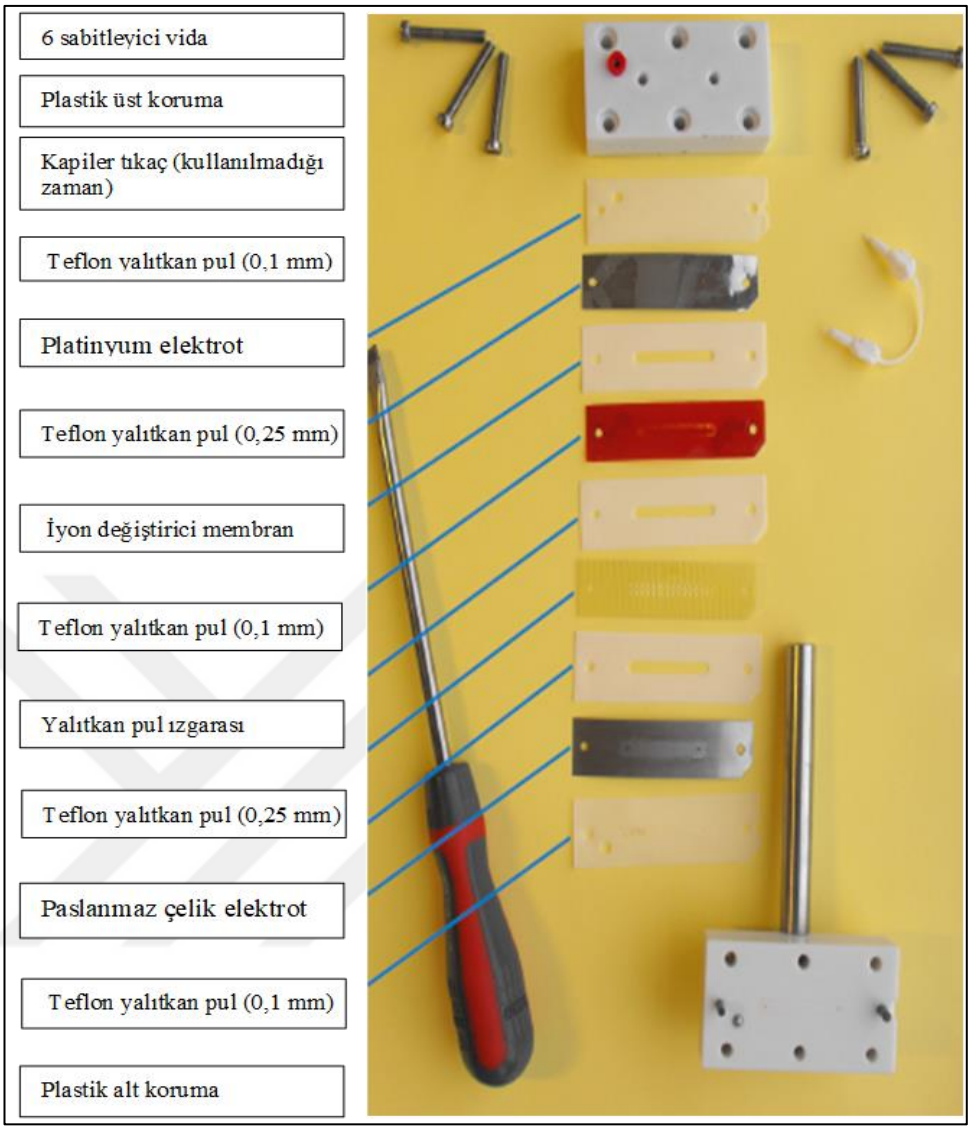
Kobra-Cell, aflatoksin B1 ve G1'in türetilmesi için reaktif bir brom formu üretir, bu da geliştirilmiş floresans ve dolayısıyla daha hassas tespit ile sonuçlanır. Reaktif brom ve aflatoksinler arasındaki reaksiyon, HPLC'de aflatoksinlerin floresans detektörüne girmesinden önce gerçekleşir (R Biopharm)

Bu çalışmada analitik kolonda aflatoksinlerin (B1, B2, G1, G2) birbirinden tam olarak ayrılması ve aflatoksin B1 ve aflatoksin G1' in floresans şiddetinin kuvvetlendirilmesi için Tamson marka kolon sonrası (post column) elektrokimyasal hücreden (Şekil 3.3) yararlanıldı.

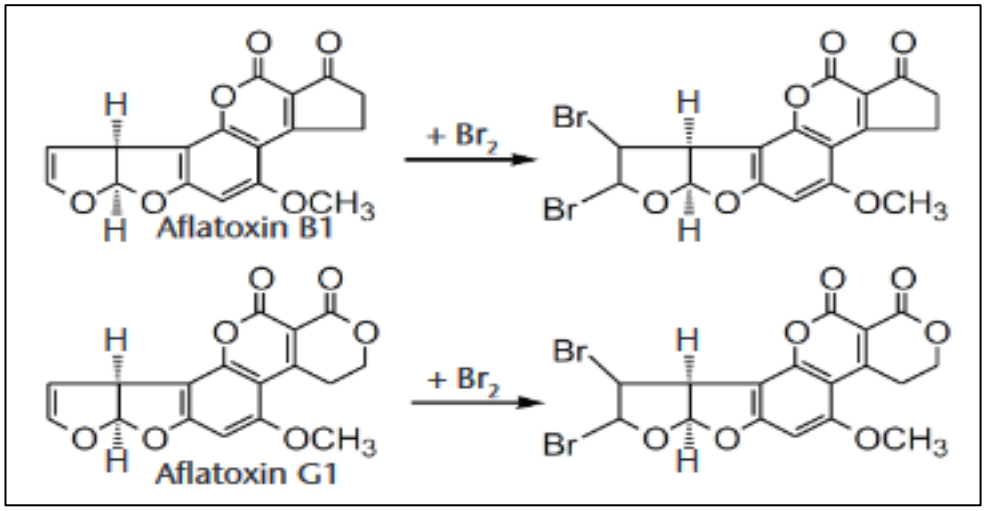
Kobra-cell yapısı ise Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Bromun üretilmesi için, kullanılan her 1 L mobil faza 120 mg KBr ve 350 µL 4 M HNO_3 eklenmiştir. Bromun reaksiyon mekanizması Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Kobra-cell türevlendirme cihazı



Şekil 3.4 Kobra-cell iç yapısı (R-Biopharm)



Şekil 3.5. Aflatoksin-bromür reaksiyon mekanizması (R Biopharm)

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalar sırasında kullanılan kimyasal maddeler yüksek saflıkta olup aşağıda özellikleri ile beraber verilmiştir. HPLC saflıkta Merck marka Metanol (CH_3OH), Asetonitril (C_2H_3N) mobil faz ve ekstraksiyon solventlerini hazırlamada kullanıldı. Merck marka Nitrik asit (HNO_3 - % 65'lik) ve potasyum bromür (KBr - Merck %99) aflatoksin mobil faz hazırlamada, Asetik asit (CH_3COOH - Merck %96'lık) okratoksin mobil faz ve okratoksin enjeksiyon solventi hazırlamada kullanıldı. Sodyum klorür (NaCl – Merck - %99,9'luk) PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) hazırlama ve analizlerde, Sodyum bifosfat (Na_2HPO_4 Merck %99) ve Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 Merck %99) kullanıldı. Validasyon analizlerinde ise ana stok standart olarak Aflatoksin mix standardı (Supelco - 2,6 µg/mL), Okratoksin standardı (Trilogy – 10 µg/mL), Zeralenon standardı (Trilogy – 25 µg/mL), Deoksinivalenol standardı (Trilogy – 100 µg/mL) kullanıldı. İmmünoafinite kolon olarak AflaTEST- P, OchraTEST-P, DeoksinivalenolTEST-P, ZeralenonTEST-P R-Biopharm kullanıldı.

Metotlar uygulanırken kullanılan çözeltilerin hazırlanış şekli: Okratoksin analizinde kullanılan PBS: 8 g NaCl, 1,16 g Na_2HPO_4, 0,2 g KH_2PO_4 ve 0,2 g KCl tartılarak 1 L saf suda çözünür. Aflatoksin ekstraksiyon solventi : CH_3OH-H_2O (70:30), okratoksin ekstraksiyon solventi: asetonitril-Su (60:40), sOkratoksin enjeksiyon solventi : metanol-su-asetik asit (30:70:1) (v/v/v), zeralenon ekstraksiyon solveti : metanol - ultra safsu (80:20 – V:V) oranlarında hazırlandı.

Aflatoksin mobil fazı: bidistile su + asetonitril + metanol 6:2:3-V:V oranlarında karıştırıldı. Kobracell türevlendirmesi için ise mobil fazın 1 L' ne 120 mg KBr ve 100 µL 4M HNO_3 ilave edilir.

d = 1,4 g/mL

$$d = \frac{m}{V} \tag{2.8}$$

1,4 = m / 1000 m = 1400 g

%65' lik olduğundan m = (1400 x 65) / 100 = 910 g saf HNO_3

$$M = \frac{n}{V} \rightarrow M = \frac{m}{mA} * V \tag{2.9}$$

910 / (63,01x1) = 14,44 mol/L

$M_1 * V_1 = M_2 * V_2$ (2.10)

14.44 x V_1 = 4 x 100

V_1 = 27,70 mL alınır, distile su ile 100mL'ye tamamlanır.

Okratoksin mobil fazı : Bidistile su - asetonitril-asetik asit (51:48:1 - V:V),
Deoksinivalenol mobil fazı : Bidistile su + asetonitril + metanol (%94+3+3 - V:V),
Zeralenon mobil fazı : Bidistile su : asetonitril (50:50- V:V) oranlarında hazırlandı.

3.3. Kullanılan Gıda Örnekleri

Mikotoksin tayinlerinde kullanılan gıda örnekleri, Kocaeli'deki çeşitli marketlerden satın alınmıştır. Deneylerde makarna (2 paket), bisküvi / kraker çeşitleri (6 paket), 1'er paket erişte, mısır gevreği, tarhana, pirinç unu, mısır unu, ekmek, 1'er kutu kek karışımı, karabuğday unu, beyaz dut kurusu unu, keçiboynuzu unu, nohut unu, kestane unu, Hindistan cevizi unu kullanılmıştır. Öğütülen 21 parça numune karanlık ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.4. Örnekleme ve Hazırlama

Numuneler blender (Şekil 3.6) ve öğütücüden (Şekil 3.7) geçirilerek öğütüldü. Öğütülen numuneler bir kapta karıştırılarak ¼'ü kenara alındı. Kalan kısma aynı işlem art arda uygulandı. Böylece tamamen homojen hale gelen örnekten tartım yapıldı.



Şekil 3.6. Numune öğütme ve homojenizasyonda kullanılan blendırlar (Waring)



Şekil 3.7. Numune öğütme ve homojenizasyonda kullanılan öğütücü (Yazıcılar G2)

3.5. Deneysel İşlemler

3.5.1. Aflatoksin analizi

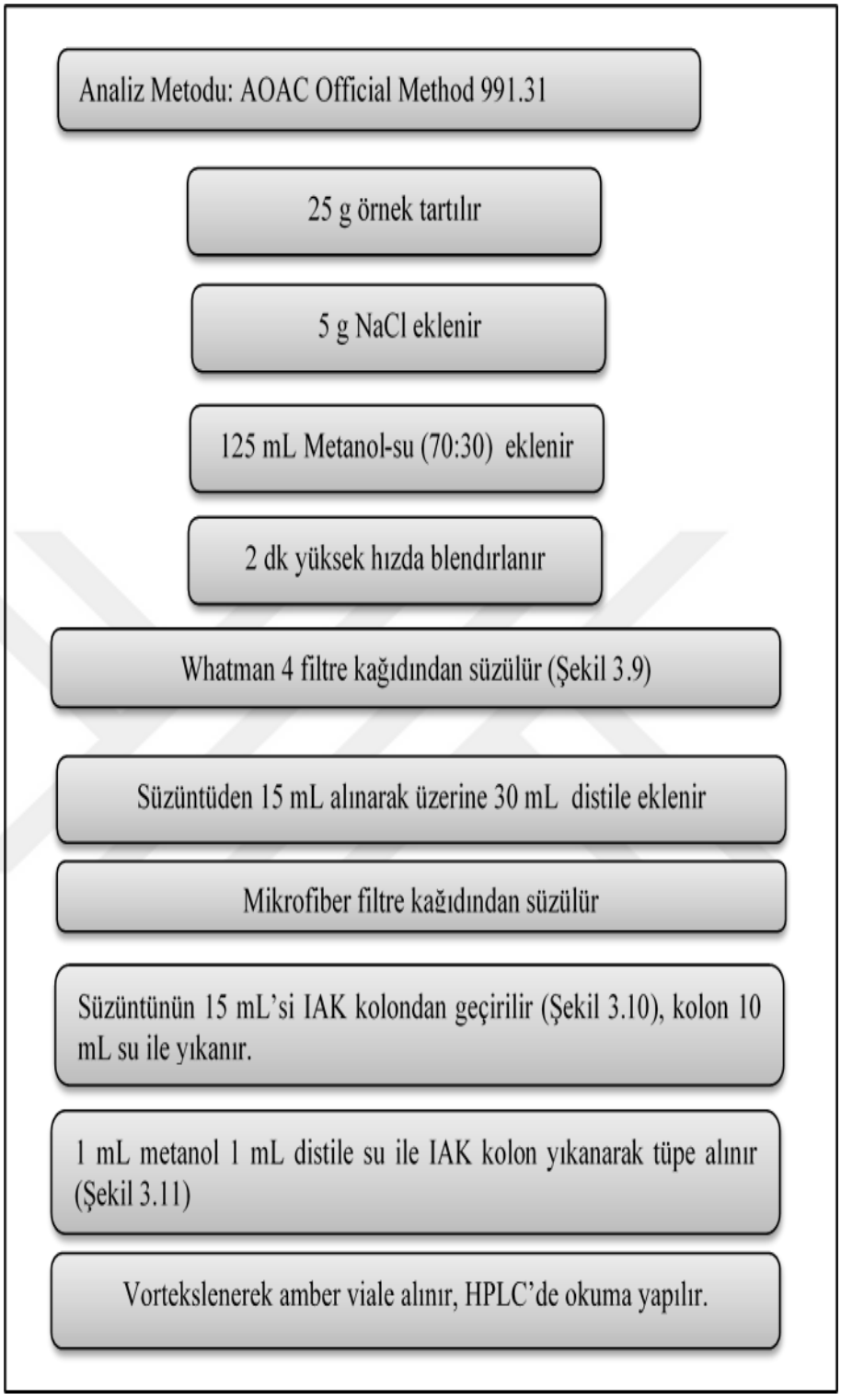
Aflatoksin stok standart çözeltisi: 2,6 µg/mL toplam aflatoksindir (Tablo 3.1)

Tablo 3.1. Aflatoksin ana standart konsantrasyon değerleri

B1 (µg/mL)	B2 (µg/mL)	G1 (µg/mL)	G2 (µg/mL)
1	0,3	1	0,3

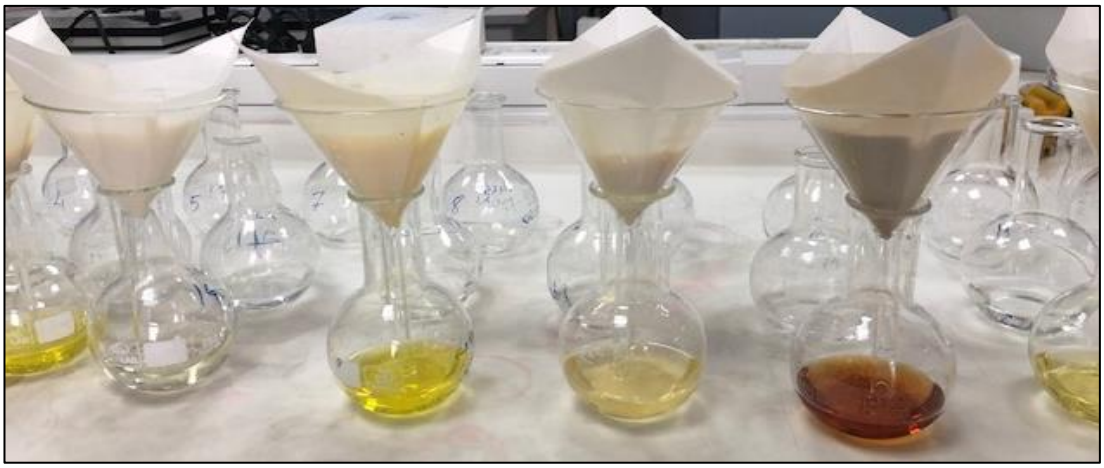
Ana stok çözeltisinden 1 mL alındı, metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak 260 ng/mL ara stok çözelti elde edildi. Gerekli seyreltmeler yapılarak çalışma çözeltileri elde edilmiştir.

Şekil 3.8'de aflatoksin analizi aşamaları gösterilmiştir.

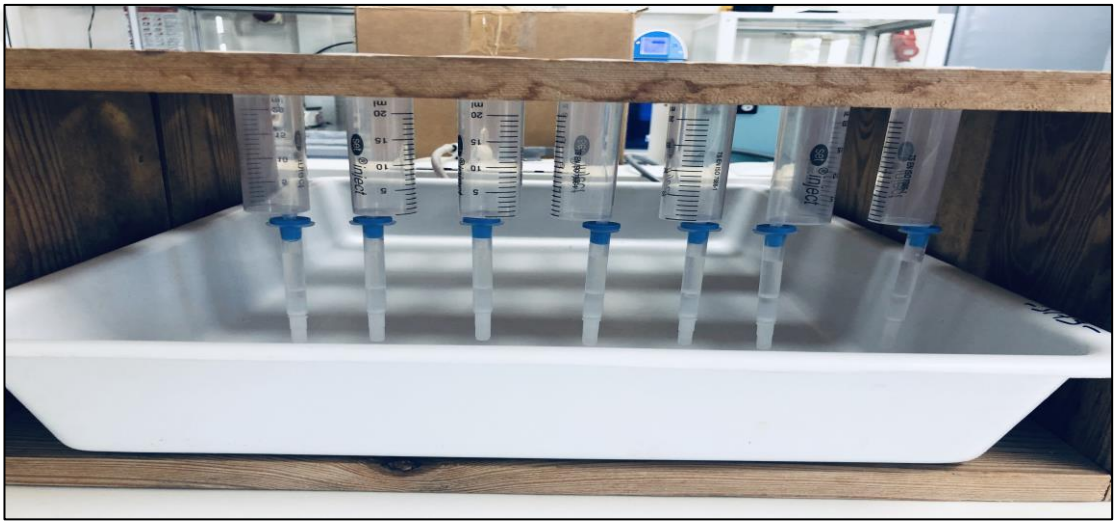


Şekil 3.8. Aflatoksin analizi metot aşamaları

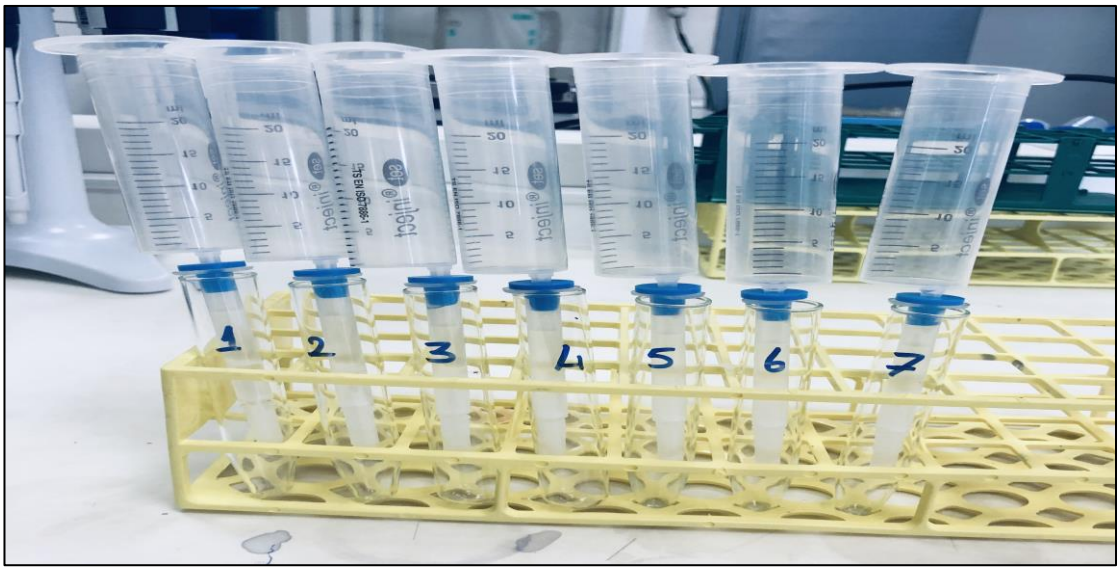
Ekstrakte edilen numunenin whatman 4 filtre kağıdından süzülmesi, IAK kolondan geçirilmesi IAK kolonda tutulan toksinin cam tüpe alınması işlemleri Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de gösterilmiştir



Şekil 3.9. Ekstrakte edilen numunelerin Whatman No:4 filtre kağıdından süzülmesi



Şekil 3.10. IAK Kolondan numunelerin geçirilişi ekle

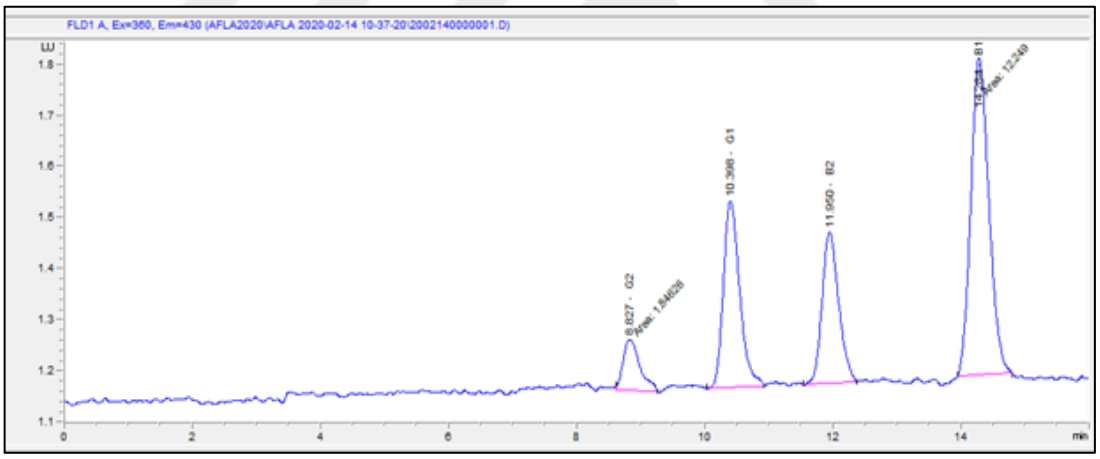


Şekil 3.11. Seyreltilmiş numunenin cam tüpe alınışı

3.5.1.1. Aflatoksin analizi için kromatografik şartlar

Bu çalışmada, kolon fırın sıcaklığı 25^0C olarak kullanıldı. Hazırlanan standartlar ve numuneler, autosampler (otomatik örnekleyici) kullanılarak, 100 µL hacimli loop takılmış enjektör ile otomatik olarak sisteme enjeksiyon yapıldı. HPLC'de mobil faz olarak bidistile su + asetonitril + HPLC saflıkta metanol (6:2:3) kullanıldı. Mobil faz akış hızı olarak AOAC tarafından belirlenen 1.0 mL/dk seçilmiştir. Sabit faz (kolon) olarak 250 mm uzunlukta, 4.6 mm çapında, 5µm C18 partikül boyutlu analitik kolon kullanıldı. Aflatoksin B1 ve aflatoksin G1' in floresans şiddetinin kuvvetlendirilmesi için Kobracell kullanıldı, bu çalışmada kobracell 100 µA kullanıldı. Aflatoksin analizinde floresans dedektör kullanıldı, λex 360 ve λem 430 nm' de çalışmalar yapıldı. Analitik kolonda gerçekleşen ayırmalar sonucu elde edilen sinyaller ChemStations bilgisayar yazılımı ile otomatik olarak integrasyonları hesaplandı.

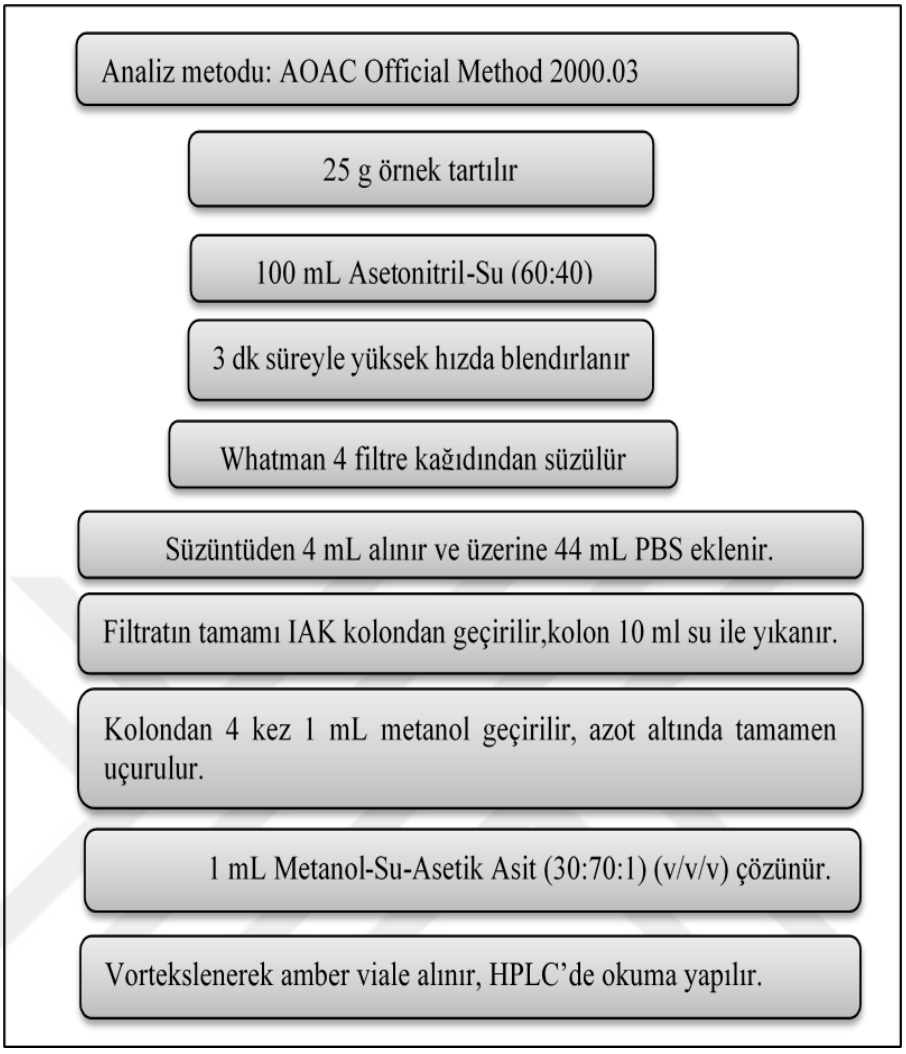
Aflatoksin kromatogramı Şekil 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.12. Aflatoksin B1, B2, G1, G2 kromatogramı

3.5.2. Okratoksin analizi

10 µg/mL olan Okratoksin A standardı metanol içinde çözünmüş haldedir. 200 µL standart çözeltiden alındı ve üzerine 800 µL toluen-asetik asit (99:1) ilave edildi (2µg/mL okra standardı - 1.ara stok). Bu çözeltiden 100 µl alınır ve azot gazı altında uçurulur. Sonra 10 mL enjeksiyon solventinde çözündü (20 ng/mL' lik ara stok standart çözeltisi ele geçer - 2.ara stok). Gerekli seyreltmeler yapılarak çalışma çözeltileri elde edilmiştir.

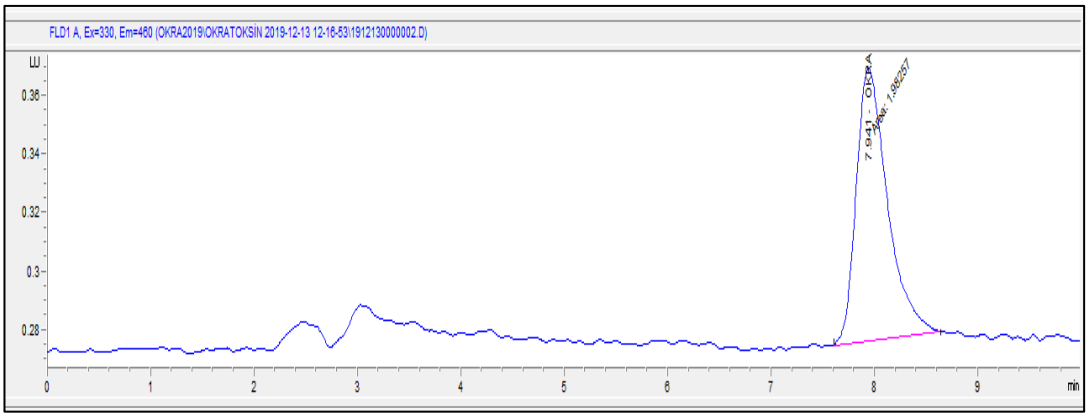


Şekil 3.13. Okratoksin analizi metot aşamaları

3.5.2.1. Okratoksin analizi için kromatografik şartlar

Bu çalışmada, kolon fırın sıcaklığı 40 ^{0}C olarak kullanıldı. Sisteme 100 µL enjeksiyon yapıldı. Mobil faz akış hızı olarak AOAC tarafından belirlenen 1.0 mL/dk seçilmiştir. Sabit faz (kolon) olarak 250 mm uzunlukta, 4.6 mm çapında, 5µm C18 partikül boyutlu analitik kolon kullanıldı (ACE 5 C18 250 x 4.6mm / ODS-1 C18 5µm 250 x 4.6mm). Okratoksin analizinde floresans dedektör kullanıldı, λex 330 ve λem 460 nm' de çalışmalar yapıldı. Analitik kolonda gerçekleşen ayırmalar sonucu elde edilen sinyaller ChemStations bilgisayar yazılımı ile otomatik olarak integrasyonları hesaplandı.

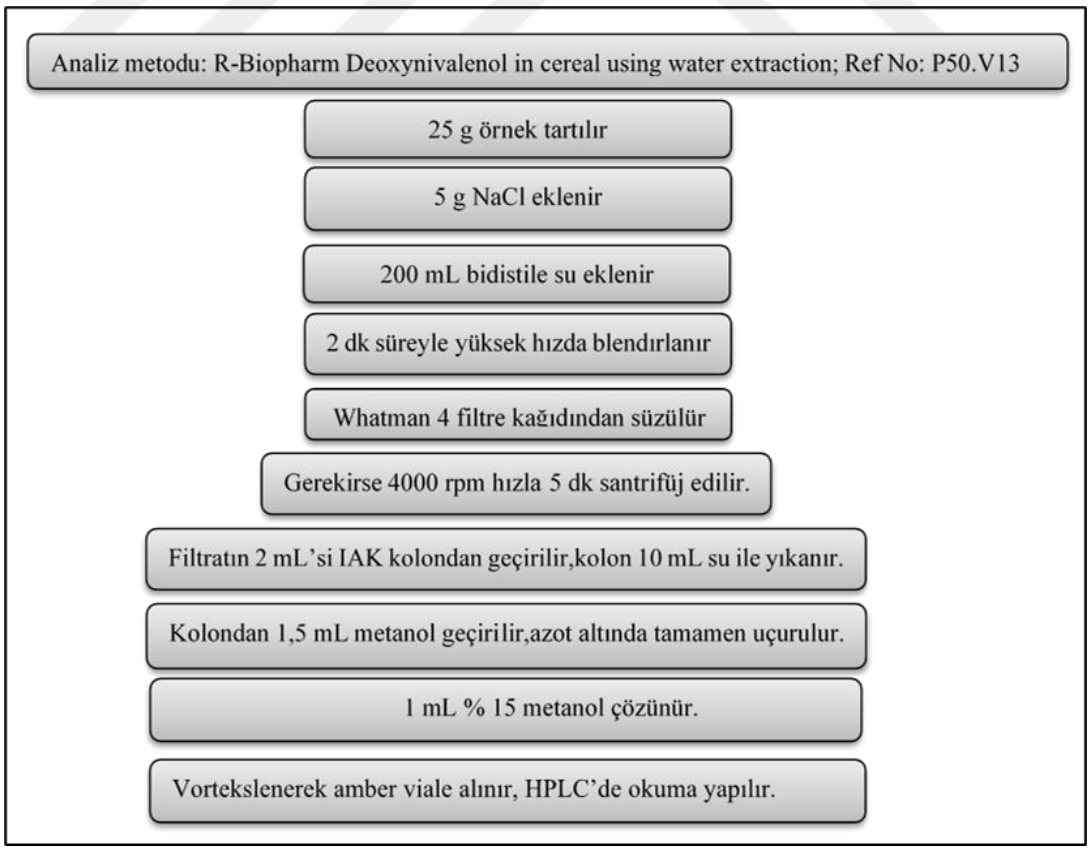
Okratoksin kromatogramı Şekil 3.14'de verilmiştir.



Şekil 3.14. Okratoksin kromatogramı

3.5.3. Deoksinivalenol analizi

100µg/mL olan DON standardı metanol içinde 10 mL' lik çözelti halindedir. 200 µL stok standart çözeltiden alındı ve üzerine 800 µL asetonitril ilave edildi (20 µg/mL DON Standardı). Bu Çözeltiden 200 µL alınır ve azot gazı altında uçuruldu. Sonra 2 mL % 15 metanolde çözündü (2 µg/mL' lik ara stok DON Standart çözeltisi). Gerekli seyreltmeler yapılarak çalışma çözeltileri elde edilmiştir.



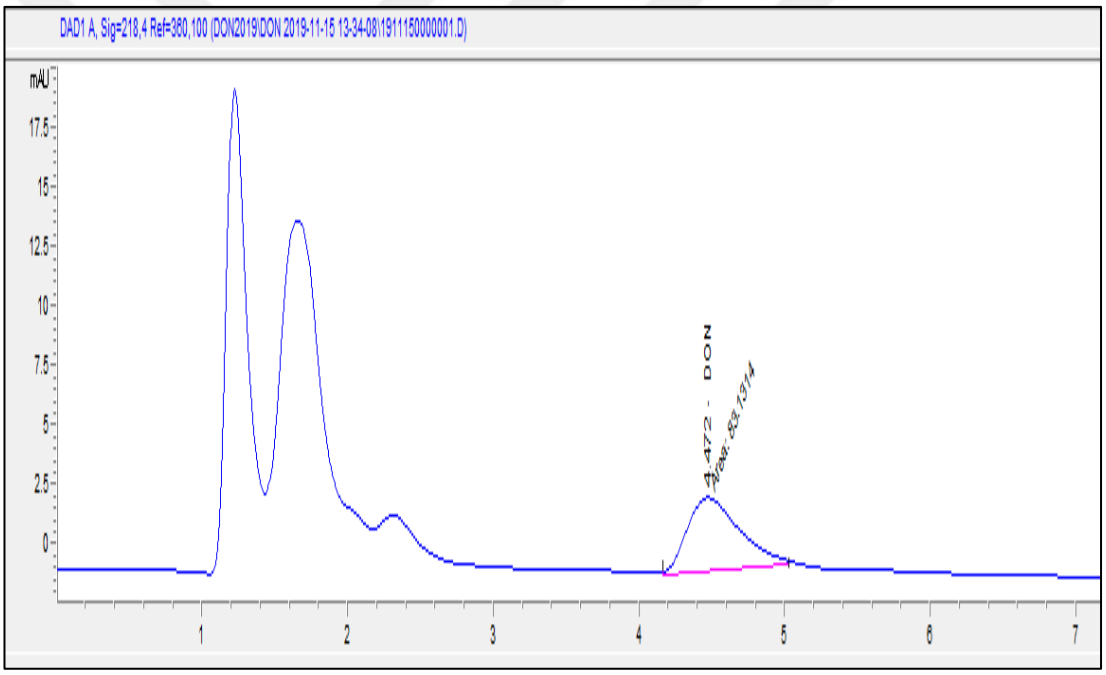
Şekil 3.15. Deoksinivalenol analizi metot aşamaları

3.5.3.1. Deoksinivalenol analizi için kromatografik şartlar

Bu çalışmada, kolon fırın sıcaklığı 40 ^{0}C olarak kullanıldı. Sisteme 100 µL enjeksiyon yapıldı. Mobil faz akış hızı olarak 1.0 mL/dk seçilmiştir. Sabit faz (kolon) olarak 150 mm uzunlukta, 4.6 mm çapında, 5µm ODS (ODS-EP 150 mm x 4.6 mm, 5µm) analitik kolon kullanıldı.

Deoksinivalenol analizinde DAD dedektör kullanıldı, 218 nm'de çalışmalar yapıldı. Analitik kolonda gerçekleşen ayırmalar sonucu elde edilen sinyaller ChemStations bilgisayar yazılımı ile otomatik olarak integrasyonları hesaplandı.

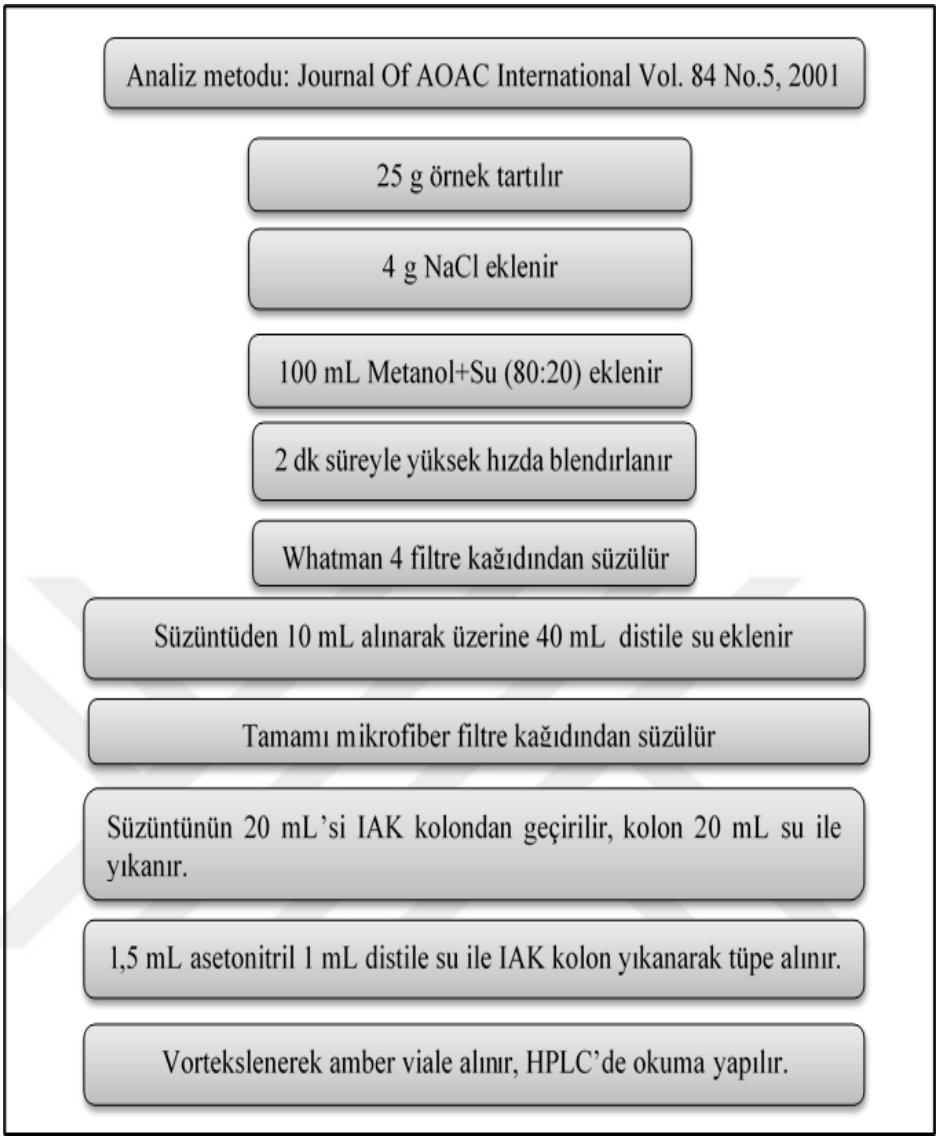
Deoksinivalenol kromatogramı Şekil 3.16'da verilmiştir.



Şekil 3.16. DON kromatogramı

3.5.4. Zearalenon analizi

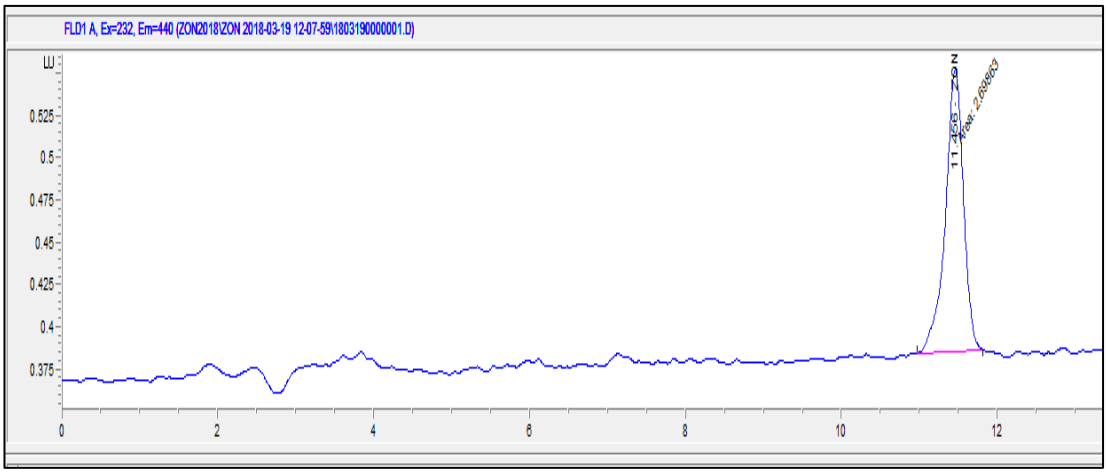
25 µg/mL olan ana stok çözeltisinden 2 mL alındı, metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak 5µg/mL ara stok çözelti elde edildi. İstenilen derişimlere göre 5 µg/mL olan ara stok çözeltiden alınarak azot altında uçuruldu. 10 mL asetonitril-su (3:7) ile çözündürülerek çalışma çözeltileri elde edildi.



Şekil 3.17. Zeralenon analizi metot aşamaları

3.5.4.1. Zearalenon analizi için kromatografik şartlar

Bu çalışmada, kolon fırın sıcaklığı 40 ^{0}C olarak kullanıldı. Sisteme 100 µL enjeksiyon yapıldı. Mobil faz akış hızı olarak 1.0 mL/dk seçilmiştir. Kolon olarak 150 mm uzunlukta, 4.6 mm çapında, 5µm ODS (150 mm x 4.6 mm, 5µm) analitik kolon kullanıldı. Zearalenon analizinde FLD dedektör kullanıldı, λex 232 ve λem 440 nm' de çalışmalar yapıldı. Analitik kolonda gerçekleşen ayırmalar sonucu elde edilen sinyaller ChemStations bilgisayar yazılımı ile otomatik olarak integrasyonları hesaplandı. Zearalenon kromatogramı Şekil 3.18'de verilmiştir.

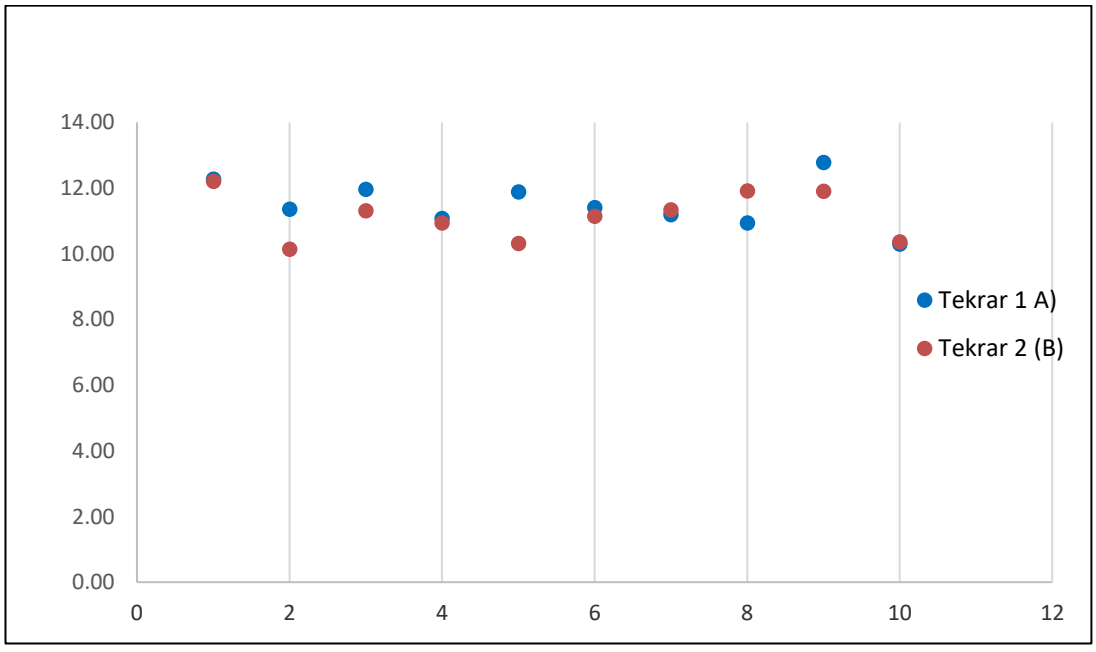


Şekil 3.18. ZON kromatogramı

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Homojenizasyon

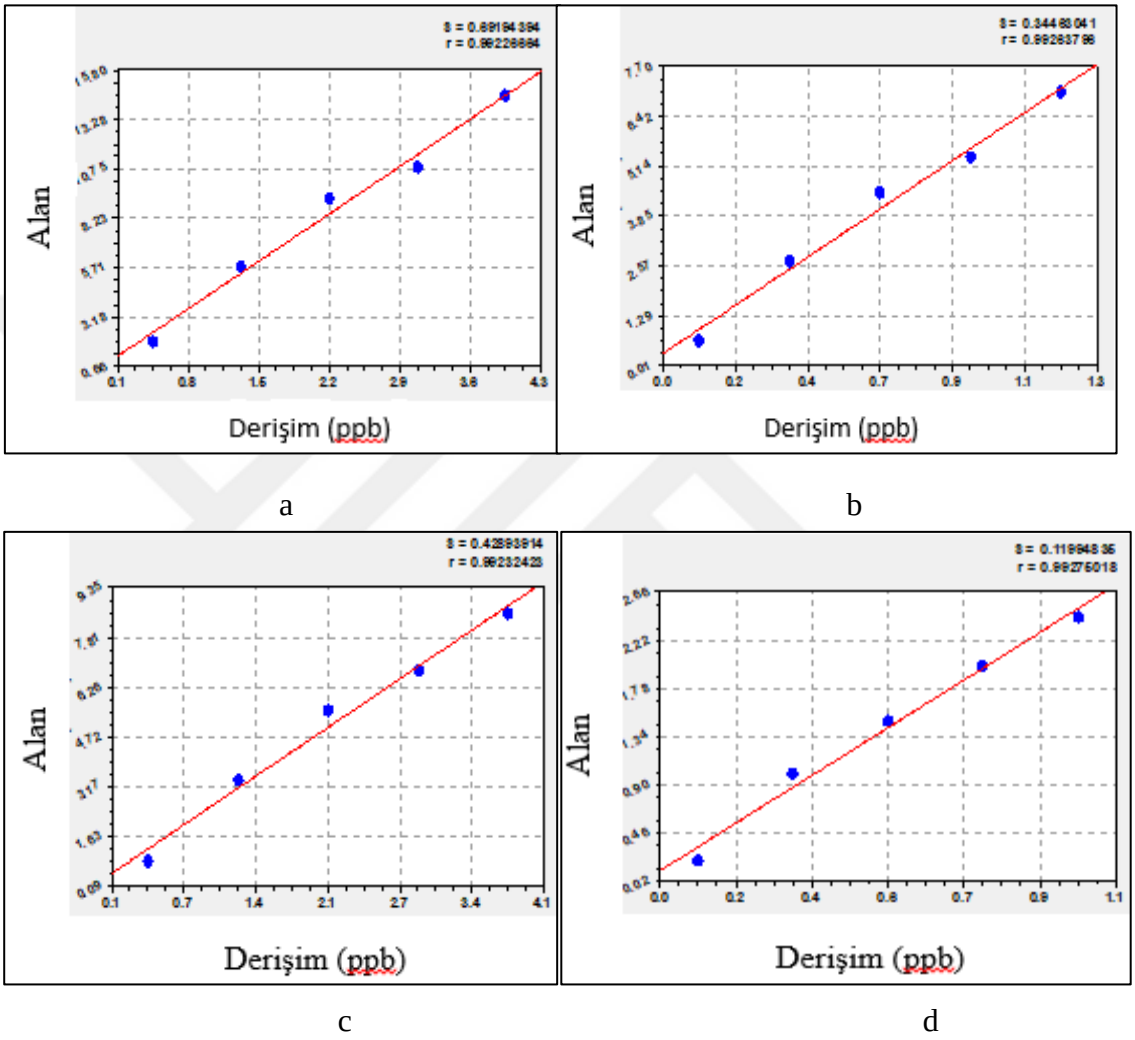
Mikotoksinler; gıda ve yemlerde düzensiz (homojen olmayan) dağılmaktadır. Bu nedenle mikotoksin analizlerinde homojenizasyon çok önemlidir. Bu amaçla örneğin parti büyüklüğüne göre (ki bu miktar Gıdalarda Mikotoksin Limitleri İçin Numune Alma, Hazırlama ve Analiz Metodu Tebliği -Tebliğ No: 2018/10'de belirtilmiştir) numune alınır. Bu işlem sırasında partiyi temsil edecek şekilde farklı noktalardan örnek alınması gerekir. Laboratuvarın analiz sonucunun doğru ve tekrarlanabilir olabilmesi için paçal numunenin homojenize edilmesi çok önemlidir. Homojenizasyon partikül büyüklüğünü küçülterek kontamine partiküllerin parçalanmış numune içerisinde düzgün dağılmasını sağlayan bir prensiptir. Bunun için 8 numaralı mısır unu numunesinde paralelli 10 analiz yapılmış (Thompson ve diğ., 2006) ve Şekil 4.1.'deki grafik elde edilmiştir. Grafikte farklı renklerle gösterilen değerler paralel çalışmalara ait değerlerdir. Bu değerler varyans testine tabi tutularak aykırı değer olmadığı görülmüştür. Ayrıca çalışmalardan hesaplanan örnekler arası varyansın tablodan elde edilen kritik değerden küçük olduğu yani geçerli olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. Homojenizasyon grafiği

4.2. Aflatoksin Analizi Metot Validasyonu

5 noktalı (toplam aflatoksin 1,096, 3,288, 5,480, 7,674, 9,857 µg/kg olacak şekilde) aflatoksin kalibrasyon tablosu yapıldı. Elde edilen aflatoksin (B1, B2, G1, G2) kalibrasyon grafiği Şekil 4.2'deki gibidir.



Şekil 4.2. Aflatoksin B1, B2, G1, G2 kalibrasyon grafiği

Aflatoksin metot validasyonunda için pirinç ve mısır kullanılmıştır. İlk olarak pirinç ve mısır örneği test edilmiş ve aflatoksin içermediği belirlenmiştir. Homojenize edilmiş örneklere aflatoksin standardı eklenerek analizler yapılmıştır. Elde edilen tüm veri setleri istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

LOD / LOQ, kesinlik (tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik) ve gerçeklik (geri kazanım) çalışmaları için tüm matrikslere Tablo 4.1.'de belirtilen konsantrasyonlarda aflatoksin standardı spike edilerek ölçümler yapılmıştır.

Tablo 4.1. Aflatoksin analizinde kullanılan konsantrasyonlar

Aflatoksin B1(µg/kg)	Aflatoksin B2 (µg/kg)	Aflatoksin G1 (µg/kg)	Aflatoksin G2 (µg/kg)	Aflatoksin Toplam (µg/kg)	Çalışma
1,00	0,30	1,00	0,30	2,60	LOD/LOQ
1,00 / 5,00	0,30 / 1,50	1,00 / 5,00	0,30 / 1,50	2,60 / 13,00	Tekrarlanabilirlik Geri Kazanım
1,00 / 5,00	0,30 / 1,50	1,00 / 5,00	0,30 / 1,50	2,60 / 13,00	Tekrar üretebilirlik

Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar; Türk Gıda Kodeksi Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği (Tebliğ No: 2018/10)'ne göre değerlendirilmiştir.

Aflatoksin için performans değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Aflatoksin için performans kriterleri (TGK, Tebliğ No: 2018/10)

Kriter	Konsantrasyon oranı (µg/kg)	Geri Kazanım (%)	
Geri alma Aflatoksin B1, B2, G1, G2	<1,0	50 – 120	
	1 – 10	70 – 110	
	>10	80 – 110	
Kesinlik RSD_R $RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$	Hepsi	Tekrarlanabilirlik: Horwitz eşitliğinden elde edilen değer	Tekrarüretebilirlik: 2 x Horwitz eşitliğinden elde edilen değer

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi geri kazanım oranları çalışılan konsantrasyon değerlerine göre değişim gösterir. Bu çalışmada en düşük aflatoksin B1 konsantrasyonu 1 µg/kg ve toplam aflatoksin konsanntrasyonu 2,6 µg/kg olduğu için geri kazanım oranı %70-110 aralığındadır. En yüksek çalışılan konsantrasyon değerleri ise aflatoksin B1 için 5 µg/kg toplam aflatoksin için ise 13 µg/kg'dir. Aflatoksin B1 için geri kazanım aralığı %70-110 iken toplam aflatoksin için %80-110'dur.

4.2.1. Aflatoksin LOD / LOQ tayini

Homojenize edilmiş kör örneğe son konsantrasyonu toplam aflatoksin konsantrasyonu 2,6 µg/kg olacak şekilde standart eklenerek, kullanılan yöntemde belirtilen ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra HPLC-FLD'de 18 paralel analiz yapılmış standart sapması hesaplanmıştır. Yapılan çalışma sonucu LOQ değeri aflatoksin B1 için 0,69 µg/kg, toplam aflatoksin için ise 1,32 µg/kg bulunmuş Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Aflatoksin LOQ değerleri

Çalışma No	Aflatoksin B1 (µg/kg)		Toplam Aflatoksin (µg/kg)	
1	0,82	0,85	2,19	2,36
2	0,92	1,03	2,30	2,50
3	1,01	0,88	2,54	2,48
4	0,93	1,03	2,43	2,68
5	1,07	0,99	2,48	2,55
6	0,92	0,98	2,24	2,58
7	0,96	0,92	2,30	2,37
8	0,89	0,92	2,34	2,30
9	1,00	0,90	2,40	2,48
10	0,88	1,00	2,25	2,42
11	0,92	1,03	2,26	2,47
12	0,86	0,94	2,14	2,40
13	0,82	1,00	2,27	2,52
14	0,99	0,88	2,54	2,48
15	1,00	0,92	2,50	2,35
16	1,00	0,87	2,42	2,30
17	1,00	0,96	2,59	2,54
18	0,97	0,96	2,43	2,44
Ortalama	0,94	0,95	2,37	2,46
SD	0,07	0,06	0,13	0,10
LOD:3xSD	0,21	0,18	0,40	0,30
LOQ:10xSD	0,69	0,59	1,32	1,01

4.2.2. Aflatoksin tekrarlanabilirlik

2,6 µg/kg ve 13 µg/kg toplam aflatoksin ile zenginleştirilmiş kör pirinç ve mısır ile aynı gün 6 defa bağımsız çalışma yapılmıştır. Yapılan ölçümlerin ortalamaları, standart sapmaları ve % rölatif standart sapmaları RSD_{pool} değerleri hesaplanmıştır.

4.2.3. Aflatoksin tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretebilirlik çalışması için homojenize edilmiş örneklere 2 farklı konsantrasyonda toplam aflatoksin, 2,6 µg/kg ve 13 µg/kg olacak şekilde standart ilave edilmiş, 6 farklı günde ikişer paralel çalışma yapılmıştır. SD ve RSD değerleri bulunarak ilgili testlere tabi tutulup değerlendirilmiştir. Ölçüm belirsizliği hesabında kullanılmış Tablo 4.5.'te gösterilmiştir.

4.2.4. Aflatoksin geri kazanım (gerçeklik) sonuçları

Geri kazanım (gerçeklik) testi için farklı iki konsantrasyonda (2,6 µg/kg ve 13 µg/kg), aflatoksin ile zenginleştirilmiş blank pirinç ve mısır numuneleri kullanılarak 6 tekrar

yapılmış, geri kazanım oranı hesaplanmıştır. Aflatoksin B1 geri kazanım oranı mısırda %96,76, pirinçte %96,47, toplam aflatoksin analizinde mısırda %93,47 pirinçte ise %94,82 bulundu. Elde geri kazanım değerleri TGK performans kriterlerine göre uygundur.

4.2.5. Aflatoksin ölçüm belirsizliği

Aflatoksin, analizi metot verifikasyon çalışması yapılmış, bu çalışmalardan ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır.

Geri kazanımdan gelen belirsizlik Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Aflatoksin analizi için geri kazanım çalışmalarından gelen belirsizlik

	Mısır					Pirinç				
	Toplam	B1	B2	G1	G2	Toplam	B1	B2	G1	G2
% Geri Kazanım	93,47	96,76	86,50	94,51	86,05	94,82	96,47	87,73	96,81	89,78
U(x) = SD/√n	0,8316	1,0620	1,3585	0,9786	1,4223	0,5395	0,8800	1,0204	0,9360	1,2229

Tekrar üretilebilirlik çalışmaları sonucunda tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik (RSDpool) formülü ile hesaplanmıştır. RSDpool değerleri Tablo 4.5' te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Aflatoksin tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik hesabı

	Mısır					Pirinç				
	Toplam	B1	B2	G1	G2	Toplam	B1	B2	G1	G2
RSD_{pool}	0,0418	0,0541	0,075	0,054	0,085	0,033	0,054	0,074	0,049	0,075

Tekrar üretilebilirlik çalışmaları sonucunda tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik (RSDpool) formülü ile hesaplanmıştır. RSDpool değerleri Tablo 4.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6.Aflatoksin analizi için tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik hesabı

	Mısır					Pirinç				
	Toplam	B1	B2	G1	G2	Toplam	B1	B2	G1	G2
RSD_{pool}	0,0446	0,0612	0,0833	0,0720	0,0760	0,0455	0,0557	0,0809	0,0768	0,0617

Aflatoksin, analizi metot verifikasyon çalışması yapılmış, bu çalışmalardan elde edilen değerlerle ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır. Buna göre elde edilen metot belirsizlik değerleri aşağıda Tablo 4.7, Tablo 4.8, Tablo 4.9, Tablo 4.10'da verilmiştir. TGK Bulaşanlar Yönetmeliği'nde sadece Aflatoksin B1 ve toplam aflatoksin

değerlendirmesi olduğu için aşağıdaki tabloda bu iki analize ait belirsizlik değerleri bulunmaktadır. Aflatoksin G1 ve aflatoksin G2 belirsizlik bileşenleri toplam aflatoksin belirsizlik değerini bulmak için kullanılmaktadır.

Tablo 4.7. Toplam aflatoksin analizi mısır numunesi belirsizlik bileşenleri tablosu

Parametre	Değer (X)	u(X)	u(X)/X
Kalibrasyon	9,86	0,3108	0,0315
Gerçeklik (bias)	93,47	0,8316	0,0089
Tekrarlanabilirlik	1	0,0418	0,0418
Tekrar üretilebilirlik	1	0,0446	0,0446
Relatif birleşik belirsizlik			0,0694
*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik			0,1387

Tablo 4.8. Aflatoksin B1analizi mısır numunesi belirsizlik bileşenleri tablosu

Parametre	Değer (X)	u (X)	u (X)/X
Kalibrasyon	3,92	0,1149	0,0293
Gerçeklik (bias)	96,76	1,0620	0,0110
Tekrarlanabilirlik	1	0,0541	0,0541
Tekrar üretilebilirlik	1	0,0612	0,0612
Relatif birleşik belirsizlik			0,0875
*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik			0,1749

Tablo 4.9. Toplam aflatoksin analizi pirinç numunesi belirsizlik bileşenleri tablosu

Parametre	Değer (X)	u (X)	u (X)/X
Kalibrasyon	9,86	0,3108	0,0315
Gerçeklik (bias)	94,82	0,5395	0,0057
Tekrarlanabilirlik	1	0,0329	0,0329
Tekrar üretilebilirlik	1	0,0455	0,0455
Relatif birleşik belirsizlik			0,0646
*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik			0,1292

Tablo 4.10. Aflatoksin B1 analizi pirinç numunesi belirsizlik bileşenleri tablosu

Parametre	Değer (X)	u(X)	u (X)/X
Kalibrasyon	3,92	0,1149	0,0293
Gerçeklik (bias)	96,47	0,8800	0,0091
Tekrarlanabilirlik	1	0,0535	0,0535
Tekrar üretilebilirlik	1	0,0557	0,0557
Relatif birleşik belirsizlik			0,0831
*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik			0,1661

%95 güven aralığında toplam aflatoksin analizinin genişletilmiş relatif belirsizlik değeri (k=2) mısır numunesinde 0,1387 pirinç numunesinde ise 0,1292 bulundu. Aflatoksin B1 analizinde mısır numunesinin genişletilmiş relatif belirsizlik değeri 0,1749 pirincin ise 0,1661 bulundu. Bu değerlerden büyük olan 0,1387 ve 0,1749 tahıl ve tahıl ürünlerinin belirsizlik değeri olarak kabul edilmiştir.

Aflatoksin B1 için belirsizlik;

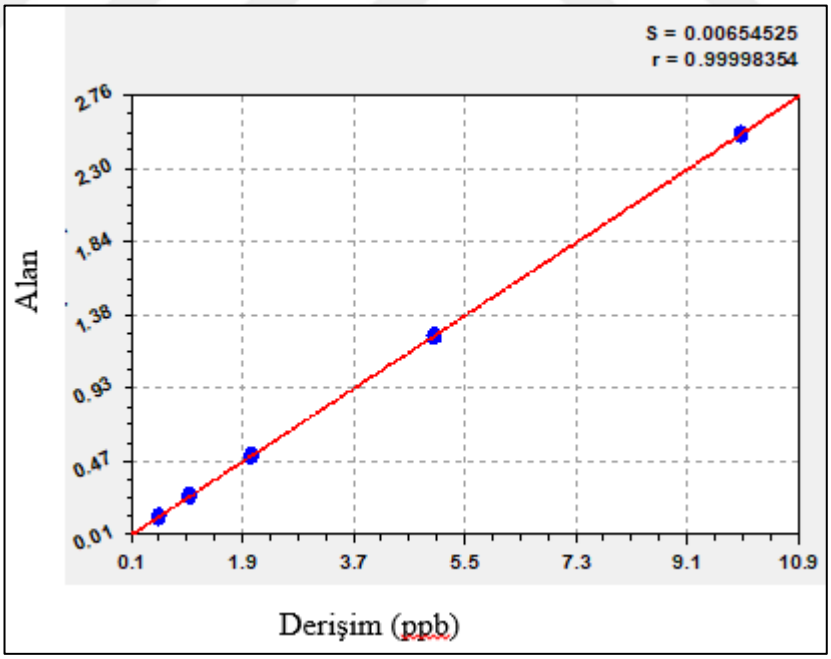
Raporlama (k=2) %95 güven aralığında: X ± 0,17 (X: ölçüm sonucu)

Toplam Aflatoksin için belirsizlik;

Raporlama (k=2) %95 güven aralığında: X ± 0,14 (X: ölçüm sonucu)

4.3. Okratoksin Analizi Metot Validasyonu

5 noktalı (0,5, 1, 2, 5, 10 µg/kg) okratoksin kalibrasyon tablosu yapıldı. Elde edilen okratoksin kalibrasyon grafiği Şekil 4.3'teki gibidir.



Şekil 4.3. Okratoksin kalibrasyon grafiği

Metot validasyonu için buğday ve mısır kullanılmıştır. İlk olarak buğday ve mısır örneği test edilmiş ve Okratoksin A içermediği belirlenmiştir. Homojenize edilmiş

örneklere Okratoksin A standardı eklenerek analizler yapılmıştır. Elde edilen tüm veri setleri istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Kesinlik (tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik) ve gerçeklik (geri kazanım) çalışmaları için tüm matrikslere 0,5 µg/kg, 2 µg/kg ve 5 µg/kg Okratoksin A standardı ilave edilerek ölçümler yapılmıştır. Okratoksin A performans kriterlerine göre (2018/10 sayılı Türk Gıda Kodeksi) değerlendirilmiştir (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Okratoksin A için performans kriterleri

Limit (µg/kg)	Okratoksin		
	RSD_r (%)	RSD_R (%)	Geri Alma (%)
<1	≤40	≤60	50 – 120
1 – 10	≤20	≤30	– 110

4.3.1. Okratoksin LOD / LOQ tayini

Kör numuneye 0,5 µg/kg standart eklenerek 10 paralel çalışma yapılmıştır. HPLC / FLD cihazında okuma yapılmış ve Tablo 4.12'de gösterilmiştir.

Tablo 4.12. Tahıl ve tahıldan yapılmış tüm gıda ürünlerinde Okratoksin A için LOD/LOQ seviyeleri

Çalışma Sayısı	0,5 µg/kg
1	0,54
2	0,51
3	0,52
4	0,53
5	0,55
6	0,54
7	0,57
8	0,47
9	0,55
10	0,56
ORTALAMA	0,53
SD	0,03
LOD	0,09
LOQ (hesaplanan)	0,29

Okratoksin için LOQ 0,29 µg/kg bulundu ancak tebliği karşıladığından dolayı çalışmalarda 0,5 µg/kg kabul edildi.

4.3.2. Okratoksin A tekrarlanabilirlik

Homojenize edilmiş matrikslere üç farklı konsantrasyonda Okratoksin A standardı ilave edilmiştir (0,5 µg/kg, 2 µg/kg ve 5 µg/kg). Örnekte aynı gün, her bir konsantrasyonda 6'şar çalışma yapılmıştır. Elde edilen tüm veri setleri istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

4.3.3. Okratoksin A tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretebilirlik çalışması için homojenize edilmiş buğday ve mısır örneklerine 3 farklı konsantrasyonda (0,5 µg/kg, 2 µg/kg ve 5 µg/kg) Okratoksin A standardı ilave edilmiştir. Örnekte, 6 farklı günde ikişer paralel çalışma yapmıştır.

4.3.4. Okratoksin A geri kazanım sonuçları

Gerçeklik çalışması geri kazanım yapılmıştır. Geri alma çalışmasında tekrarlanabilirlik çalışmasındaki veriler kullanılmıştır. 0,5 µg/kg için kabul edilen geri kazanım oranı %50-120 iken 1-10 µg/kg için %70-110'dur. Buğday numunesinde geri kazanım ortalama %92,01 mısır numunesinde ise %92,80 bulunmuştur. Bu değerler Tablo 4.11'de verilen TGK Performans değerlerine uygundur.

4.3.5. Okratoksin ölçüm belirsizliği

Okratoksin, analizi metot verifikasyon çalışması yapılmış, bu çalışmalardan ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır. Geri kazanımdan gelen belirsizlik Tablo 4.13'de gösterilmiştir.

Tablo 4.13. Tahıl ve tahıldan yapılmış tüm gıda ürünlerinde Okratoksin A analizi için geri kazanım çalışmalarından gelen belirsizlik

	Buğday	Mısır
% Geri Kazanım	92,01	92,80
$U(x) = SD/\sqrt{n}$	0,6320	0,6332
U(x)/x	0,0069	0,0068

Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik (RSDpool) formülü ile hesaplanmıştır. RSD_{pool} değerleri Tablo 4.14' te gösterilmiştir.

Tablo 4.14. Tahıl ve tahıldan yapılmış tüm gıda ürünlerinde Okratoksin A analizi için tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik

	Buğday	Mısır
RSD_{pool}	0,0320	0,0393

Tekrar üretilebilirlik çalışmaları sonucunda tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik (RSDpool) formülü ile hesaplanmıştır. RSDpool değerleri Tablo 4.15'te gösterilmiştir.

Tablo 4.15. Tahıl ve tahıldan yapılmış tüm gıda ürünlerinde Okratoksin A analizi için tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik

	Buğday	Mısır
RSD_{pool}	0,0390	0,0412

Elde edilen belirsizlik değerleri aşağıda Tablo 4.16, Tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.16. Mısır Okratoksin A analizi için belirsizlik bileşenleri tablosu

Okratoksin A			
Bileşen	Değer	Standart Belirsizlik	Rel. Std. Bel.
Kalibrasyon Belirsizliği	10,00	0,0350	0,0035
Geri Kazanım Belirsizliği	92,80	0,6332	0,0068
Tekrarlanabilirlik Belirsizliği	1	0,0393	0,0393
Tekrar Üretilebilirlik Belirsizliği	1	0,0412	0,0412
Bileşik Belirsizlik		0,0575	
Genişletilmiş Belirsizlik (k=2, %95 güven aralığı)		0,1150	

Tablo 4.17. Buğday Okratoksin A analizi için belirsizlik bileşenleri tablosu

Okratoksin A			
Bileşen	Değer	Standart Belirsizlik	Rel. Std. Bel.
Kalibrasyon Belirsizliği	10,00	0,0350	0,0035
Geri Kazanım Belirsizliği	92,01	0,6320	0,0069
Tekrarlanabilirlik Belirsizliği	1	0,0320	0,0320
Tekrar Üretilebilirlik Belirsizliği	1	0,0390	0,0390
Bileşik Belirsizlik		0,0510	
Genişletilmiş Belirsizlik (k=2, %95 güven aralığı)		0,1019	

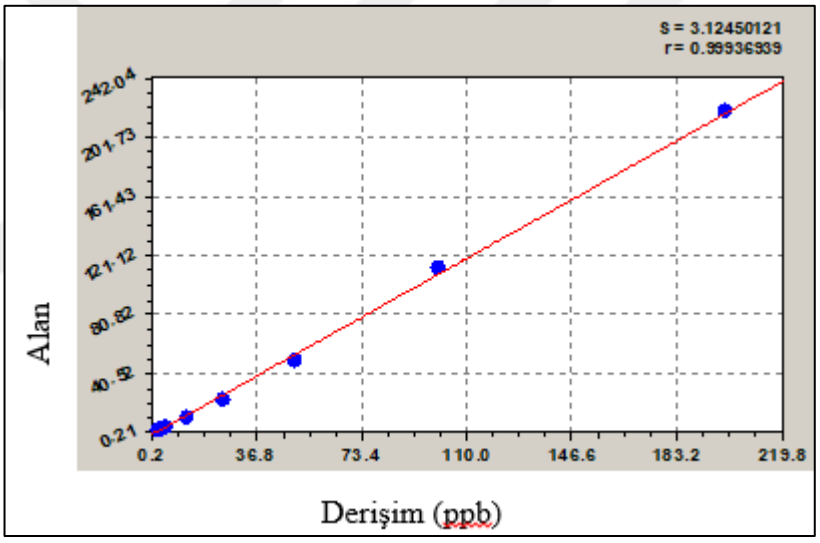
%95 güven aralığında toplam okratoksin analizinin genişletilmiş relatif belirsizlik değeri (k=2) mısır numunesi için 0,1150 buğday numunesi için ise 0,1019 bulunmuştur.

(k=2) %95 güven aralığında;

Raporlama = X±0,12*X (X: Ölçüm sonucu)

4.4. Deoksinivalenol Analizi Metot Validasyonu

Deoksinivalenol kalibrasyon tablosu yapıldı. Elde edilen deoksinivalenol kalibrasyon grafiği Şekil 4.4'deki gibidir.



Şekil 4.4. Deoksinivalenol kalibrasyon grafiği

Metot validasyonu için buğday ve mısır kullanılmıştır. İlk olarak buğday ve mısır örneği test edilmiş ve deoksinivalenol içermediği belirlenmiştir. Homojenize edilmiş örneklere deoksinivalenol standardı eklenerek analizler yapılmıştır. Elde edilen tüm veri setleri istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Kesinlik (tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik) ve geri kazanım çalışmaları için mısır ve buğday üzerine deoksinivalenol standardı ilave edilmiş ve ölçümler yapılmıştır. Yapılan çalışmalar; 2018/10 sayılı Türk Gıda Kodeksi Performans Kriterleri'ne göre değerlendirilmiştir (Tablo 4.18).

Tablo 4.18. Deoksinivalenol için performans kriterleri

Limit (µg/kg)	Deoksinivalenol		
	RSD_r (%)	RSD_R (%)	Geri Alma (%)
>100 - <500	≤20	≤40	60 – 110
>500	≤20	≤40	70 – 120

4.4.1. Deoksinivalenol LOD / LOQ tayini

Homojenize edilmiş kör örneğe (deoksinivalenol içermeyen) deoksinivalenol standardı eklenerek analizler tekrarlanmıştır. Agilent HPLC-DAD cihazı ile mısır ve buğdayda son konsantrasyonu 250 µg/kg olacak şekilde hesaplama yapılmış ve bu oranlarda stok standart örneklere eklenmiş elde edilen değerler Tablo 4.19'da gösterilmiştir.

Tablo 4.19. Deoksinivalenol LOD/LOQ donuçları

Ürün	Mısır	Buğday
Çalışma No		
1	217,04	190,44
2	198,04	200,32
3	200,40	195,56
4	210,12	207,92
5	230,84	207,32
6	212,64	202,64
7	219,44	195,60
8	190,80	195,00
9	190,72	208,04
10	196,00	201,80
ORTALAMA	206,60	200,46
SD	13,48	6,19
LOD	40,45	18,56
LOQ	134,83	61,88

Yapılan çalışma sonucunda mısırın LOQ değeri 134,83 µg/kg buğdayın ise 61,88 µg/kg bulunmuştur.

4.4.2. Deoksinivalenol tekrarlanabilirlik

Aynı gün içinde son konsantrasyonu 250 µg/kg ve 1000 µg/kg son konsantrasyon olacak şekilde deoksinivalenol standardı ile zenginleştirilmiş, birbirinden bağımsız 6 çalışma yapılmıştır. Elde edilen tüm veri setleri istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

4.4.3. Deoksinivalenol tekrar üretilebilirlik

Farklı günlerde yapılan tekrarlanabilirlik sonuçları, 250 µg/kg ve 1000 µg/kg lık geri kazanım test sonuçlarından hesaplanmıştır. 6 farklı gün çalışılmıştır, elde edilen tüm veri setleri istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

4.4.4. Deoksinivalenol geri kazanım

Geri kazanım ve doğruluk testi için 250 µg/kg ve 1000 µg/kg konsantrasyonlarında deoksinivalenol standardı ile zenginleştirilmiş kör mısır ve buğday numuneleri kullanılarak 6 tekrar yapılmıştır. TGK performans değerlerine göre 250 µg/kg için geri kazanım oaranı %60-110 1000 µg/kg için %70-120 olmalıdır. Çalışmalar neticesinde mısır için ortalama geri kazanım %92,86 buğday içinse %91,85 bulunmuştur. Tablo 4.18.'de verilen performans değerlerine göre uygundur.

4.4.5. Deoksinivalenol ölçüm belirsizliği

Deoksinivalenol analizi verifikasyon çalışması yapılmış, bu çalışmalardan ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır. Geri kazanımdan gelen belirsizlik Tablo 4.20.'de verilmiştir.

Tablo 4.20. DON analizi için geri kazanım çalışmalarından gelen belirsizlik

	Buğday	Mısır
% Geri Kazanım	91,85	92,86
U(x) = SD/√n	2,0835	1,5111

Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik (RSDpool) formülü ile hesaplanmıştır. RSD pool değerleri Tablo 4.21.' de gösterilmiştir.

Tablo 4.21. DON analizi için tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik

	Buğday	Mısır
RSD_{pool}	0,0499	0,0437

Tekrarüretilebilirlik çalışmaları sonucunda tekrarüretilebilirlikten gelen belirsizlik (RSDpool) formülü ile hesaplanmıştır. RSD pool değerleri Tablo 4.22'de gösterilmiştir.

Tablo 4.22. DON analizi için tekrarüretilebilirlikten gelen belirsizlik

	Buğday	Mısır
RSD_{pool}	0,0730	0,0680

Buna göre elde edilen belirsizlik değerleri aşağıda Tablo 4.23, Tablo 4.24'te verilmiştir.

Tablo 4.23. Buğday DON analizi için belirsizlik bileşenleri tablosu

Parametre	Değer (X)	u(X)	u(X)/X
Kalibrasyon	300,00	0,9643	0,0032
Gerçeklik (bias)	91,85	2,0835	0,0227
Tekrarlanabilirlik	1	0,0499	0,0499
Tekrarüretilebilirlik	1	0,0730	0,0730
Relatif birleşik belirsizlik			0,0914
*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik			0,1827

Tablo 4.24. Mısır DON analizi için belirsizlik bileşenleri tablosu

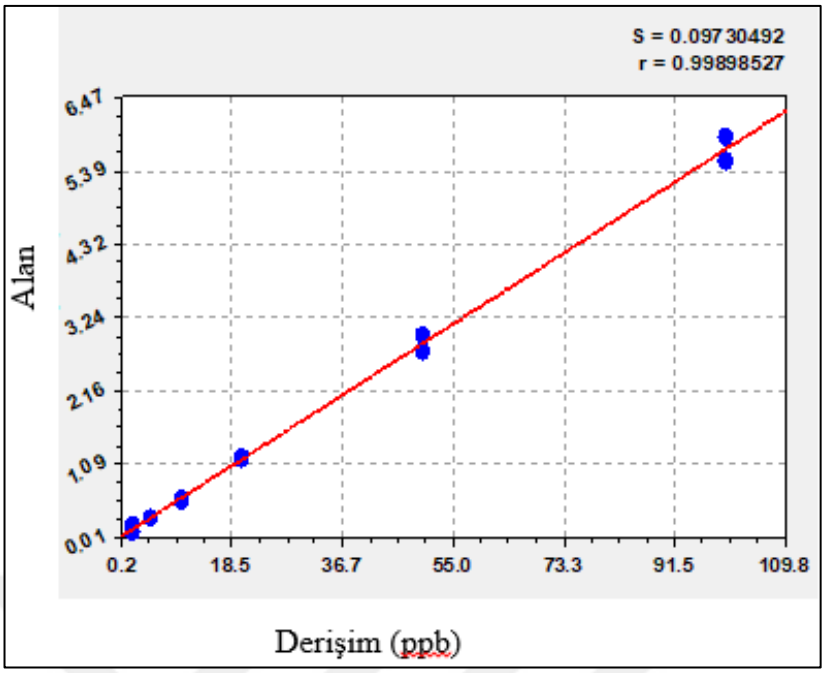
Parametre	Değer (X)	u(X)	u(X)/X
Kalibrasyon	300,00	0,9643	0,0032
Gerçeklik (bias)	92,86	1,5111	0,0163
Tekrarlanabilirlik	1	0,0437	0,0437
Tekrarüretilebilirlik	1	0,0680	0,0680
Relatif birleşik belirsizlik			0,0825
*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik			0,1651

%95 güven aralığında genişletilmiş relatif belirsizlik buğday için 0,1827, mısır için 0,1651 bulunmuştur. Tüm tahıllar için belirsizlik 0,1827 kabul edilmiştir.

Raporlama = X ±0,18* X (k=2) (X: Ölçüm sonucu)

4.5. Zeralenon Analizi Metot Validasyonu

Zeralenon kalibrasyon tablosu yapıldı. Elde edilen zeralenon kalibrasyon grafiği Şekil 4.5' deki gibidir.



Şekil 4.5. Zeralenon kalibrasyon grafiği

Metot validasyonu için mısır ve pirinç kullanılmıştır. İlk olarak mısır ve pirinç örneği test edilmiş zeralenon içermediği belirlenmiştir. Homojenize edilmiş temiz örneklere zeralenon standardı eklenerek analizler yapılmıştır.

Elde edilen tüm veri setleri istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Zeralenon performans kriterlerine göre (2018/10 sayılı Türk Gıda Kodeksi) değerlendirilmiştir (Tablo 4.25).

Tablo 4.25. Zeralenon için performans kriterleri

Limit (µg/kg)	Zeralenon		
	RSD_r (%)	RSD_R (%)	Geri Alma (%)
≤50	≤40	≤50	60–120
>50	≤25	≤40	70-120

4.5.1. Zeralenon LOD/LOQ tayini

Homojenize edilmiş zearalenon içermeyen blank örneğe son konsantrasyonu örnekte 10 µg/kg olacak şekilde zearalenon standardı eklenerek, kullanılan yöntemde belirtilen ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra HPLC-FLD'de 10 paralel analiz yapılarak standart sapması hesaplanmış elde edilen değerler Tablo 4.26'da gösterilmiştir.

Tablo 4.26. Zeralenon LOQ değeri

Çalışma No	Mısır	Pirinç
1	8,83	9,35
2	9,08	8,71
3	8,28	9,61
4	10,05	9,82
5	8,94	8,89
6	8,66	8,71
7	8,82	10,16
8	8,91	10,62
9	9,79	10,83
10	8,29	9,55
Ortalama	8,9650	9,6254
SD	0,5708	0,7496
LOD:3xSD	1,7123	2,2487
LOQ:10xSD	5,7075	7,4956

4.5.2. ZON tekrarlanabilirlik sonuçları

10 µg/kg ve 50 µg/kg (aşağıdaki tabloda zearalenon bileşenleri verilmiştir) zearalenon ile zenginleştirilmiş kör pirinç ve mısır ile 6 defa bağımsız çalışma yapılmıştır. Elde edilen tüm veri setleri istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

4.5.3. ZON tekrar üretilebilirlik sonuçları

Farklı günlerde yapılan tekrarlanabilirlik sonuçları, 10 µg/kg ve 50 µg/kglık konsantrasyonlarda 6 gün yapılarak bulunmuştur. Bulunan değerlere tekrar üretilebilirlik kontrolü uygulamıştır. Elde edilen tüm veri setleri istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

4.5.4. ZON geri kazanım sonuçları

Geri kazanım ve doğruluk testi için farklı iki konsantrasyonda (10 µg/kg ve 50 µg/kg olacak şekilde), zearalenon ile zenginleştirilmiş blank pirinç ve mısır numuneleri kullanılarak paralelli 6 tekrar yapılmıştır. TGK performans kriterlerine göre 10 µg/kg için de 50 µg/kg için de %60-120'dir. Çalışmalar neticesinde mısır için ortalama geri kazanım oranı %92,10 pirinç ise %96,69 bulunmuştur. Bu değerler TGK performans kriterlerine göre uygundur.

4.5.5. ZON ölçüm belirsizliği

Zeralenon analizi verifikasyon çalışması yapılmış, bu çalışmalardan ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır. Geri kazanımdan gelen belirsizlik Tablo 4.27'de verilmiştir.

Tablo 4.27. Zearalenon analizi için geri kazanım çalışmalarından gelen belirsizlik

	Pirinç	Mısır
% Geri Kazanım	96,69	92,10
$U(x) = SD/\sqrt{n}$	0,9690	1,0836

Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda tekrarüretilebilirlikten gelen belirsizlik (RSDpool) formülü ile hesaplanmıştır. RSDpool değerleri Tablo 4.28'de gösterilmiştir.

Tablo 4.28. ZON analizi için tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik

	Pirinç	Mısır
RSDpool	0,0342	0,0538

Tekrarüretilebilirlik çalışmaları sonucunda tekrarüretilebilirlikten gelen belirsizlik (RSDpool) formülü ile hesaplanmıştır. RSD pool değerleri Tablo 4.29' de gösterilmiştir.

Tablo 4.29. ZON analizi için tekrarüretilebilirlikten gelen belirsizlik

	Pirinç	Mısır
RSDpool	0,0342	0,0538

Buna göre elde edilen belirsizlik değerleri aşağıda Tablo 4.30, Tablo 4.31'de verilmiştir.

Tablo 4.30. ZON pirinç için belirsizlik bileşenleri tablosu

Parametre	Değer (X)	u(X)	u(X)/X
Kalibrasyon	90,00	3,2074	0,0356
Gerçeklik (bias)	96,69	0,9690	0,0100
Tekrarlanabilirlik	1	0,0342	0,0342
Tekrarüretilebilirlik	1	0,0391	0,0391
Relatif birleşik belirsizlik			0,0638
*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik			0,1276

Tablo 4.31. ZON mısır için belirsizlik bileşenleri tablosu

Parametre	Değer (X)	u(X)	u(X)/X
Kalibrasyon	90,00	3,2074	0,0356
Gerçeklik (bias)	92,10	1,0836	0,0118
Tekrarlanabilirlik	1	0,0538	0,0538
Tekrarüretilebilirlik	1	0,0586	0,0586
Relatif birleşik belirsizlik			0,0880
*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik			0,1760

%95 güven aralığında genişletilmiş relatif belirsizlik pirinç için 0,1276, mısır için 0,1760 bulunmuştur.

Raporlama = X ± 018*X (k=2) %95 güven aralığında (X: Ölçüm sonucu)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çölyak hastaları glutensiz beslenmek zorundadır. Bu nedenle özellikle buğday, arpa, çavdar gibi gluten içeren besinler tüketememektedirler. Bu hastalar için ürünlerde çoğunlukla pirinç ve mısır veya karabuğday, keçi boynuzu unu, nohut unu gibi doğal glutensiz ürünler kullanılmaktadır.

Piyasadan rastgele yöntemle alınan 21 numunede toplam 84 mikotoksin analizi yapılmıştır. Glutensiz ürünler aflatoksin (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2), okratoksin A (OTA), deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZON) ve fumonisin (FB) mikotoksinleri yönünden incelenmiştir.

Aflatoksin, Okratoksin, Deoksinivalenol, Zeralenon, Fumonisin analizlerinin verifikasyon çalışmaları yapılmış, %95 güven aralığında ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır. Elde edilen LOD/LOQ, geri kazanım ve ölçüm belirsizliği değerleri Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Mikotoksinler LOD/LOQ, geri kazanım, ölçüm belirsizliği değerleri

Analiz adı	LOD (µg/kg)	LOQ (Hesaplanan) (µg/kg)	LOQ (Kabul edilen) (µg/kg)	Geri Kazanım %	Ölçüm Belirsizliği
Aflatoksin Toplam	0,40	1,32		93,47	X ± 0,13
Aflatoksin B1	0,21	0,69	1	96,47	X ± 0,17
Okratoksin A	0,09	0,29	0,5	92,01	X ± 0,11
Zeralenon	2,25	7,5	10	92,10	X ± 0,18
Deoksinivalenol	40,45	134,83	160	91,85	X ± 0,18

Okratoksin A analizi yapılan 21 adet tahıl ve tahıl içeren ürünlerin 1'inde değer tespit edilmiş ancak bu değerlerin Türk Gıda Kodeksi'ne göre uygun olduğu saptanmıştır. Deoksinivalenol analizi yapılan 21 üründen 1 ürünün Türk Gıda Kodeksi'ne uygun olmadığı saptanmıştır.

Aflatoksin ve zeralenon tespit edilebilir düzeyde bulunamamıştır. Elde edilen analiz sonuçları Tablo 5.2'de verilmiştir.

Tablo 5.2. Glutensiz ürünlerde Afla, OTA, ZON, DON analiz sonuçları

	Aflatoksin (µg/kg)	Okratoksin A (µg/kg)	Zeralenon (µg/kg)	Deoksinivalenol (µg/kg)	Türk Gıda Kodeksine Uygunluk
Makarna (mısır içerikli)	TEDB	TEDB	TEDB	2470	Uygun değil
Makarna (mısır içerikli)	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Erişte	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Karabuğdaylı un	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Mısır gevreği	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Tarhana	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Pirinç unu	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Mısır unu	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Bisküvi	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Kakaolu Bisküvi	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Bebe Bisküvi	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Susamlı Çubuk	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Damalı Kurabiye	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Kurabiye	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Kek Karışımı	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Ekmek	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Beyaz Dut Kurusu Unu	TEDB	1,99	TEDB	TEDB	Uygun
Keçiboynuzu Unu	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Nohut Unu	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Kestane Unu	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-
Hindistan Cevizi Unu	TEDB	TEDB	TEDB	TEDB	-

Glutensiz ürünlerde buğday yerine sıklıkla mısır ve pirinç kullanılmakta ve bu ürünlerden özellikle mısırın küf oluşturmaya oldukça yatkın olduğu bilinmektedir. Glutensiz ürünlerin raf ömrü oldukça kısa olduğundan küf oluşturmaya yatkındır. Sancho ve diğ.'nin 2012'de yaptığı çalışmada da görüldüğü gibi mısır bazlı ürünlerde toksine sıklıkla rastlanmıştır.

Cirlini ve diğ.'nin çalışmasına göre özellikle ZON, toplam 19 pozitif vaka ile çalışılan tüm denekler arasında en fazla saptanan mikotoksindir. Çölyak hastaları ve sağlıklı denekler üzerinde yapılan çalışmada ortak beslenmelerine göre toksinlerin etkilerinin her iki grupta da aynı olduğu mikotoksin oluşumunun sürekli denetim altında olması gerektiği bulunmuştur. Bununla beraber çölyak hastalarının özel olarak tükettiği gıdalarda bir aciliyet olmadığı görülmüştür.

Mikotoksinlerle ilgili çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen bu özel ürünlerle ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ülkemizde ise bu konuda çalışma bulunmamaktadır.

Yaptığımız çalışmadaki sonuçlar göz önüne alındığında, bu özel gıdalar çölyak hastaları için bir sağlık sorunu olmamalıdır. Ancak bizim çalıştığımız ürünlerden sadece birinin tebliğe uygun olmaması tüm glutensiz ürünlerin toksin içermediği anlamına gelmemektedir. Ürün yelpazesi genişletilerek glutensiz farklı ürünler, farklı toksinler farklı metotlar kullanılarak çalışılabilir. Toksin oluşumunu engellemek için kullanılan ürünlerin toksin oluşmasını tetikleyen etmenlere dikkat edilmesi, market raflarında saklama koşullarının sağlanması gerekmektedir

KAYNAKLAR

Açar Çetinkaya Ö., Kırış S., Diler F., Avcı A., *Pestisit Analizleri İçin Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Açıklamalı Uygulama Rehberi*, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, Nisan 2013.

Arendt E.K., Moroni A., Zannini E., Medical Nutrition Therapy: Use of Sourdough Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory for Delivering Functional Biomolecules and Food Ingredients in Gluten Free Bread, *Microbial Cell Factories*, 2011, **10** (Suppl 1): S15. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S15

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Method 991.31, 1994.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Method 2000.03, 2000.

Bennett J.W., Klich M., Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 2003,**16**(3), 497–516.

Brera C., Debegnach F., De Santis B., Di Ianni S., Gregori E., Neuhold S., Valitutti F., Exposure Assessment to Mycotoxins in Gluten-Free Diet for Celiac Patients, Food Chem, *Toxicol.*, 2014, **69**, 13-17

Caldas E.D., Silva A.C.S., Mycotoxins in Corn-Based Food Products Consumed in Brazil: An Exposure Assessment For Fumonisins, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 7974–7980.

Cardona T. D., Ilangantileke S. G., Noomhorm A., Aflatoxin Research on Grain in Asia – its Problems and Possible Solutions. Mycotoxin prevention and control in foodgrains, a collaborative publication of the UNDP/FAO Regional Network InterCountry Cooperation on Preharvest Technology and Quality Control of Foodgrains (REGNET) and the ASEAN Grain Postharvest Programme, *FAO Corporate Document Repository*, 2000. http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E00.htm

Carvajal-Moreno M., Mycotoxins That Affect The Human Cardiovascular System, *Biomolecular Research & Therapeutics*, 2015, **4** (2), 1-8.

Castillo M.A., Montes R., Navarro A., Segarra R., Cuesta G., Hernández E. Occurrence of Deoxynivalenol and Nivalenol in Spanish Corn-Based Food Products, *J. Food Compos. Anal.;* 2008, **21**, 423-427.

Charles R., Hurburgy J.R. Mycotoxins in The Grain Market, *October Page*, 1995, 26-33.

Cirlini M., Mazzeo, T., Roncoroni L., Lombardo V., Elli L., Bardella M.T., Agostoni C., Doneda L., Brighenti F., Dall'Asta C., Nicoletta Pellegrini, N., Are Treated Celiac

Patients at Risk for Mycotoxins? An Italian Case-Study, *Toxins,* 2017, **9**(1), 11.doi: 10.3390/toxins9010011

Concon J.M., Mold and Mycotoxin Contamination of Food Products. In: Food *Toxicology Part B: Contaminants and Additives,* Marcel Dekker Inc, New York, 677-770, 1988.

Council for Agricultural Science and Technology, USA Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems, *Task Force Report*, No. 139 January 2003.

Dalgıç B., Sari S., Baştürk B., Ensari A., Egritas O., Bukulmez A., Baris Z., Turkish Celiac Study Group. Prevalence of Celiac Disease in Healthy Turkish School Children, *Am J Gastroenterol,* 2011,**106**, 1512-1517.

De Boevre M., Jacxsens L., Lachat C., Eeckhout M., Di Mavungu J.D., Audenaert K., Maene P., Haesaert G., Kolsteren P., De Meulenaer B., Human Exposure To Mycotoxins and Their Masked Forms Through Cereal-Based Foods in Belgium, *Toxicol. Lett,* 2013, **218**, 281-292

De Ruyck K., De Boevre M., Huybrechts I., De Saeger S. Dietary Mycotoxins, Co-Exposure, and Carcinogenesis in Humans: Short Review, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.,* 2015, **766**, 32-41. doi: 10.1016/j.mrrev.2015.07.003.

Evren M., Aflatoksinlerin Etki Şekilleri, Gıdalarda Bulunma Durumları ve Önleme Çareleri, *O.M.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 199, **14** (2).

Galvano F., Pıva A., Ritıeni A., Galvano G., Dietary Strategies To Counteract The Effects Of Mycotoxins: A Revievv, *Journal of Food Protection,* 2001, **64** (1),120-131, 2001.

Gıdalarda Mikotoksin Limitleri İçin Numune Alma, Hazırlama ve Analiz Metodu Tebliği, 2018.

Go1db1att L.A., The Mycotoxin Problem. Cottonseed Proceeding Clinic, *New Or1earıs La' ı ARS*, 1965, **72-49**, Feb. 8-9, 3-11.

Gönül M., Boyacıoğlu D., Türkiye'de Aflatoksin Çalışmaları, *E.Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi,* 1985, **1**,127-135.

Groopman J.D., Kensler T.W., Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and Relationship to Cancer, *CRC Critical Review in Toxicology*, 1988, **19 (**2), 113-145.

GTHB, *Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi*, 2018.

Hayıt F., Gül H., Çölyak ve Çölyak Hastaları İçin Üretilen Ekmeklerin Kalite Özellikleri, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2017, **7**(1),163-169. 2017.

Hill I., Bhatnagar S., Cameron J., De Rosa S., Maki M.., Russell G, Troncone R., Celiac disease: Working Group Report of The First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2002, **35**, 78-88.

http://www.celiaccentral.org/Celiac-Disease/21 (Ziyaret tarihi:17 Haziran 2020).

https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/metabolizma-ve-colyak/ (Ziyaret tarihi: 5 Haziran 2020).

Josephs R.D., Krska R., Grasserbauer M., Broekaert J.A.C, Determination of Trichothecene Mycotoxins in Wheat By Use of Supercritical Fluid Extraction and High-Performance Liquid Chromatography With Diode Array Detection or Gas Chromatography With Electron Capture Detection, *J Chromatogr A*, 1998, **795**, 297-304.

Journal of Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International Mehtod, 2001, **84** (5).

Kabak B., Dobson A.D.W., Var I., Strategies To Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, **46**, 593-619.

Karaca H., Kuru İncirlerin Aflatoksin, Patulin, Ergosterol İçeriği ve Farklı Koşullarda Aflatoksinlerin Parçalanma Düzeyleri, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 2005, 167490

Kaya S., Yarsan E., Yem ve Yem Maddelerinde Küflenmenin Önlenmesi ve Mikotoksinlerle Kirletilmiş Bu Tür Yemlerin Değerlendirilmesine Yönelik Uygulamalar, *A.Ü. Vet. Fak. Dergisi*, 1995, **42** (2), 111-122.

Khoury A., Atoui A., Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status, *Toxins*, 2010, **2**, 461-493.

Kielstein P., Pilze Als Krankheitserreger Bei Mensch Und 20: 2649-2659. Tier. Editor: Weber H., Mikologie, A., *Gustav Fischer Verlag*, Jena-Stuttgart, 467-505, 1993.

Kobra® Cell, *Instruction Manual*, R-Biopharm Deoxynivalenol in Cereal Using Water Extraction, Ref No: P50, V13, 2015.

Köppen R., Koch M., Siegel D., S., Merkel S., Maul R., Nehls I., Determination of Mycotoxins In Foods: Current State of Analytical Methods and Limitations, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **86**(6), 1595-612. doi: 10.1007/s00253-010-2535-1

Lawrence J.F., Scott P.M., HPLC Methods For The Determination of Mycotoxins And Phycotoxins, *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants*, Chapter 10, 413, 1999.

Le Bars J., Facteurs De L'accumulation D'acide Pénicillique Dans Les Denrées D'origine Végétale, *Sci. Alim*., 1982, **2** (HS II), 29–33.

Lee H. J., Anderson Z., Ryu D., Gluten Contamination in Foods Labeled as "Gluten Free" in The United States, *J. Food Prot.,* 2014, **77**,1830-1833.

Mally A, Solfrizzo M., Degen G.H., Biomonitoring of The Mycotoxin Zearalenone: Current State-of-The Art and Application to Human Exposure Assessment, *Arch Toxicol,* 2016, **90**(6),1281-92. doi: 10.1007/s00204-016-1704-0.

Manning R.O., Wyatt R.D., Toxicity of Aspergillus Ochraceus Contaminated Wheat and Different Chemical Forms of Ochratoxin a in Broiler Chicks, *Poultry Science,* 1984, **63**(3), 458-654

Miller K., *Toksicologial Aspacts of Food. The British Industrial Biological Research Association,* El Sevier Applied Science, London and Newyork, 164-171, 1987.

Ominsk K.H., Marquard R.R., Sinha R.N., Abramson A., Ecological Aspects Of Growth and Mycotoxin Production By Storage Fungi, Editors: Miller J.D., Treuhohn H.L., *Mycotoxins in Grain Compounds Other Than Aflatoxin,* Eagan Press, St. Paul, MN., 287-312, 1994.

Osborne P., Dietary Exposure to Fumonisins and Evaluation of Nutrient intake in a Group of Adult Celiac Patients on a Gluten-Free Diet, *Molecular Nutrition Food Research,* 2012, **56**(4), 632-40.

Özkaya H., Özkaya B., *Öğütme Teknolojisi Kitabı*, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Ankara, 2005.

Özkaya Ş., Temiz A., Aflatoksinler: Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri ve Detoksifikasyonlar, *Orlab on-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2003, **1** (1), 1-21.

Özuğur G., Hayta M., Tahıl Esaslı Glutensiz Ürünlerin Besinsel ve Teknolojik Özelliklerinin İyileştirilmesi, *Gıda,* 2011, **36**, 287-294.

Sancho, G.C., Ramos, A.J., Marín, S., Sanchis, V., Presence and Co-Occurrence of Aflatoxins, Deoxynivalenol, Fumonisins and Zearalenone in Gluten-Free and Ethnic Foods, *Food Control*, 2012, **26** (2), 282-286.

Scussel V. M., *Micotoxinas em alimentos.* Insular, Florianópolis, 1998.

Smith J.E., Mycotoxins, Editors: Watson D.H., *Food Chemical Safety,* Crc Press, 234-255, 2001.

Soyöz M., Özçelik N., Okratoksin A'nın Toksik Etkileri ve Eliminasyonu, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2002, **22**(4), 421-427.

Steyn P.S., Stander M.A., Mycotoxins With Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisins, Editors: Ballantyne B., Marrs T.C., Syversen T.L.M., *General and Applied Toxicology,* 2nd ed., 1999.

Şahin T., Şehu A., Yemlerde Mikotoksinler ve Toksinleri Azaltma Yolları, *Türkiye Klinikleri Anim Nutr & Nutr Dis-Special Topics,* 2015, **1**(1), 54-65.

Thompson M., Ellison S.L.R., Wood R., The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, IUPAC Technical Report, *Pure Appl. Chem*., 2006, **78**(1), 145-196.

Tiryaki O., Seçer E., Temur C., Yemlerde Mikotoksin Oluşumu, Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri, *Anadolu, J. of AARI,* 2011, **21** (1) 44 -58.

TS 5822 ISO 5725-6, Ölçme Metotlarının ve Sonuçlarının Doğruluğu (Gerçeklik ve Kesinlik)-Bölüm 6: Doğruluk Değerlerinin Pratikte Kullanılması, 2003

Tunail N., *Funguslar ve Mikotoksinler Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları,* Genişletilmiş. 2. bs., Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Ankara, 2000.

Tuncer N., Ankara ve Çevresinde Üretilen Yumurta Örneklerinde Aflatoksin Rezidülerinin Araştırılması, *Etlik Vet. Mikrobiyoloji Dergisi*, 1987, **6** (1).

Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 2011. https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8.htm (Ziyaret tarihi:10 Haziran 2020).

Türk Gıda Kodeksi Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği, Tebliğ No: 2018/10, 2018.

Vidyasagar T., Sujatha N., Sashidhar R.B., Determination of Aflatoxin B1-DNA Adduct in Rat Liver By Enzyme Immunoassay, *Analyst*, 1997, **122**, 609-613.

WHO, Mycotoxins, 2018. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins (Ziyaret tarihi: 5 Haziran 2020).

Yılmaz Y., Doğan I. S., Glutensiz Ekmek Karışımların Kalite ve Bileşenler Yönünden Değerlendirilmesi, *Gıda,* 2015, **40**, 335-342.

Zinedine A., Manes J., Occurrence Andlegislation of Mycotoxins in Food and Feed Morocco, *Food Control*, 2009, **20**, 334-344.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Karayünlü Bozbaş S., **Değirmen Z.,** Glutensiz Bazı Paketli Ürünlerde Mikotoksin Varlığının Araştırılması, *Uluslararası Marmara Fen Bilimleri Kongresi,* IMASCON, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, 19-20 Haziran 2020.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep DEĞİRMEN, ilk öğrenimini Öğretmen Yusuf Ziya İlkokulu'nda okudu. Edirne Anadolu Lisesi'nde 1 yıl İngilizce hazırlık okudu. Orta ve lise öğrenimini Yalova Lisesi'nde tamamladıktan sonra 1995 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 1999 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2004 yılında başladığı Tarım ve Orman Bakanlığı bünyesinde halen kimyager olarak çalışmakta. 2013 yılında Kocaeli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Jeoloji Mühendisliği'ne başladı. 2017 yılında Kocaeli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Jeoloji Mühendisliği'nden mezun oldu. 2017 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde yüksek lisansa başladı. Lisansüstü eğitime devam etmektedir.