T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MISIR İRMİĞİNDEN İMAL CİPSLERDE LİKİT KROMATOGRAFİ/KÜTLE SPEKTROMATOGRAFİSİ YÖNTEMİ İLE MİKOTOKSİNLERİN ARAŞTIRILMASI

OKTAY SAMADZADE

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SERKAN KEMAL BÜYÜKÜNAL

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Oktay SAMADZADE

(İmza)

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tezinin başarıyla sonuçlanmasında, ayrıca akademik kariyerimde ilerleyebilmem adına büyük katkısı olan sayın hocam Doç. Dr. Serkan Kemal BÜYÜKÜNAL`a, bu süreçte manevi desteklerini hiç bir zaman eksik etmeyen babam Abbas SAMADZADE`ye annem Melahet SAMADZADE`ye, kardeşim Orxan SAMADZADE ‘ye teşekkür ederim. Tezin sonuçlanması için teknik ve diğer konularda desteklerini esirgemeyen Leman MEHDİYEVA ve Elnar MAMMADOV`a sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-35812

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI 2
BEYAN 3
İTHAF 4
TEŞEKKÜR 5
İÇİNDEKİLER 6
TABLOLAR LİSTESİ 8
ŞEKİLLER LİSTESİ 9
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ 9
ÖZET 10
ABSTRACT 11
1. GİRİŞ VE AMAÇ 12
2. GENEL BİLGİLER 16
2.1. Mısırın Bitkisinin Tarihsel Gelişimi ve Üretim İstatistikleri 16
2.2. Mısırın Gıda Olarak Tüketim Çeşitleri 17
2.3. Mısır Cipsi Kaynaklı Tehlikeler 18
2.3.1. Fiziksel Tehlikeler 18
2.3.2. Kimyasal Tehlikeler 19
2.3.3. Biyolojik Tehlikeler 19
2.4. Mikotoksinler 20
2.4.1. Aflatoksin 23
2.4.2. Okratoksin 23
2.4.3. Fumonisin 25
2.4.4. Zearalenon 26
2.4.5. Sitrinin 27
2.4.6. Trikotesenler 27
2.5. Mikotoksinlerin Yasal Limitleri 29
2.6. Mikotoksinlerin Belirlenmesi 30
2.6.1. Örnekleme ve ekstraksiyon teknikleri 31
2.6.2. Ayırma ve algılama teknikleri 39

3. GEREÇ VE YÖNTEM 52
3.1. Mısır İrmiğinden İmal Cipslerin Temini 52
3.2. UV ile Vizüel Muayene 52
3.3. LC/MS-MS Yöntemi ile Mikotoksin Analizi 52
3.3.1. Kullanılan Alet Ekipman 53
3.3.2. Kullanılan Kimyasallar 53
3.3.3. Örneklerin Hazırlanması 53
3.3.4. Örneklerin Ekstraksiyonu 54
3.3.5. LC/MS-MS Analiz 54
3.3.6. Hesaplama 55
4. BULGULAR 56
4.1. Mısır İrmiğinden İmal Cipslerin UV ile Vizüel Muayene Sonuçları 56
4.2. LC-MS/MS'de Kullanılan Yöntemin Geri Kazanım Çalışmaları 56
4.3. Kalibrasyon Eğrileri 56
4.4. Mikotoksin Analiz Sonuçları 61
5. TARTIŞMA 64
KAYNAKLAR 69
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 79
ÖZGEÇMİŞ 80

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Mısır cipslerindeki bazı metallerin miktarı mg/kg 19
Tablo 2. Farklı ülkelerde mısır cipslerindeki bazı ağır metallerin (mg/kg) ortalaması ..19
Tablo 3. Mikotoksinlerin insan sağlığı risk düzeylerine göre gruplandırılması. 22
Tablo 4. TGK Bulaşanlar Yönetmeliği'nde mısır irmiğinden imal cipslerde belirlenen maksimum mikotoksin limitleri..... 29
Tablo 5. Mikotoksinlerin belirlenmesi için kullanılan yaygın teknikler. 49
Tablo 6. Gradient Akış Programı..... 54
Tablo 7. MS-MS İyon geçişleri 55
Tablo 8.Tahıl ve tahıl içerikli ürünlerde multitoksin analizinde geri kazanım sonuçları56
Tablo 9. Mikotoksin tespit edilen örneklerin değerleri..... 61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Mısırın Tarihsel Gelişimi..... 16
Şekil 2. OTA ve dört F'nin kimyasal yapıları ve CAS numaraları 24
Şekil 3. Fusarium mikotoksinlerinin kimyasal yapıları ve CAS numaraları. 26
Şekil 4. Tahıl örneklerinde SLE için örnek prosedür adımlarının gösterimi. 34
Şekil 5. SPE prosedürünün şematik protokolü 38
Şekil 6. Aflatoksin B1 kalibrasyon eğrisi 57
Şekil 7. Aflatoksin B2 kalibrasyon eğrisi 57
Şekil 8. Aflatoksin G1 kalibrasyon eğrisi 57
Şekil 9. Aflatoksin G2 kalibrasyon eğrisi 58
Şekil 10. Okrataoksin A kalibrasyon eğrisi 58
Şekil 11. Zearalenon kalibrasyon eğrisi 58
Şekil 12. Deoksinivalenol kalibrasyon eğrisi 59
Şekil 13. Fumonisin B1 kalibrasyon eğrisi 59
Şekil 14. Fumonisin B2 kalibrasyon eğrisi 59
Şekil 15. HT 2 Toksin kalibrasyon eğrisi 60
Şekil 16. T 2 Toksin kalibrasyon eğrisi 60
Şekil 17. Sitrinin toksini kalibrasyon eğrisi 60
Şekil 18. Pozitif bir örnekte AFB1 kromotogramı ..... .62
Şekil 19. Pozitif bir örnekte Fumonisin B1ve B2 kromotogramı 63

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AF	Aflatoksin
AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFG1	Aflatoksin G1
AFG2	Aflatoksin G2
CIT	Citrinin
DON	Deoxynivalenol
FB	Fumunisin
FB1	Fumonisin B1
FB2	Fumonisin B2
HT-2	HT-2 toksin
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
LOD (Limit of detection)	Tespit limiti
LOQ (Limit of quantification)	Miktar sınırı
OTA	Okratoksin
T-2	T-2 toksin
ZEA	Zearalenon

ÖZET

Samadzade, O. (2022). Mısır İrmiğinden İmal Cipslerde Likit Kromatografi/Kütle Spektromatografisi Yöntemi ile Mikotoksinlerin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi AbD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Yasal merci tarafından yıllık denetim planlarında düşük risk grubunda değerlendirildiği için seyrek olarak numune alınıp, seyrek olarak analize tabi tutulan mısır irmiği cipsleri ihtiva etmeleri muhtemel mikotoksinler (küf toksinleri) açısından oldukça riskli ürünlerdir. Özellikle çocuklar tarafından sıklıkla ve yoğun olarak tüketilen ve pandemi döneminde de tüketim miktarları artan bu ürünlerin uzun vadede oluşturacağı sağlık risklerinin öngörülebilmesi ve gerekli önlemlerin alınabilmesi önem arz etmektedir. Son yıllarda mikotoksin analizi konusundaki en büyük gelişme, HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografi)'nin dedektör olarak kütle spektrometresi (MS) ile birlikte kullanımı olmuştur. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) veya atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) ara yüzlerini kullanan LC-MS/MS analiz yöntemi, kolaylığı, yüksek hassasiyeti ve doğruluğu nedeniyle örneklerimizde Aflatoksin B1, Toplam Aflatoksin (B1+B2+G1+G2), Okratoksin A (OTA), Zeralenon (ZEA), Deoksinivalenol (DON), Fumonisin B1 (FB1), Fumonisin B2 (FB2), Sitrinin (CIT), HT-2 ve T-2 mikotoksin analizleri için kullanılmıştır. Örnek olarak toplanan 100 mısır irmiği cipsinden 3 örnekte Aflatoksin B1 ve toplam Aflatoksin (B1+B2+G1+G2) ve 2 örnekte Fumonisin FB1, Fumonisin FB2 tespit edilmiştir. 3 örnekte tespit edilen Aflatoksin B1 ve toplam Aflatoksin (B1+B2+G1+G2) değerlerinin "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği"nde belirlenen limitleri aştığı tespit edilmiştir. Hiçbir örnekte OTA, ZEA, Sitrinin, HT-2 ve T-2 mikotoksinleri tespit edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Atıştırmalıklar, Gıda Güvenliği, Mikotoksin, Mısır Cipsi, Mısır İrmiği, LC/MS-MS

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-35812

ABSTRACT

Samadzade, O. (2022). Investigation of Mycotoxins with Liquid Chromatography/Mass Spectromatography Method in Chips Made from Corn Semolina. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Food Hygiene and Technology. Master Thesis. İstanbul.

Since they are evaluated in the low risk group in the annual inspection plans by the legal authority, corn semolina chips, which are sparsely sampled and analyzed sparsely, are very risky products in terms of mycotoxins (mold toxins) likely to contain. It is important to foresee the long-term health risks of these products, which are consumed frequently and intensely by children, and whose consumption increases during the pandemic period, and to take the necessary precautions. The greatest development in mycotoxin analysis in recent years has been the use of HPLC (high pressure liquid chromatography) as a detector, together with mass spectrometry (MS). LC-MS/MS analysis method using electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interfaces, in our samples Aflatoxin B1, Total Aflatoxin (B1+B2+G1+G2), Ochratoxin A (OTA), Zeralenone (ZEA), Deoxynivalenol (DON), Fumonisin B1 (FB1), Fumonisin B2 (FB2), Citrine (CIT), HT-2 and T-2 were used for mycotoxin analysis. Aflatoxin B1 and total Aflatoxin (B1+B2+G1+G2) were detected in 3 samples and Fumonisin FB1, Fumonisin FB2 were detected in 2 samples from 100 corn semolina chips collected as samples. It was determined that Aflatoxin B1 and total Aflatoxin (B1+B2+G1+G2) values detected in 3 samples exceeded the limits determined in the "Turkish Food Codex Contaminants Regulation". OTA, ZEA, Citrine, HT-2 and T-2 mycotoxins could not be detected in any of the samples.

Keywords: Snacks, Food Safety, Mycotoxin, Corn Chips, Corn Semolina, LC/MS-MS

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpaşa. Project No. TYL-2021-35812

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hububat grubu ürünler dünyada stratejik önemi en yüksek olan ürünler olup ilk çağlardan itibaren ekimi yapılarak üretilen gıda grubudur. Beslenme açısından en önemli bitkisel ürünler arasında yer alan hububat kapsamında buğday, mısır, pirinç, arpa, yulaf, çavdar, darı gibi ürünler bulunmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre 2014 yılı dünya hububat üretimi 2 milyar 800 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (T.C. Ekonomi Bakanlığı, 2017). Mısır, hububat ürünleri içerisinde ekim alanı bakımından dünya sıralamasında ikinci, üretim ve verimde ise 1,021 milyar ton ile ilk sırada yer almaktadır. Son yıllarda ülkemiz hububat sektöründe en önemli üretim artışları mısır üretiminde gerçekleşmiştir. Üretimi artırıcı tedbirler sayesinde mısır üretimimiz 2015 yılında 6,4 milyon ton düzeyine ulaşmıştır. 2019/2020 sezonunda ise mısır üretimimiz 6 milyon ton düzeyinde gerçekleşmiştir (TMO, 2020).

Beslenmede taşıdığı büyük önem nedeniyle dünyanın en stratejik ürün grubunu oluşturan hububatlar, dış ticarette ülkemiz için büyük önem taşımaktadır. Dünyada hububattan üretilen mamul maddelere ilişkin alıcı ülkelerin tercih ve talepleri doğrultusunda ise, ülkemiz Dâhilde İşleme Rejimi marifetiyle buğday, mısır ve çeltik ithalatı yapabilmektedir. Son yıllarda ülkemiz hububat ithalatı önemli ölçüde artmıştır. Ancak hububat ürünlerinin büyük bir kısmı Dâhilde İşleme Rejimi (DİR) kapsamında ithal edildikten sonra işlenerek ihraç edilmektedir. 2015 yılında yaklaşık 1,7 milyar dolarlık hububat ithalatımızın 344 milyon dolarlık kısmı mısırdan oluşmaktadır. Bu meblağ 1,1 milyar dolarlık buğday ithalatından sonra ikinci sırada yer almaktadır (T.C. Ekonomi Bakanlığı, 2017).

Mısır, hasat veya ithalat sonrası depolama işlemlerinin doğru şekilde yapılması gereken bir üründür. Dünya çapında insan sağlığı ve gıda güvenliği açısından büyük tehdit oluşturan mikotoksinler Tükiye'de de ciddi sağlık sorunlarına ve ürün kayıplarına yol açmaktadır. Özellikle de kökeni ve üretim prosesleri açısından yüksek oranda küf barındırabilecek tipteki hasarlı, bereli, kırık mısır daneleri mikotoksin içerikleri açısından önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Oldukça iyi tanımlanmış yaygın mikotoksijenik funguslar olan *Aspergillus, Penicillium* ve *Fusarium* genuslarına ait olan türler sadece gıda tüketimi ile değil aynı zamanda, hasat, gıda işleme ve depolama sürecinde meyadan gelen kontaminasyonlarla alerjik ve toksijenik reaksiyonlara da sebep olarak birçok problemlere yol açmaktadır (Büyükünal ve Persil Özkan, 2017). Tarımsal uygulamalarda

yapılan hatalar ve hasat sonrası uygun olmayan depolama koşullarında muhafaza mikotoksin oluşumundan sorumlu küf mantarı üremelerinin en önemli sebepleri olarak gösterilmektedir. Modern tarımsal uygulamalar, gıdaların üretim, işleme, depolama ve pazarlama proseslerindeki kanuni düzenlemeler dahi riskin tamamen bertaraf edilmesini sağlayamamıştır. Gıda güvenliği ile ilgili alınan tüm tedbirlere rağmen WHO mikotoksinlerin ve küflerin toksik metabolitlerinin gıdalarda düşme eğilimi göstermediğini rapor etmiştir. Mikotoksinlerin kanserojenik değişimlere neden olduğu, nefrotoksik ve hepatotoksik etkilerinin yanı sıra çok sayıda solunum sistemi ve sinir sistemi bozukluklarının etiyolojisinde önemli rol oynadığı ortaya koyulmuştur (WHO, 2002; De Ruycka, 2015; Büyükünal ve Persil Özkan, 2017).

"Hububat, Baklagiller ve Yağlı Tohumlar Lisanslı Depo Yönetmeliği" 2005 yılında faaliyete girmiştir ve 2013 yılında son halini almıştır. Bahsi geçen ürünlerin sıhhi bir şekilde depolanmasının önemine binaen hazırlanan bu yönetmelik ürünlerin doğrudan depolanması ve standartlara uygun hale getirildikten sonra depolanması için hazırlanmıştır. "Depolama şartları uygun olmayan, sağlığı olumsuz etkileyecek düzeyde bulunan, standart dışı olan ve mevzuatta öngörülen diğer hususlara uygun olmayan ürünler, lisanslı depolara alınmaz" şeklinde bir ibare içerir (T.C. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı, 2005; T.C Ticaret Bakanlığı, 2013). Yasal mevzuat bu şekilde olmasına rağmen uygulamada yapılan hatalar ve kontamine ürünlerin depoya sokulması sonrası depolarda gerekli dekontaminasyon önlemleri alınmadan depoya alınan diğer ürünlere de küf kontaminasyonu olabilmesi riski canlı tutmaktadır (Büyükünal ve Persil Özkan, 2017).

Hububatlar farklı tüketim şekilleri ile karşımıza çıkmaktadır. Bu tüketim şekillerinden biri de atıştırmalık ürünlerdir. Pandemi sürecinde atıştırmalık ürünler tüketimi Ipsos Hane Tüketim Paneli dijital hanelerinden akan kayıtlara göre Sağlık Bakanlığı'nın pandemi açıklamasından sonraki ikinci haftada en çok büyüyen üçüncü kategori olmuştur. Atıştırmalık alt kategorisindeki cipsler içindeki en büyük gruplar ise patates ve mısır cipsleridir (McCarthy, 2001; Uğur, 2019; Marketing Türkiye, 2020). Mısır cipsi; mısırın tekniğine göre pişirilip içme suyu ilavesi ile hamur haline getirilmesi ve muhtelif şekiller verildikten sonra yemeklik özellikteki yağ ile kızartılması sonucu elde edilen, gerektiğinde tuz, katkı ve çeşni maddelerinden bir veya birkaçı katılmış olan mamuldür. Mısır cipslerinde çeşni maddesi olarak, çeşitli sebzeler, et, süt, biber, peynir,

baharat ve benzeri maddeler veya bunların aromatik özleri kullanılmaktadır. Mısır cipsleri çeşni maddesi ihtiva edip etmediğine göre sade, peynirli, baharatlı, aromalı, sebzeli, etli gibi çeşitlere ayrılmaktadır. Diğer çeşitler, çeşni maddesi ile aynı adı taşımaktadır (TS, 1996). Mısır cipslerinde istenen tekstür ve lezzeti oluşturmak için mısır danelerinin yanı sıra selüloz, protein, aroma verici maddeler gibi hammaddelerden de faydalanılmakta, bu hammaddeler; tekstür iyileştirmek ve ürünün lezzetini arttırmak için az miktarda formülasyona eklenmektedir (Didin ve ark., 1999).

İstatistik verilere baktığımızda Türkiye'de kişi başına yıllık cips tüketimi 300 g. olarak belirtilmiştir. Dünya ve ülkemizde ağırlıklı olarak genç nüfus tarafından tercih edilen çerez tipi gıdalar arasında patates ve mısır cipsleri ilk sırada yer almaktadır (McCarthy, 2001; Uğur, 2019;). Gıda güvenliği açısından tahıl ürünlerinde karşılaştığımız önemli sorunlardan biri olan küf intoksikasyonları *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* cinsine ait funguslar tarafından üretilen aflatoksinler, okratoksin A, deoksinivalenol (DON veya vomitoksin), zearalenon (ZEA) ve fumonisinlerdir (Büyükünal ve Persil Özkan, 2017).

Küfler ve mikotoksinler tahıllarda heterojen dağılım gösterdiğinden örnekleme ve homojenizasyon işlemleri mikotoksin analizlerinde büyük önem taşımaktadır. Örnekleme ve homojenizasyon işlemlerinde gereken özenin gösterilmemesi analiz sonuçlarının hububat numunelerini temsil etmemesine neden olabilir. Analizler için öncelikle örnekler iyi bir şekilde homojenize edilir. Ardından ekstraksiyon ve ekstraktın içinden toksinin saflaştırılması basamakları gelir (Köppen ve ark., 2010). Ekstraksiyonda mikotoksinin fizikokimyasal özellikleri ve çözünürlüğüne, örnek matrisine ve sonrasında kullanılacak olan saflaştırma yöntemine bağlı olarak değişik çözücüler-çözücü karışımları kullanılabilir (Krska ve ark., 2001; Krska ve ark., 2008; Turner ve ark., 2009). Ekstraksiyon safhasında analiz edilmek istenen toksinle beraber ekstrakte olan gıda bileşenleri, bulaşanlar ve kalıntılar kromatografik analizde toksinin tespitini zorlaştırmakta ve tespit sınırının (LOD) yükselmesine neden olmaktadır. Bu nedenle sıvı-sıvı ayırması, katı-faz ekstraksiyonu (solid-phase extraction, SPE), jel permeasyon kromatografisi veya immünoafinite (IMA) kromatografisi gibi teknikler kullanılarak ham ekstraktların saflaştırılması gerekmektedir (Köppen et al., 2010). Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yönteminde ile aynı anda çok sayıda toksinin analiz

edilebilmesi için daha az spesifik olan C18 kolonlar ile saflaştırma yapılmaktadır (Krska ve ark., 2007; Cigić ve Prosen, 2009).

HPLC teknikleri gıda matrislerinde mikotoksin analizi için uzun zamandır en önemli yöntem olarak kabul edilmekte ve çok yaygın şekilde kullanılmaktadır (Köppen et al., 2010). Son yıllarda mikotoksin analizi konusundaki en büyük gelişme, HPLC'nin dedektör olarak kütle spektrometresi (MS) ile birlikte kullanımı olmuştur. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) veya atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) arayüzlerini kullanan HPLC-MS/MS teknikleri, kolaylığı, yüksek hassasiyeti ve doğruluğu nedeniyle en çok tercih edilen yöntemler haline gelmiştir. Bu yöntemlerle kompleks matrislerde, farklı kimyasal gruplara dahil toksinlerin analizi aynı anda ve türevlendirmeye gerek kalmadan yapılabilmektedir. Örneklerde risk tanımlaması yapılabilmesi için LC-MS/MS bu özellikleri ile en uygun analiz metotlarından biri olarak düşünülmektedir. (Köppen ve ark., 2010).

Mısır cipsi matrisinde yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalardan ancak birkaçı örneklem grubunu doğrudan mısır cipslerinden oluşturmuştur. Doğrudan mısır irmiğinden yapılan cipsslerde multitoksin analizine dair yeterli bir çalışma ise bulunamamıştır.

Atıştırmalık olarak tüketilen uluslararası ve ulusal iştiraklerin imal ettiği mısır irmiği cipslerinin mikotoksin içeriklerinin tespiti amaçlanmıştır. Denetim mekanizmaları tarafından düşük risk grubunda değerlendirildiği için seyrek olarak analize tabi tutulan mısır irmiği cipsleri ihtiva etmeleri muhtemel küf toksinleri açısından oldukça riskli ürünlerdir. Çalışmamız özellikle çocuklar tarafından sıklıkla ve yoğun olarak tüketilen ve pandemi döneminde de tüketim miktarları artan bu ürünlerin uzun vadede oluşturacağı sağlık risklerinin öngörülebilmesi ve gerekli önlemlerin alınabilmesi açısından önem arz etmektedir.

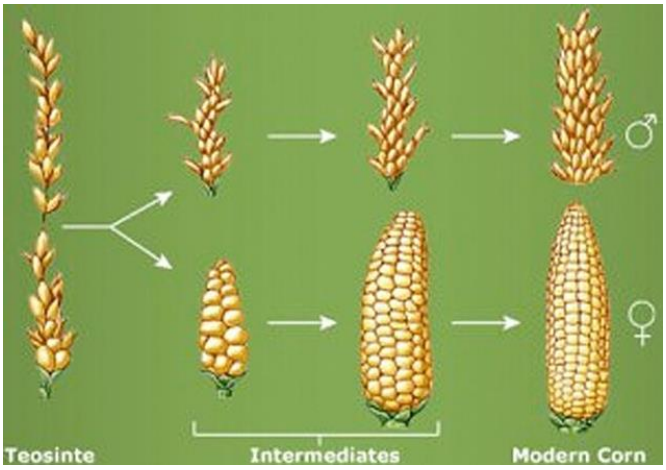
Bu çalışmada, uluslararası, ulusal ve yerel iştiraklerin imal ettiği mısır irmiğinden imal edilmiş olan cipslerde likit kromatografi/tandem kütle spektromatografisi (LC-MS/MS) yöntemi ile mikotoksinlerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarının mısır irmiğinden imal edilen cipslerdeki mikotoksinlerin tespitine yönelik literatüre yeni bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mısırın Bitkisinin Tarihsel Gelişimi ve Üretim İstatistikleri

Mısır, binlerce yıldır yetiştirilen birkaç bitkiden biridir. Anavatanı Amerika kıtasıdır ve oradan dünyaya yayıldığı bilinmektedir. ABD'nin New Mexico eyaletindeki kaya sığınakları ve mağaralarda bulunan mısır taneleri ve mısır koçanı parçalarının arkeolojik kazılar sırasında yaklaşık 5000 yaşında olduğu tahmin edilmektedir. Mısır poleni ise 1954 yılında ülkenin başkenti Mexico City'de yapılan arkeolojik kazılarda yerin 50-60 metre derinliğinde keşfedilmiş, yaklaşık 7000 yaşında olduğu değerlendirilmiştir (Matsuoka ve ark., 2002; Piperno, 2011; Pagán-Jiménez ve ark., 2016).

Çoğu bilim adamı, mısırın Orta Meksika'da ortaya çıktığını ve 7.000-9.000 yıl önce teosinte adı verilen yabani bir ottan evcilleştirildiğini kabul etmektedir. Teosinte, özellikle daha küçük, daha az ve daha fazla aralıklı çekirdeklere sahip olması nedeniyle modern mısır görünümüne sahip değildi. 9 bin yıllık tarihe sahip olan mısırdan günümüzde artık yüzlerce farklı tatta ondan fazla atıştırmalık üretiliyor. Bu atıştırmalıklardan en yaygın olanıysa mısır cipsi ve patlamış mısırlardır. Türkiye'de de sevilerek tüketilen mısır atıştırmalıklarına bazı bisküvi, tako gibi ürünlerde dahil edilebilir. Mısır cipsi, yağda kızartılmış veya fırınlanmış, genellikle küçük bir erişte veya kepçe şeklinde olan, mısır unundan yapılan atıştırmalık yiyeceklerdir (Piperno, 2011; T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2013).



Şekil 1. Mısırın Tarihsel Gelişimi
(https://www.brightmaize.com)

Buğday ve pirinçten sonra mısır, gezegende en çok yetiştirilen tahıl mahsulüdür. Mısır ekimi dünya çapında 70 milyon tarım hanesi tarafından uygulanmaktadır ve bunların %80'den fazlası az gelişmiş ülkelerde yaşamaktadır. 147.145.702 hektarlık ekili alanı ile 2004 yılı FAO istatistiklerine göre buğday ve pirinçten sonra dünyada en çok ekilen üçüncü bitkidir. Aynı verilere göre toplam 724.515.133 ton üretim ile buğday ve çeltikten sonra ilk sırada yer almaktadır. Ayrıca dekara 492,4 kg verim ile tahıllar arasında en fazla verime sahip bitkidir. ABD tek başına dünya mısırının yüzde 40-45'ini üretmektedir (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2013; TMO, 2019).

İnsan beslenmesi, hayvan yemi ve diğer sanayi alanlarında hammadde olarak kullanılabildiğinden, birçok ulusun tarımsal ürün modelinde kolayca yer bulabilir. Dünya mısırının yüzde 65-70'i hayvan yemi olarak kullanılırken, %20'si doğrudan insanlar tarafından tüketilmektedir. Geriye kalan %10'luk kısım ise farklı sanayi kollarına hammadde olmaktadır (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2013; TMO, 2019; TMO, 2020).

Ülkemizde hububatlar arasında buğday ve arpa tarımından sonra üçüncü sırada yer alan mısır ekimine ayrılan alan, FAO'nun 2004 yılı tahminlerine göre 700.000 hektar olup, toplam üretim 3.000.000 tondur. Dekara verimimiz 428,6 kg'dır. Bu veriler küresel ekim ve üretim rakamlarıyla karşılaştırıldığında, Türkiye'nin ekim ve üretim hacmi açısından dünya mısır tarımının binde 4'lük bir kısmına sahip olduğu görülmektedir (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2013).

Mısır, ülkenin hemen hemen her yerinde yetiştirilebilir, ancak çoğunlukla Karadeniz bölgesinde yetiştirilir. 300.000-350.000 hektar ekili alana sahip olan bu bölge, ülkemizin toplam mısır ekim alanlarının yaklaşık yüzde 60-65'ini oluşturmaktadır. Ancak bu alandaki ortalama verim 220-230 kg/da'dır. Akdeniz bölgemizde ise tipik verim yaklaşık 700-800 kg/da'dır. Bu bölgenin mısıra ayrılmış tarım alanları 140.000–150.000 hektar olmasına rağmen toplam mısır üretimimizin yüzde 45'ini üretmektedir (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2013; TMO, 2019; TMO, 2020).

2.2. Mısırın Gıda Olarak Tüketim Çeşitleri

Türkiye'de at dişi mısırı, tahıl ve hayvan yemi olarak silajlık şeklinde ekilmektedir. Sert mısır en çok Karadeniz Bölgesi'nde yetiştirilmekte olup, yöresel yemek tarifleri ve mısır ekmeği yapımında kullanılmaktadır. İnsan diyeti olarak mısır tüketimi son yıllarda artış göstermiş olup, kişi başı tüketim yıla bağlı olarak 13 ile 21 kg arasında değişmektedir

(TMMOB, 2020). Sıcaklık uygulaması ile patlatılarak hazırlanan cin mısırı, taze kaynatılıp tüketilen ya da dondurularak garnitür hazırlamada kullanılan tatlı mısır diğer tüketim şekillerine örnek olarak gösterilebilir. Konserve veya dondurulmuş granül tatlı mısırın çeşitli soslarla bir bardakta sıcak olarak servis edilerek tüketimi güncel mısır kullanımlarına örnek oluşturmaktadır. Közde mısır, cips ve diğer atıştırmalıkların da yapılması için kullanılan mısır unu, mısır irmiği, dünyada en çok tüketilen yağ çeşitlerinden olan mısır yağı mısırın önemli tüketim şekillerindendir. Kavrulmuş mısırın güçlü aromasına ve tadına sahip olan genellikle yoğun bir şekilde tuzla tatlandırılan mısır cipsleri gıda olarak mısırın ekonomik anlamda en yüksek değerlendirilme şekillerindendir. Mısır cipsleri ve tortilla cipslerinin her ikisi de mısırdan yapılırken, tortilla cipslerindeki mısır, daha hafif bir tat, aroma ve daha az sert bir doku oluşumu ile sonuçlanan nikstamalizasyon işlemine tabi tutulur. Tortilla cipsleri ayrıca daha büyük, daha ince olma eğilimindedir. Mısır çerezleri, yüksek basınç ve sıcaklık koşulları altında nemlendirilmiş mısır unundan veya irmiğinden ekstrüde edilerek üretilir. Hamurun hazırlanması, bileme, pişirme ve soğutma, kızartma ve baharat ilave etme, soğutma ve paketleme aşamlarından sonra tüketime sunulurlar (Saldivar, 2016; Siebert, 2017).

2.3. Mısır Cipsi Kaynaklı Tehlikeler

Mısır cipsleri de diğer atıştırmalıklar gibi standartlarının altında üretilmesi halinde bir çok tehlikeleri barındırmaktadır. İnsanlarda sağlık risklerine neden olma potansiyeline sahip çevresel kirleticiler, bulaşanlar, kalıntılar bu tür ürünler için insanlar tarafından aşırı tüketim sonucunda ortaya çıkan tehlikelerdir . Bu risk unsurları daha az tüketim durumlarında düşük konsantrasyonlarda akümülasyona neden olarak insan vücudu üzerindeki toksik etkileri oluşabilmesi nedeniyle büyük endişe kaynağı olarak değerlendirilebilmektedir (Fox ve Banner, 1983).

2.3.1. Fiziksel Tehlikeler

Mısır cipslerindeki fiziksel tehlikeler hasat ve depolama sırasında mısır ve ürünlerine karışan, üretim aşamasında ise dikkat edilmeyen ya da öngörülemeyen kontrol noktalarından son ürünlere bulaşan taş, toptak, ağaç, metal, cam cisimlerden oluşmaktadır. Bu risklerin öngörülmesi ve tehlikelere dönüşmemesi için amaca uygun dedektörler ile donatılmış hatlarda kontrol ve uyarı prosedürlerinin oluşturulması amacıyla kalite yönetimi standartlarının iyice takip edilmesi ve uygulanması gerekmektedir (Fox ve Banner, 1983; Hawra Wahab ve Khadim, 2014).

2.3.2. Kimyasal Tehlikeler

Ağır metaller vücut tarafından detoksifiye edilmediğinde toksik hale gelir ve yumuşak dokularda ve kısmende kemikler ve kıkırdak dokuda birikerek insan vücuduna zarar verebilir. Temas ettiğinde su, hava veya deri yoluyla emilim yoluyla insan vücuduna girebilir. Pestisit, herbisit, insektisit kalıntıları, poliklorlu bifeniller, çeşitli zararlı hidrokarbon bileşikleri ve üretim aşamasında oluşan akrilamidler önemli risk unsurları olarak değerlendirilmektedir (Fox ve Banner, 1983; Hawra Wahab ve Khadim, 2014; Qasem, 2014)

Tablo 1. Mısır cipslerindeki bazı metallerin miktarı mg/kg (Hawra Wahab ve Khadim, 2014).

Marka	**Na**	**K**	**Ca**	**Fe**	**Pb**	**Cd**
Bocher	5200	1750	675	1.64	8.76	0.23
Basat	5500	2500	685	1.54	6.72	0.63
Ortalama	5350	2125	680	1.59	7.73	0.43

Tablo 2. Farklı ülkelerde mısır cipslerindeki bazı ağır metallerin (mg/kg) ortalaması (Hawra Wahab ve Khadim, 2014).

Ülke	**Fe**	**Pb**	**Cd**
Süudi Arabistan	6.05	5.34	0.21
Küveyt	6.05	5.32	0.21
Türkiye	10.37	1.42	0.14

2.3.3. Biyolojik Tehlikeler

Bakteri, virüs, mantar vb. insan ve canlılar için tehlike oluşturan herhangi bir canlı organizmanın neden olduğu kirlilikler biyolojik tehlikeler olarak tasnif edilir. Bakteriler

ve mantarlar doğrudan veya dolaylı yoldan alerji dahil solunum yolu, sindirim sistemi, sinir sistemi , kan sistemi hastalıkları ve kansere neden olabilirler. Biyolojik kontamine cipsler, küçük çocuklarda, yaşlılarda ve bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde ciddi ve bazen ölümcül enfeksiyonlara neden olur.

2.4. Mikotoksinler

Gıda güvencesi ve gıda güvenliği, son yıllarda daha modern bakış açıları benimseyen insan toplumunun genel endişelerinden ikisidir. Bu endişenin temelinde rekolte azlığından ziyade tarlada, hasat esnasında ve depolamada meydana gelen kayıplar yatmaktadır. Mantarlar, yaşam için gerekli olmayan, ancak belirli ortamlarda mantara ekolojik bir avantaj sağlayabilecek çok sayıda metabolit üretir. Bu tür metabolitlere ikincil metabolitler denir. Mantar ikincil metabolitleri arasında bitki büyüme düzenleyicileri (ör.,giberellinler), farmasötik olarak faydalı bileşikler (ör.,penisilin, lovastatin), pigmentler (ör., karotenoidler) ve mikotoksinler (ör., trikotesenler, fumonisinler, aflatoksinler, okratoksinler) yer alır (Keller, 2005). Küf mantarları yem tahıllarında ürettikleri ikincil metabolitler olan mikotoksinlerle ciddi risklerin oluşumuna sebebiyet verirler. Ekinler görünüşte sağlıklı görünseler de, büyük miktarlarda farklı mantar türleri ve bunların metabolitlerini içerebilirler. Bu, zaman içinde tahıl mahsullerinde önemli ekonomik sonuçlarla birlikte önemli hasara neden olur. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre dünyadaki mahsullerin %25'inin küflere kirlenmiş olması nedeniyle sorun ciddi bir boyuttadır (JECFA, 2011). Küf mantarlarının üretmiş olduğu toksik ikincil metabolitler (MW<800 Da), insanlar veya hayvanlar tarafından tüketilir, solunur veya başka şekilde bunlarla temas ederse toksik ve/veya kanserojen etkilere yol açabilir Değişen ikincil etkileri olan yaklaşık 400 tür mikotoksin vardır. Bu mikotoksin, üretici mantarlar, üretim anı, yapısal özellikler veya toksikolojik etkilere bağlı olarak sınıflandırılabilir (Karim, 2010).

Tarih boyunca mikotoksinler çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Tarihte Mısır'ın onuncu vebasının kaynağı ve “Salem Büyücülük Duruşmaları”na yol açan "büyülerin" sebebi olarak görülmüşlerdir. 1940'larda ve 1950'lerde yaşanan, Rusya ve Japonya'daki ölümcül insan hastalıkları, Amerika Birleşik Devletleri'nde küf toksikozu ve staşibotritoksikozis ve Yeni Zellanda’daki koyunlarında yüz egzaması hastalığı vakalarının sebepleri olarak gösterilmişlerdir. 1961'de İngiltere'de çok sayıda hayvanın kontamine yem yedikten sonra ölmesi, aflatoksinlerin (AF'ler) keşfedilmesine yol açtı

(Rašić, 2012). O zamandan beri, mikotoksinlerin ekstraksiyonunu, tespitini ve miktarının azaltılmasını sağlamak, gıda ve yem güvenliğini garanti altına almak ve bu geçmiş koşulların tekrarlanmasını önlemek için önemli sayıda araştırma yapılmıştır.

Bolluk ve toksikoloji açısından en önemli mikotoksinler *Aspergillus, Penicillium, Alternaria* ve *Fusarium* filamentöz mantarlar tarafından üretilir. Normalde 10 ila 40 °C arasında, 4 ila 8 arasındaki bir pH aralığında ve 0,70'in üzerindeki su aktivitesi seviyelerinde üreyen küf mantarları için bu koşullar mantar türleri arasında değişebilir (Karim, 2010). Bir mikotoksinin farklı mantar türleri tarafından üretilebileceği veya bir mantar türünün birkaç mikotoksin üretebileceği unutulmamalıdır. *Aspergillus* veya *Penicillium* tarafından üretilen en önemli mikotoksinler, aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin G1 (AFG1) ve aflatoksin G2 (AFG2) ve okratoksin A (OTA)'dır (Büyükünal ve Persil Özkan, 2017). Bu tür mantarlar genellikle farklı coğrafi bölgelerin iklim, yağış rejimi ve ekin tipleriyle ilişkilendirilir. *Fusarium* ve *Alternaria* cinsleri tarla kontaminasyonlarında *Penicillium* ve *Aspergillus* mahsul depolamada yaygındır (Thrane, 1996). FB'ler ve DON gibi mikotoksinler çoğunlukla hasattan önce, AF'ler ve OTA esas olarak hasat sonrası aşamalarda üretilirler. Bununla birlikte, üretici mantara bağlı olarak, herhangi bir ürün vejetasyon ve hasat aşamasında ortaya çıkabilirler. Hasat öncesi mikotoksinler, iyi tarım uygulamaları (GAP) uygulanarak, kontrol yöntemleri kullanılarak, dayanıklı mahsul çeşitleri geliştirilerek, mahsul koruma kimyasalları kullanılarak azaltılabilirler. Bu faktörlere rağmen, iklim değişikliği ve uluslararası ticarileşme nedeniyle tüm dünyada ve çok çeşitli gıda örneklerinde bulunabilirler. Bu, besin zinciri boyunca mevcut oldukları için önemli bir sorun yaratır (Capriotti, 2010 ve Dussort, 2016).

Mikotoksinler en yaygın olarak tahıllarda ve tahıllardan elde edilen ürünlerde bulunmasına rağmen, süt ürünleri, baharatlar, kuru meyveler, kuruyemişler, kahve, bitkisel yağlar, şarap ve meyve sularında da bulunabilirler (Capriotti 2010 ve Dussort, 2016). Aslında, kontamine hammaddeden üretilen herhangi bir işlenmiş ürün mikotoksin içerebilir. Ayrıca, AF'ler, OTA, DON ve ZEA gibi tahıl taneleriyle yaygın olarak ilişkilendirilen mikotoksinler, sıcaklıkların 120 °C'ye kadar çıktığı öğütme, fırınlama, kızartma, kavurma ve kaynatma gibi çoğu gıda işleme sisteminde orta derecede stabildir. Gıda işleme ile elimine edilmezler, ancak bazı durumlarda konsantrasyonları önemli ölçüde azalır (Bianchini, 2007). Hububat tüketmemenin pratik olarak imkansız olduğunu

akılda tutarak, maruz kalma ve riski değerlendirmek önemlidir. Maruziyet, gıda kontaminasyonu ve gıda tüketimi izlenerek değerlendirilir. Diyetle alım ve maruziyetin değerlendirilmesinde, sırasıyla yaş ve vücut ağırlığını dikkate alınır. Mikotoksin tüketimi ile ilişkili riskler daha sonra maruziyet ve toksikoloji hakkındaki veriler kullanılarak belirlenebilir. Riskin karakterizasyonu, mikotoksinlerin düzenlenmesine ve tolere edilebilir günlük alım (TDI), gözlenmeyen yan etki seviyesi (NOAEL) ve diyetle alım gibi değerlerin belirlenmesine olanak sağlar. Toksikolojik bu veriler, mikotoksikozlar olarak bilinen çok çeşitli hastalıklara yol açabilen mikotoksinlerin tüketimini, solunmasını ve kutanöz emilimini tanımlamaktadır (Richard, 2007). Bu mikotoksikozlar, her bir mikotoksinin toksisitesine, maruziyet derecesine ve insan ve hayvanların yaşına ve beslenme aşamasına bağlıdır (Klich, 2003). Bulaşıcı değildirler, ilaç veya antibiyotik tedavisinden çok az etkilenirler, semptomları genellikle mevsimseldir ve belirli gıda maddeleriyle ilişkilidirler. Alışılmış olarak kontamine olduğundan şüphelenilen gıda örneklerinde bulunurlar. En yaygın mikotoksinlerin toksikolojik etkileri geniş çapta tanımlanmıştır ve mide bulantısı ve kusmadan kanserojen ve teratojenik sonuçlara kadar çeşitlilik gösterir. Mikotoksinler, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından insan sağlığı açısından oluşturdukları risk düzeylerine göre kategorize edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Mikotoksinlerin insan sağlığı risk düzeylerine göre gruplandırılması (IARC)**.**

Grup 1: İnsanlar için kanserojen ajanlar	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1	IARC, 2006; 2012; 2019
Grup 2A: İnsanlar için olası kanserojen ajanlar		
Grup 2B: İnsanlar için olasılığı daha düşük kanserojen ajanlar	OTA	IARC, 1993b
	FB1, FB2	IARC, 2019; IARC, 2002
	Sterigmatocystin	IARC, 1987a
	Fusarin C	IARC, 1993a
Grup 3: İnsanlar için kanserojen olma özelliği açısından sınıflandırılamayan ajanlar	DON	IARC, 1993a
	ZEA	IARC, 1993a
	Fusarenone X	IARC, 1993a
	Sitrinin	IARC, 1987b
	Patulin	IARC, 1987b
Grup 4: İnsanlar için muhtemelen kanserojen olmayan ajanlar		

2.4.1. Aflatoksin

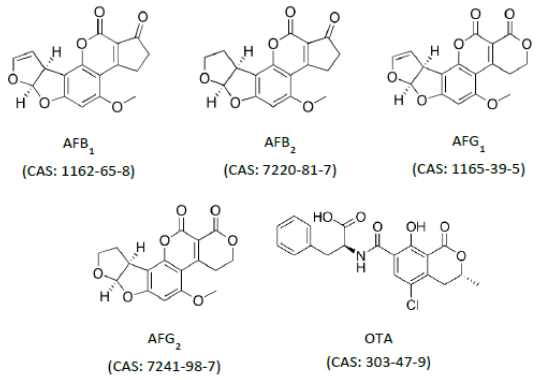
AF'ler, *A. parasiticus* ve *A. flavus* tarafından üretilir (Klich, 2003). Aflatoksin kelimesi *Aspergillus* için ilk "a" harfinden, *flavus* türü için aşağıdaki "fla" harflerinden ve "toksin" sonundan gelmektedir (Oldham, 1991). AF'ler 1950'lerin sonunda keşfedilmiştir (Klich, 2003) ve şu anda en çok çalışılan mikotoksin grubudur; AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2, kimyasal olarak karakterize edilen yaklaşık 18 AF'nin en önemlileridir. AF'lerin difuranokumarin kimyasal yapısı vardır (bkz. Şekil 2). Ultraviyole ışık altında floresanslarına göre ayırt edilirler ve adlandırılırlar. AFB1 ve AFB2 mavi, AFG1 ve AFG2 yeşil floresans sağlar (Büyükünal ve Persil Özkan, 2017).

Yiyecekler büyüme, hasat veya depolama sırasında *A. parasiticus* ve *A. flavus* tarafından kontamine olabilirler. Ayrıca, aflatoksigenik küfler substrattan kaybolduğunda bile, AF'ler büyük ölçüde varlığını sürdürebilirler. AF'ler, Tablo 4'de görülebileceği gibi, IARC tarafından insanlar için genotoksik ve kanserojen (grup 1) olarak kabul edilmektedir (IARC , 1993). Tüm AF'ler arasında, AFB1 hem akut hem de kronik açıdan en yaygın ve aynı zamanda en toksik olanıdır. AFB1'in karsinojenisitesi birçok hayvan türünde tespit edilmiştir, karaciğer birincil hedef organdır (Groopman, 2011). AFB1 yüksek hepatosellüler karsinom insidansı ile ilişkilidir ve AF'lere daha fazla maruz kalan bölgelerde hastalık daha sık görülür (Oldham, 1991; Groopman, 2011). Kusma, iştahsızlık, gastrointestinal etkiler, pulmoner ödem, depresyon, kilo kaybı, kanamalar ve karaciğer nekrozu gibi bazı klinik bulgular AF maruziyeti ile ilişkilidir (EFSA, 2004; Groopman, 2011). Bu toksik özelliklerden dolayı, tüketimin güvenli sayılabileceği bir eşik doz yoktur. Sonuç olarak, TDI veya NOAEL değerleri risksiz olarak önerilemez (Büyükünal ve Persil Özkan, 2017).

2.4.2. Okratoksin

Okratoksin A, B ve C, *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerine ait filamentli türler tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. OTA en tehlikeli olanıdır (Poór, 2016). İlk olarak *A. ochraceus*'tan izole edilmiş ve 1965 yılında mısır unu örneklerinde kimyasal olarak karakterize edilmiştir (Theron, 1965; Fourie, 1965). Bugüne kadar, *A. niger* ve *A. carbonarius* ile birlikte gıda maddelerinde çok çeşitli *Aspergillus* türlerinin OTA ürettiği gösterilmiştir. Bu toksijenik ipliksi mantarlar daha ziyade Güney Asya, Güney Amerika ve Afrika gibi sıcak ve nemli iklim koşullarında büyür. Bu nedenle, bu mikotoksin hemen

hemen tüm dünyada ve çok çeşitli matrislerde, özellikle yetersiz kurutulmuş tahıllarda ve tahıl ürünlerinde ve ayrıca şaraplarda, şıralarda ve üzüm sularında bulunabilir (Ramos, 2002). Ayrıca bira, domuz eti, kahve, yer fıstığı, baharat, kakao, bakliyat, inek sütü ve peynir gibi gıdalarda da bulunabilirler (EFSA, 2006; Benkerroum, 2016).



Şekil 2. OTA ve dört AF'nin kimyasal yapıları ve CAS numaraları (Karim, 2010).

OTA döngüsel bir pentaketiddir ve ikinci en önemli mikotoksin olarak kabul edilir (Karim, 2010). Kimyasal yapısı ve CAS numarası Şekil 2'de listelenmiştir. Bu mikotoksinin en önemli özelliklerinden biri, yüksek sıcaklıklara ve asitliğe karşı son derece kararlı olmasıdır. Bu nedenle gıda maddelerinden OTA kontaminasyonunu tamamen ortadan kaldırmak için pişirme işlemleri yeterli değildir (Büyükünal ve Persil Özkan, 2017).

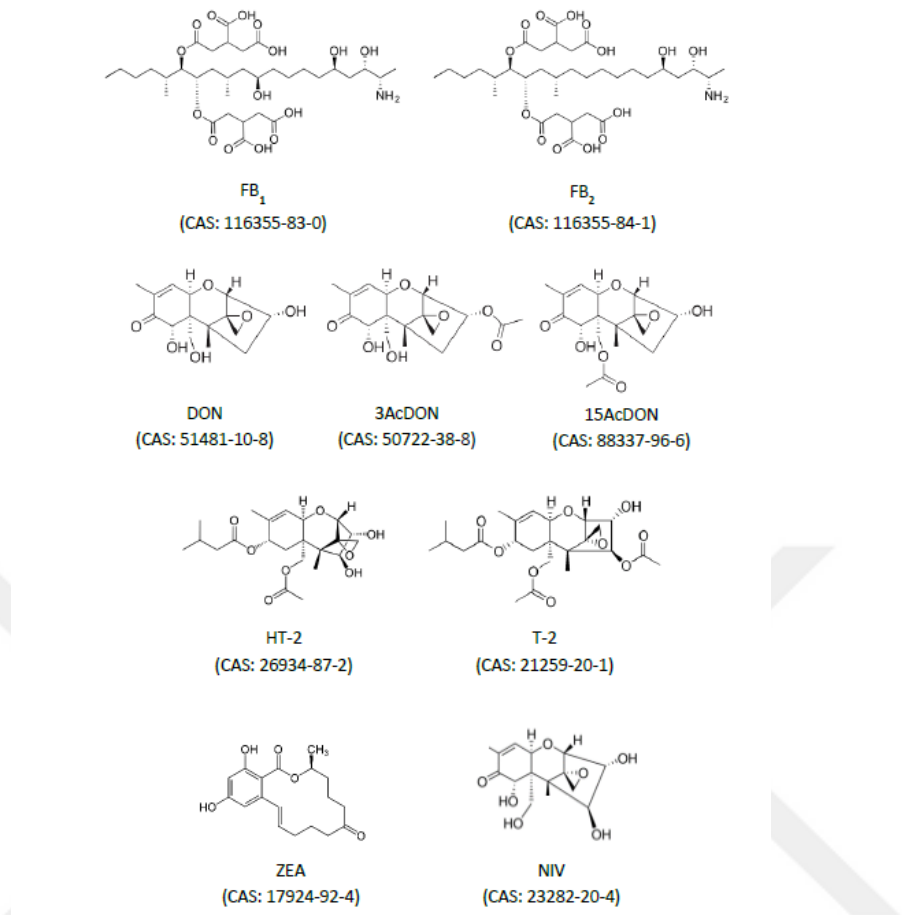
Ayrıca OTA, domuzlar ve diğer hayvanlar tarafından kontamine yemlerde tüketildiğinde, hızla emilir ve sistemik dolaşıma girer, burada büyük ölçüde plazma proteinlerine, özellikle albümine bağlanır (Toman, 2016). Bu nedenle OTA iç organlarda, ağırlıklı olarak kanda, böbreklerde ve karaciğerde bulunabildiğinden, yenilebilir dokularda ve et ürünlerinde mevcut olabilir (EFSA, 2004). Yağda çözünürlüğü nedeniyle kolay atılmaz. İnsan vücudunda, OTA'nın gıda lokması yutulduktan sonra 35 gün gibi uzun bir yarılanma ömrüne sahip olduğu bildirilmiştir (Dietrich, 2000) ve in vivo deneyler, OTA'nın böbreklerde biriktiğini ortaya çıkarmıştır (EFSA, 2006). Bu nedenle ana toksik etkisi nefrotoksikozistir. Böbrekler OTA'nın ana hedef organıdır (Manderville, 2007). Nefrotoksisitenin yanı sıra, OTA'ya maruz kalma aynı zamanda kanserojenite, teratojenite, immünotoksisite ve muhtemelen nörotoksik özelliklerle ilişkilendirilmiştir (EFSA, 2006). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), mikotoksinler gibi bazı

bileşikleri insanlarda ve deney hayvanlarında kanserojenliklerine göre sınıflandırmıştır (IARC, 1993). İnsanlarda kanserojen olan bir bileşik olarak OTA, grup 2B'de tanımlanmıştır (Büyükünal ve Persil Özkan, 2017).

2.4.3. Fumonisin

FB1 ve FB2 en yaygın FB'lardır. FB1 ve FB2'nin en temsili özelliklerinden biri, toksisitelerine katkıda bulunan uzun hidrokarbon zinciridir (bkz. Şekil 3) (Brasel, 2001). Bu kimyasal yapı, FB'lerin moleküler membranlarla etkileşime girmesine ve sfingolipid metabolizmasına (Dutton, 1996) müdahale etmesine olanak tanır: Çünkü bilinen diğer mikotoksinlerin çoğunun aksine hidrofilik özelliklere sahiptirler. Bu, onları ekstrakte etmeyi ve tespit etmeyi daha zor hale getirir. FB1 ve FB2 arasındaki temel fark, FB1'de bir hidroksil grubunun varlığıdır (Şekil 3). Bu FB1'i en toksik Fumonisin yapar ve IARC tarafından insanlar için muhtemelen kanserojen (grup 2B) olarak sınıflandırılır (Tablo 4). FB'lerin yutulmasının hayvanlar üzerindeki etkileri, atlarda beyin lezyonlarından domuzlarda akciğer ödemine kadar değişebilir (Leslie, 2011). FB1 tüketimine daha duyarlı olan hayvan türleri domuzlar ve atlardır (EFSA, 2014). İnsanlarda FB'ler, özellikle FB1 durumunda özofagus kanseri ile ilişkilidir, ancak bu bağlantılar hiçbir zaman tam olarak doğrulanmamıştır (Klich, 2003). Bu nedenle, FB'ler kanser destekleyicileri olarak kabul edilir, ancak mutajenik değildir.

FB'ler tarafından kontaminasyonlar genellikle hasat öncesi veya depolamanın başlangıcında meydana gelir (Sanchis, 2013) ve mısır, neredeyse tüm FB kontaminasyonlarının üretildiği matristir (EFSA, 2014). Kirlenme seviyeleri, mısır numuneleri arasında, özellikle hayvan yemi ve ham mısır için amaçlanan mısır fraksiyonları arasında büyük ölçüde değişebilir (EFSA, 2014). Mısır örneklerinde bu yüksek FB varlığına rağmen, konsantrasyon seviyeleri depolama sırasında artmaz (Sanchis, 2013) , bu da onları kontrol etmeyi kolaylaştırır.



Şekil 3. Fusarium mikotoksinlerinin kimyasal yapıları ve CAS numaraları (Sanchis, 2013).

FB'lerin neden olduğu kontaminasyonlar genellikle hasat öncesi veya depolamanın başlangıcında meydana gelir (Sanchis, 2013) ve mısır, neredeyse tüm FB kontaminasyonlarının üretildiği matristir (EFSA, 2014). Kirlenme seviyeleri, mısır numuneleri arasında, özellikle hayvan yemi ve ham mısır için amaçlanan mısır fraksiyonları arasında büyük ölçüde değişebilir (EFSA, 2014). Mısır örneklerinde bu yüksek FB varlığına rağmen, konsantrasyon seviyeleri depolama sırasında artmaz (Sanchis, 2013) , bu da onları kontrol etmeyi kolaylaştırır.

2.4.4. Zearalenon

ZEA, *Fusarium* mantar türleri tarafından üretilen ve genellikle mısır örneklerinde bulunan başka bir mikotoksindir. “Zea-”, ilk çalışılan üretici organizmanın adı olan *Gibberella zeae*'den gelir; resorsilik asit lakton ("-ral-") bu doğal ürünlerin jenerik adıdır.

Son olarak, "-ene-" ve "-one", sırasıyla C-1 ’ila C-2’ çift bağının ve C-6 ’ketonun varlığını gösteren soneklerdir (Josephs, 2001). Bu yapı oldukça kararlıdır, bu nedenle genellikle ZEA pişirme koşullarından etkilenmez (Sanchis, 2013) . Ancak ZEA'nın en önemli özelliği kimyasal yapısının östrojenlere benzer olmasıdır (Sieprawska, 2017) . Bu nedenle ZEA, östrojenler için bitki sitoplazmik reseptörleri ile etkileşime girebilir ve bunlarla bağlanabilir ve bir bitki hormonu olarak hareket edebilir (Josephs, 2001; Sieprawska, 2017). Diğer bir şekilde hayvan hücrelerinin zarlarından reseptörlere bağlanabilir ve üreme ve kısırlık sorunlarına yol açan hiperöstrojenizme neden olabilir (Sieprawska, 2017). Domuzlar özellikle ZEA'ya duyarlıdır ve konsantrasyon seviyeleri yeterince yüksekse kısır hale gelebilirler (Leslie, 2011) . Östrojen değişikliklerinden kaynaklanan diğer klinik semptomlar, kadınlarda süt retansiyonu veya yokluğu, rektal prolapsus ve erkeklerde düşük testosteron seviyeleri ve spermatogenezdir (Sanchis, 2013).

2.4.5. Sitrinin

Sitrinin mikotoksin, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Monascus* cinslerinin birkaç türü tarafından üretilen bir poliketiddir. *A. niger*’in *Aspergillus* türleri arasında en yüksek sitrinin üreticisi olduğu bildirilmiştir. Bu cinsin diğer sitrinin üreticileri arasında *A. awentil, A. ostianus, A. fumigatus, A. niveus, A.awamori* ve *A. parasiticus* bulunur (Li, 2010). Sitrinin üreten mantarların bazıları aynı zamanda mikotoksinler olan okratoksin A veya patulin de üretebilmektedir (Nejati, 2014). Sitrinin genellikle depolama koşulları altında hasattan sonra ve esas olarak depolanmış tahıllarda oluşur. Ancak aynı zamanda bitkisel kaynaklı fasulye, meyveler, meyve ve sebze suları, otlar ve baharatlar ve ayrıca bozulmuş süt ürünlerinde de oluşabilir (EFSA, 2012).

Ayrıca sitrinin, gıda koruyucu ve Asya gıdalarında renklendirici olarak kullanılan kırmızı küflü pirinçte (RMR) istenmeyen bir kirletici olarak bulunur (Li, 2010).

2.4.6. Trikotesenler

Mikotoksinler, enfekte bitkilerinde birikebilir ve yutulması halinde insanlarda ve hayvanlarda hastalıkların (mikotoksikozlar) gelişmesine yol açabilir (Ueno, 1977). Trikotesenler, her yıl tahıl ve tahıl ürünleri üzerinde önemli bir ekonomik etkiye neden olan, mikotoksinlerin ana sınıflarından biridir (Parry, 1995). Trikotesen üreten mantarların patojenitesinin anlaşılması ve trikotesen biyosentezinin düzenlenmesi,

bunların Kuzey Amerika'ya ve dünya çapındaki diğer bölgelere yayılmasıyla mücadele etmek için giderek daha önemli hale gelmiştir.

Trikotesen üreten cinsler arasında *Fusarium*, *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma* ve *Trichothecium* bulunur (Mcmullen, 1993). Hypocreales takımından bu mantarlar dünyanın her yerinde bulunur ve geniş bir nem mevcudiyeti ve besin içeriği yelpazesine sahip substratlar üzerinde kolonizasyon ve büyüme için uyarlanmıştır. *Fusarium* cinsi içinde, bazı türler önemli bitki patojenleridir ve tahıllarda, özellikle buğday, arpa, yulaf ve mısırda solgunluk, yanıklık ve kulak çürüklerinin nedenleridir (Cole, 2003). *Myrothecium* türleri kavun ve domates patojenleridir (Bean, 1984). *Stachybotrys* çeşitli mallarda bulunur ve daha yakın zamanlarda, nemli bina ile ilgili hastalıklarla ilişkilendirilen önemli bir iç mekan çevresel kirleticisi olduğu bulunmuştur (Pestka, 1988). *Trichoderma* türleri toprakta yaygın olarak bulunur ve mantar ve üzüm hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. Trikotesen türleri genellikle toprakta ve çürüyen organik materyallerde bulunur (Farr, 1989).

Trikotesenler, hücre zarları boyunca pasif olarak hareket edebilen küçük, amfipatik moleküllerdir (Middlebrook, 1989). İntegumenter ve gastrointestinal sistemler yoluyla kolayca emilirler ve yutulan trikotesenlerin hızla çoğalan dokular üzerinde hızlı bir etkisine izin verirler . Bu toksinlere maruz kalmak yem reddine, immünolojik problemlere, kusmaya, deri dermatitine ve hemorajik lezyonlara neden olabilir (Pestka, 2008). Ayrıca fitotoksiktirler ve kloroza, kök uzamasının inhibisyonuna ve cüceliğe neden olabilirler ve buğday baş kabuğunda bir virülans faktörü olarak hareket edebilirler (Pestka, 2008).

Trikotesenler, ortak bir trisiklik 12,13-epoxytrichotec-9-ene (EPT) çekirdek yapısına sahip 200'den fazla toksinden oluşan bir ailedir (Cole, 2003). EPT'nin ikame modeline göre dört gruba (Tip A, B, C ve D) sınıflandırılmışlardır (Pestka, 2008). A, B ve C tipleri, C-8 pozisyonundaki ikameye göre ayırt edilebilir. Tip A trikotesenler, C-8'de bir hidroksil grubuna (örn., neosolaniol), C-8'de bir ester fonksiyonuna (örn., T-2 toksini) veya C-8'de oksijen ikamesi olmayan (örn., trikodermin, 4 ,15-diasetoksiscirpenol ve harzianum A). B tipi trikotesenler, C-8'de bir keto (karbonil) işlevine sahiptir (örneğin, nivalenol, deoksinivalenol ve trikotesin). *Fusarium'da* B Tipi trikotesenler tipik olarak bir C-7 hidroksil grubuna sahiptir, ancak bu yapısal özellik diğer cinslerde mevcut değildir. C tipi trikotesenler, bir C-7/C-8 epoksite (örneğin, krotosin) sahiptir. D tipi

trikotesenler, C-4 ve C-15 pozisyonunu birbirine bağlayan ek bir halkaya sahiptir (örneğin, roridin A, verrucarin A, satratoxin H).

2.5. Mikotoksinlerin Yasal Limitleri

Kahvaltılık tahıllarda bulunmasına izin verilen mikotoksin seviyeleri 29.12.2011 tarih 28157 sayılı Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde belirtilmiştir (TGK, 2011) (Tablo 4)

Tablo 4. TGK Bulaşanlar Yönetmeliği'nde mısır irmiğinden imal cipslerde belirlenen maksimum mikotoksin limitleri

AFLATOKSİN	**Maksimum Limit (µg/kg)**	
	B_1	**$B_1+B_2+G_1+G_2$**
Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri (Bölüm 2.1.11, 2.1.14 ve 2.1.16'de belirtilenler hariç)	2,0	4,0
OKRATOKSİN A		
(Değişik:RG-19/12/2012-28502) İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (Doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil) (2.2.9., 2.2.10. ve 2.2.13. satırında belirtilenler hariç)	3,0	
DEOKSİNİVALENOL		
Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar	500	
ZEARALENON		
Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar	100	
FUMONİSİNLER	**$FB_1 + FB_2$ (µg/kg)**	
Mısır bazlı kahvaltılık tahıllar ve mısır bazlı çerezler	800	

2.6. Mikotoksinlerin Belirlenmesi

Karmaşık matrislerde düşük konsantrasyon seviyelerinde düzenlenmiş mikotoksinlerin varlığı belirlenerek gıda güvenliğinin iyileştirilmesi gerekmektedir. Mikotoksinleri belirlemek için genel prosedür, analitleri matristen çıkarmak ve ardından bunları çeşitli ayırma ve saptama teknikleri kullanarak saptamak ve ölçmektir (Hışıl, 2002a).

Bu mikotoksinlerin oluşabileceği düşük konsantrasyonlar nedeniyle, mikotoksinleri gıda örneklerinden çıkarmak için çok çeşitli ekstraksiyon teknikleri geliştirilmiştir: Örneğin, katı sıvı ekstraksiyonu (SLE), QuEChERS (Hızlı, Kolay, Ucuz, Etkili, Sağlam ve Güvenli ekstraksiyon) ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE). Ancak bu teknikler genellikle hedef mikotoksinleri verimli bir şekilde çıkarmasına rağmen, aynı zamanda yüksek oranda metabolit de çıkarırlar. Bu metabolitler, daha sonra LC-MS ile analiz edilirlerse, sinyal yoğunluğu üzerinde bir matris etkisine (ME) sahip olabilir. Bu nedenle, daha seçici ekstraksiyon teknikleri geliştirilmiş veya ekstraksiyondan sonra bir temizleme adımı eklenmiştir. Mikotoksinlerin ekstraksiyonu için enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) veya suyla ekstraksiyon gibi daha seçici ekstraksiyon teknikleri de geliştirilmiştir, ancak temizleme adımları olarak katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve dispersif SPE (dSPE) tercih edilen yöntemlerdir. Bu ekstraksiyon tekniklerinin daha fazla seçicilik, sağlamlık ve güvenilirliğe doğru iyileştirilmesi, gıda güvenliğini desteklerken giderek daha hassas hale gelen yasal seviyelerin uygulanmasını ve bunlara uyulmasını kolaylaştırmaktadır (Sanchis, 2013).

Gıda örneklerinin karmaşıklığı ve heterojenliği nedeniyle, ekstraksiyondan önce liyofilizasyon, öğütme, eleme ve homojenleştirme gibi ön işlemler de gereklidir. Mikotoksinler çoğunlukla küflenmeye yakın bölgelerde daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bu nedenle, mikotoksinler genellikle numune boyunca dağılmaz, bu nedenle sonuçların güvenilir olması için verimli bir homojenleştirme adımı esastır. Aslında, yukarıdaki tüm ön işlemler, numunelerin temsil edilebilirliğini sağlamanın tek yoludur (Hışıl, 2002a; Sanchis, 2013)..

Numune ekstraksiyon prosedürü ile ön işleme tabi tutulduktan sonra, ayırma ve tespit teknikleri de düşük konsantrasyonlarda mikotoksinlerin belirlenmesi için önemlidir. Mikotoksinleri ayırmak ve tanımlamak için en yaygın kullanılan teknik sıvı kromatografidir (LC). Birden fazla mikotoksini aynı anda tespit etmek için tek bir

yönteme ihtiyaç duyulduğundan LC tercih edilen tekniktir. Gaz kromatografisi (GC) ve ince tabakalı kromatografi (TLC), mikotoksinlerin belirlenmesinde de kullanılan iki tekniktir (Hışıl, 2002a; 2002b).

Algılama yöntemlerinden kütle spektrometresi (MS) ve tandem kütle spektrometresi (MS/MS), mikotoksinlerin belirlenmesinde en yaygın olanlardır ve yalnızca deneysel araştırmalar için değil, aynı zamanda rutin analizler için de ana yöntemler olarak yerleşmişlerdir.

2.6.1. Örnekleme ve ekstraksiyon teknikleri

Örnekleme, mikotoksinlerin doğal varlığını belirlemek için analitik yöntemdeki muhtemelen en önemli adımdır. Örneklemede, iki önemli husus belirsizlik ve doğruluk-kesinliktir. Örnekleme prosedürleri yüksek doğruluk ve kesinlik değerleri elde etmeye odaklanmalıdır (Whitaker, 2006) . Bu adımın zorluğu, mikotoksinlerin çiğden işlenmiş gıda maddelerine kadar ortaya çıkabilmesi, örneklerin hatırı sayılır heterojenliği ve ayrıca matrislerdeki mikotoksin dağılımının heterojenliğidir. Uygun olmayan koruma koşulları, keyfi olarak dağılan "sıcak noktalar" olarak da bilinen yüksek mikotoksin konsantrasyonlarına sahip lokalize küflerin ortaya çıkmasına neden olabilir (Dell'Orto, 2009) . Bu, mikotoksin kontaminasyonunun olduğundan az tahmin edilmesine veya tam tersine, kontamine partiküllerin gelişigüzel seçilmesi durumunda fazla tahmin edilmesine yol açabilir. Mevcut veriler AF'lerin OTA ve DON'dan daha heterojen dağıldığını gösterdiğinden, bu sıcak noktaların varlığı AF'ler gibi bazı mikotoksinlerin örnekleme prosedürünü engelleyebilir (Dell'Orto, 2009) . Bu nedenlerle, tutarlı örnekler elde etmek ve tüm örneğin gerçek değerinin üstünde veya altında örneklemeyi önlemek için örneklemeye başlamadan önce özellikle AF'ler ile iyi bir homojenleştirme süreci sağlamak önemlidir.

Numune hazırlama sırasında hata yapmak, tüm mikotoksin analiz prosedüründe büyük bir hata yüzdesi ile ilişkilidir. Özellikle, büyük bir hata yüzdesi biriktiren adımlar alt örneklemedir (Whitaker, 2006) . Yapılan bir araştırma, tahıl örneklemesinin en kritik adım olduğunu ve toplam değişkenliğin yaklaşık %46'sına katkıda bulunduğunu göstermiştir (Hallier ve ark., 2011). Mikotoksin tayinindeki bu değişkenliği azaltmak için bazı genel kriterlerin belirlenmesi gerekir. Bu nedenle AB, bazı mikotoksinleri örneklemek ve analiz etmek için ana yöntemleri oluşturmuştur. Buğday danesi örneklerinde DON miktarının belirlenmesindeki değişkenliği incelemiştir (EC, 2006). Bu

yönetmeliğe göre, mikotoksinlerin heterojen dağılımı, numunelerin tam homojenleşmeyi sağlamak için son derece dikkatli bir şekilde hazırlanması ve öğütülmesi gerektiği anlamına gelir.

Genel olarak, yönetmelik her bir gıdanın kuru maddesi için maksimum konsantrasyon seviyelerini belirler, bu nedenle numuneler de numune almadan önce doğru bir şekilde kurutulmalıdır. Daha sonra analiz edilecek parti ağırlık, ürün ve partikül boyutuna göre alt partilere bölünmelidir. Bu nedenle, büyük partiküllere sahip ağır partiler için, ortaya çıkan alt lotlar, daha küçük partiküllere sahip daha hafif partilerin alt lotlarından daha ağır olacaktır. Bu alt lotlar daha sonra analiz edilir ve sonuçlar tüm partiye dağıtılır. Bu yöntemler takip edilirse, sonuçlar gerçek değerlere daha yakın olacaktır (EC , 2006).

Örnekleme tamamlandıktan sonra, bir sonraki adım analizden önce ekstraksiyondur. Ekstraksiyon tekniğinin seçimi sadece matrise ve hedef analitlere değil, aynı zamanda ekstraksiyonun amacına da bağlıdır. Ekstraksiyon, yüksek mikotoksin konsantrasyonlarının varlığını izlemek için gerçekleştirilirse, basit ekstraksiyon teknikleri yeterlidir. Öte yandan, bu mikotoksinlerin varlığını belirlemek için düşük saptama ve kantifikasyon limitleri gerekiyorsa, daha kapsamlı ekstraksiyon tekniklerine ihtiyaç vardır. Örneğin, mikotoksinlerin yutulmasını kontrol etmek için varlığının belirlenmesine odaklanan maruziyet değerlendirme çalışmaları için, seçilen yöntemler hedef mikotoksinleri çok düşük konsantrasyonlarda çıkarabilmeli ve nihai belirlemeyi etkileyebilecek etkileşimleri önleyebilmelidir. Bu durumda, daha seçici bir ekstraksiyon tekniği ve ardından daha fazla temizleme adımı iyi bir seçenek olacaktır.

Literatürde çok sayıda ekstraksiyon tekniği bildirilmiştir. Birinin veya diğerinin kullanımı, matrisin türüne (örneğin, işlenmiş veya işlenmemiş, katı veya sıvı vb.), analiz edilecek mikotoksinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve sonraki ayırma ve saptama tekniklerine bağlıdır. Aşağıdaki bölümler, yüksek lisans tezimizin odaklandığı ve mikotoksin tayini için yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon tekniklerinin kısa bir incelemesini vermektedir.

2.6.1.1. Solvent ekstraksiyonu

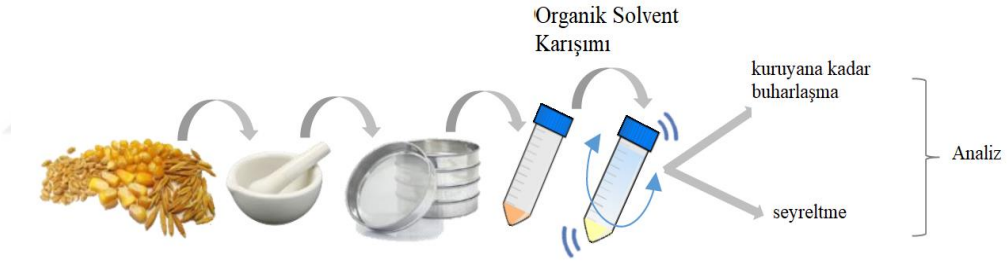
Solvent ekstraksiyon teknikleri uzun süredir kullanılmaktadır ve muhtemelen mikotoksinleri tahıl örneklerinden ekstrakte etmek için kullanılan en eski tekniklerdir.

Günümüzde hala basit oldukları ve pahalı ekipman gerektirmedikleri için kullanılmaktadırlar. SLE katı matrislerde ve LLE sıvı matrislerinde uygulanır. Ekstrakte edilecek mikotoksinlere ve işlenecek matrise bağlı olarak, ekstraksiyon solventi ve ekstraksiyon zamanı faktörlerinin hesaba katılması gerekir.

Çözücüler, hedef mikotoksinleri çıkarabilmeli ve müdahale eden bileşikleri mümkün olduğunca uzaklaştırabilmelidir. Çözücü birden fazla mikotoksinin ekstraksiyonu için kullanıldığında, tüm mikotoksinler arasında bir uzlaşma gereklidir. Polar organik çözücüler en çok kullanılan çözücülerdir. Çünkü neredeyse tüm mikotoksinler apolar çözücüler içinde çözünmezler. Polar ve hafif polar çözücüler içinde çözünürler. Genellikle, heksan veya sikloheksan gibi apolar çözücüler, lipitler gibi girişimleri ortadan kaldırmak için bir temizleme adımı olarak kullanılır. Bu nedenle, en çok kullanılan çözücüler metanol (MeOH) (Mañes, 2008), asetonitril (ACN) (Humpf ,2005), aseton (Capriotti, 2010), kloroform, toluen, diklorometan ve etil asetat gibi organik çözücülerdir. Suyla veya küçük asit miktarları (Soleimany, 2009). Örneğin, Warth ve ark. (2012), tahıllarda ve yemde 63 mikotoksini özütlemek için özütleme çözücüsü olarak bir ACN / su / asetik asit (CH_3CHOOH) (79: 20: 1) karışımı kullandı. Benzer şekilde Beltrán ve ark.(2011) tahıl ve tahıl türevlerinden 11 mikotoksin ekstrakte etmek için %0,1 formik asit (HCOOH) ilavesiyle ACN/su (80:20, v/v) karışımı kullandı. Geri kazanımlar %70 ile %120 arasındaydı. Çözücü karışımının matrise nüfuz etmesine yardımcı olduğundan ve ekstraksiyon etkinliğini artırdığından ekstraksiyon için sıklıkla su eklenir (Soleimany, 2009; Cunha, 2014) . Ayrıca, önerilen %70'in altında geri kazanım değerleri sunan DON ve FB'ler (Soleimany, 2009; Piletsky, 2009) gibi mikotoksinler için de yararlıdır. Ayrıca, özütleme çözücüsü olarak su kullanmanın bazı avantajları vardır. Çünkü çevresel etkisi neredeyse yok denecek kadar azdır, bu nedenle yeşil bir çözücü özütleme tekniğidir. Öte yandan, bu verimli düşük maliyetli yöntem diğer bileşikler için uygun değildir. Örneğin, hidrofobik özelliklere sahip AF'leri çıkarmak için su kullanılamaz (Piletsky, 2009). Aseton ayrıca tahıllardan mikotoksinlerin ekstraksiyonu için kullanılan yaygın bir organik çözücüdür. Capriotti (2010), iyi sonuçlar ve orta düzeyde sinyal bastırma sağlayan bir aseton / su / CH_3COOH (80: 19: 1, v/v /v) karışımı kullandı ve mikotoksin kontrolü ile ilgili mevcut yönergelere uydu. Son zamanlarda, klorlu kimyasallar, iyi ekstraksiyon özelliklerine sahip olmalarına ve mikotoksin ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılmalarına rağmen, ekolojik tehlikeleri nedeniyle

kullanılmayı bırakmıştır (UNEP, 1998). Ekstraksiyon solventine HCOOH veya CH3COOH gibi küçük miktarlarda asitlerin eklenmesi, mikotoksinler ve matriks benzeri proteinlerden bileşikler arasında meydana gelebilecek etkileşimleri kesintiye uğrattığı için genellikle ekstraksiyon etkinliğini artırır (Soleimany, 2009; Cunha, 2014).

Matris tipi, ekstraksiyonun uzunluğu ve ekstraksiyon solventi, genellikle düşük geri kazanım sağlayan mikotoksinleri ekstrakte ederken önemli faktörlerdir. İşlenmiş mısırdan ekstraksiyonun zor olduğu (Shephard, 2008) ve çoğu durumda daha uzun ekstraksiyon sürelerinin ekstraksiyonu artırdığı bildirilmiştir (Yiannikouris, 2012). Örneğin, Beltrán ve ark. (2009) tarafından bulunan girişimlerin varlığı özellikle 90 dakikalık bir ekstraksiyondan sonra sinyal artışı sunan FB'ler için önemliydi. Mikotoksinleri çözücü ekstraksiyon teknikleriyle ekstrakte ederken sıcaklık genellikle hesaba katılmaz ve oda sıcaklığı en yaygın olanıdır.



Şekil 4. Tahıl örneklerinde SLE için örnek prosedür adımlarının gösterimi.

Şekil 4, birkaç yazarın sadece ekstraksiyon adımı ve ardından parazitlerin varlığını azaltmak için seyreltme ya da saptama ve kantifikasyon limitlerini artırmak için kurutma ve yeniden oluşturma adımını kullandığı olağan SLE prosedürünü gösterir. Örneğin Juan ve ark. (2013) ve Klötzel ve ark. (2015) tahıllardan ve tahıl ürünlerinden *Fusarium* mikotoksinlerinin ekstraksiyonu için ACN / su (84:16, v / v) karışımı, ardından buharlaştırma ve yeniden yapılandırma kullanmıştı. Öte yandan, süpernatantı buharlaştırmak yerine, Hickert ve ark. (2015) ve Nathanail ve ark. (2016) süpernatantı enjeksiyondan önce seyreltmiştir. Daha fazla seyreltilmiş örneklerin matris etkisinin varlığını azaltıp azaltmadığını belirlemek için farklı dilüsyonlar test edildi, bu tüm mikotoksinlerde ve test edilen tüm matrislerde azaldı. Tersine, daha düşük mikotoksin

konsantrasyon seviyelerini tespit etmek için daha hassas aletlere ihtiyaç vardır. Aslında özütler, yüksek maliyetleri nedeniyle her bileşik için izotopik olarak etiketlenmiş standartlar kullanılamadığında sıklıkla seyreltilir.

LLE ayrıca sığır sütü gibi gıda örneklerinden ve ayrıca kan, idrar ve tükürük gibi biyolojik örneklerden (Cao, 2013) mikotoksin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Sütten OTA ekstraksiyonu için, aynı hacimde numune MeOH ile karıştırılır ve geri kazanım değerleri %90'dan fazladır. Tersine, biyolojik örneklerden 28 mikotoksinin ekstraksiyonu için 5 mL asetonitril / su / CH_3COOH (80:19: 1, v / v / v) 200 µL örnek ile karıştırıldı. Geri kazanımlar, FB'ler hariç % 70 ile %102 arasındaydı (Cao, 2013).

Bazı durumlarda tek bir ekstraksiyon adımı olan SLE ve LLE, uygun geri kazanımlarla tek bir analizde yüksek sayıda mikotoksinin ekstrakte edilmesini sağlamıştır. Ediage ve ark. (2011) yerfıstığı keki, mısır ve manyok unundan 25 mikotoksin ekstraksiyonu için bir yöntemi doğruladı. Sulyok ve ark. (2006; 2007) tahıl matrislerinden 87 ve 39 mikotoksinin ekstraksiyonu için iki yöntemi doğruladı ve Zachariasova ve ark. (2010) bira örneklerinden 32 mikotoksin için bir metodolojiyi doğruladı. Öte yandan, çözücü ekstraksiyonlarının çoğu zaman büyük miktarlarda çözücü kullanmaları gibi bir dezavantajı vardır. Çoklu mikotoksin ekstraksiyonları için, genel olarak daha iyi ekstraksiyon sonuçları nedeniyle su yerine organik solventlerin kullanıldığı dikkate alınmalıdır. Örneğin, Erisken ve ark. (2002; 2003) idrar, plazma, dışkı ve ileum digesta örneklerinden 41 mL etilasetat ile birkaç trikoteseni iki kez ekstrakte etti. Bu tek adımlı ekstraksiyonlar, düşük miktarlarda çözücü kullanıldığında kolay, hızlı ve ekonomiktir. Sonuç olarak, SLE ve LLE mikotoksinlerin hızlı izlenmesi için iyi araçlardır. Doğrulanmış metodolojileri çoğu mevzuatın gerekliliklerine uygundur. Yukarıda anlatılan tüm çözücü ekstraksiyon kombinasyonları hesaba katıldığında, bu tekniklerle geri kazanımlar iyidir. Bununla birlikte, matris etkileri önemliydi ve bu ekstraksiyon tekniklerinin basitliğinin bir sonucu olarak saptama sınırları (LOD) ve niceleme sınırları (LOQ) yüksekti. Çoğu zaman, girişimlerin varlığı mikotoksinlerin doğru şekilde belirlenmesini engeller. Bu nedenle genellikle daha verimli ve seçici ekstraksiyon teknikleri kullanılır.

2.6.1.2. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu

PLE, yüksek basınçları yüksek sıcaklıklarla birleştiren tam otomatik bir metodolojidir. Homojenleştirilmiş numune, kizelgur (DE) gibi bir dağıtıcı ajan ile birlikte

paslanmaz çelik bir ekstraksiyon hücresine dökülür. Ekstraksiyon hücresi birkaç dakika ısıtılır ve ardından analitler, yüksek sıcaklıklarda ve basınçlarda seçilen ekstraksiyon solventi kullanılarak matristen ekstrakte edilir. Bu nedenle, toplama kapları, ekstraksiyon çözücüsü ve hedef analitlerin bir karışımını içerir.

Yüksek sıcaklıklar çözücünün numuneyi ıslatma yeteneğini artırır ve analitlerin çözücü ile temasını iyileştirir. Ayrıca matris ile mikotoksinler arasındaki bağların parçalanmasına da yardımcı olurlar. Bu nedenle, yüksek sıcaklıklar, analitin çözünmesine katkıda bulunur. Aynı zamanda, yüksek basınçlar çözücünün sıvı halde yüksek sıcaklıklarda tutulmasına yardımcı olur ve sonuç olarak ekstraksiyonlar hızlı ve etkilidir. Genel bir kural olarak, daha yüksek sıcaklıklar ekstraksiyon verimliliğini artırır, ancak aynı zamanda matris girişimleri çıkarılır ve bu da seçiciliği azaltır. Yine de, otomasyon ve yüksek verimlilik bu tekniğin en önemli avantajlarından ikisidir (Eriksen, 2003), bu nedenle verimlilik ve seçicilik arasında bir uzlaşma sağlanmalıdır. Bu avantajlarına rağmen PLE, mikotoksinleri çıkarmak için sıklıkla kullanılan bir ekstraksiyon tekniği değildir. Bununla birlikte, PLE, tahıl ve tahıl türevlerinden birkaç mikotoksin ekstrakte etmek için kullanıldığında, sonuçlar her zaman tatmin edici olmuştur.

Buna göre, ekstraksiyon solventi, sıcaklık, basınç, ekstraksiyon süresi, döngü sayısı ve hücre boyutu çeşitli ekstraksiyon parametreleri PLE ile optimize edilebilir. Ayrıca, birkaç temizleme parametresi de kullanılabilir. Örneğin, dispersiyon ajanları (hücre içi temizlik) veya önceki hücre içi temizlik. Genel olarak, PLE metodolojisinin optimizasyonu, en iyi ekstraksiyon solventinin veya en iyi solvent ekstraksiyon karışımının seçilmesiyle başlar. MeOH, ACN ve bir ACN/su karışımı, mikotoksinleri ekstrakte etmek için en çok kullanılan üç çözücüdür ve birinin veya diğerinin kullanılıp kullanılmaması büyük ölçüde matrise ve ilgili analitlere bağlıdır. Örneğin, D'Arco ve ark. (2008) ve González ve ark. (2006), FB'leri mısır bazlı bebek mamalarından ve OTA'yı sırasıyla pirinç ve pirinç ürünlerinden çıkarmak için çözücü olarak MeOH kullandı. Geri kazanımlar, FB'ler için% 68 ile% 83 arasında ve OTA durumunda% 90'ın üzerindeydi. Bunun aksine, Campone ve ark. (2009) kuruyemişlerden AF'leri çıkarmak için çözücü olarak ACN'yi seçti, çünkü elde edilen özütler en düşük lipid içeriğine sahip olanlardı. Geri kazanımlar% 77 ile% 93 arasındaydı. Bazı sulu ACN karışımları da birkaç yazar tarafından (Zinnedinde, 2010; Oberson , 2010), genellikle CH3COOH (Zinnedinde, 2010; Oberson , 2010) eklenerek seçilmiştir. Bu çalışmalarda da sonuçlar tatmin edici

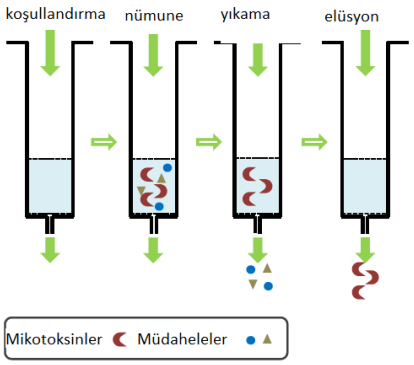
bulunmuştur. Zinedine ve ark. (2010), kahvaltı ve bebek tahıllarından OTA çıkarmak için bir yöntem % 82'lik bir geri kazanım değeri ile doğrulanırken, Cao ve ark. (2013), geri kazanımların daha düşük olduğu FB'ler haricinde %71 ile %100 arasında geri kazanımlarla biyolojik örneklerden 28 farklı mikotoksin için bir yöntemi onayladı. Teo (2010), mikotoksinleri çıkarmak için ekstraksiyon çözücüsü olarak asitleştirilmiş su kullanmamıştır. Tersine, subkritik su ekstraksiyonu (SWE) ve basınçlı sıcak su ekstraksiyonu (PHWE) olarak da adlandırılan bu ekstraksiyon tekniği, antibiyotikler, insektisitler, pestisitler ve herbisitler gibi gıda maddelerinden organik kontaminantları çıkarmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. PLE'nin verimliliği aynı zamanda seçilen sıcaklığa da bağlıdır, oysa basıncın genellikle daha az etkisi vardır (Campone ve ark., 2009) . Yıkama hacmi ve temizleme süresi de optimize parametrelerdir, ancak ekstraksiyon verimliliği üzerinde önemli bir etkisi yoktur. Yazarlar 40 °C ile 140 °C arasında farklı sıcaklıklar kullanmışlardır. Ancak Desmarchelier ve ark. (2007) oda sıcaklığında ekstraksiyon elde etmiştir. Bu yüzden muhtemelen 3 döngüye ihtiyaç duymuşlardır. Oysa diğer yazarlar tek bir döngüyle süreci tamamlamışlardır. Mikotoksinleri çıkarmak için 500 psi'den 2.000 psi'ye kadar farklı basınçlar da kullanılmıştır, ancak 1.500 psi en yaygın kullanılan basınç olmuştur.

Birkaç yazar, PLE kullanarak mikotoksinleri daha fazla temizleme adımı olmaksızın ve başarılı sonuçlarla ekstraksiyonu başrmışlardır. Bununla birlikte, mikotoksinlerin gıda ve yem maddelerinden ekstraksiyonu için PLE yöntemi kullanıldığında, parazitlerin varlığı genellikle oldukça yüksektir ve ekstraksiyondan sonra daha fazla temizleme adımları gereklidir. DE, bir dağıtma ajanı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Dahası, birçok yazar, mikotoksinler dışındaki analitleri ekstrakte ederken parazitlerin varlığını azaltmak için hücre içi temizleme sorbentleri olarak dispersiyon ajanları kullanmıştır. Aktive edilmiş magnezyum silikat (Florisil®), alümina veya silika gibi sorbentler, gıda örneklerinden misk kokularının ekstraksiyonu için uygun sonuçlarla test edilmiştir (Trabalon, 2017). Aynı dağıtıcı sorbentler ve diğerleri, tahıl örneklerinden FB'lerin ekstraksiyonu için test edilmiştir, ancak hiçbiri girişimlerin varlığında önemli bir azalma sağlamamıştır. Dahası, tamamlayıcı özelliklere sahip bir çözücü kullanılarak yapılan önceki bir hücre içi temizlik de iyi bir temizleme stratejisidir. Çünkü ekstraksiyondan önce numunedeki lipidleri uzaklaştırır ve bu da matris etkisinin yüzdesini azaltır. Bu metodoloji, örneğin özütleme çözücüsü olarak heksan ile bir ilk

özütlemeden ve ardından ilgili özütleme çözücüsüyle özütlemeden oluşur. İlk ekstraksiyondan elde edilen ekstrakt atılır ve ikinciden daha az lipid bileşiği içerecek olan ekstrakt analiz edilir.

2.6.1.3. Katı faz ekstraksiyonu

SPE, hedef analitlerin bir sorbent yüzey ile etkileşime girdiği sorptive bazlı bir ekstraksiyon tekniğidir. Bu teknikte yer alan adımlar Şekil 5'de gösterilmektedir. İlk olarak, sorbent, bileşimi matrisinkine benzer olan uygun bir çözücü çözeltisi ile koşullandırılır. Daha sonra, analitleri matristen ekstrakte etmek için numune sorbentten geçirilir ve ilgili analitleri kaybetmeden mümkün olduğunca çok safsızlığı gidermek için kartuş yıkanır. Son olarak, hedef analitler uygun bir organik çözücü kullanılarak ayrıştırılır. SPE kartuşları, çeşitli formatlarda ve farklı emici malzemelerle ticari olarak mevcuttur. Yaygın sorbentler Florisil®, alüminyum oksit (alümina), C18 ve silika jeldir. Bu sorbentlerin karışımları ve diğer sorbentlerle karışımları da ticari olarak mevcuttur ve mikotoksinlerin belirlenmesinde bir temizleme aşaması olarak yaygın şekilde uygulanmıştır (Chen, 2012). Mikotoksinleri ekstrakte etmek için en iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan ticari kartuş Waters tarafından sağlanan OASIS HLB'dir (Campone ve ark., 2009). Bu kartuşta, polaritesini artırmak için polimer yapısına polar gruplar eklenir. Mikotoksinlerin kutupsal özellikleri dikkate alındığında bu önemlidir. Bu kartuş literatürde farklı türlerdeki mikotoksinler ve matrisler için uygulanmıştır. Uygulama sıvı numunelerde doğrudan yapılır, ancak katı numunelerde ilk ekstraksiyon gereklidir. Örnek olarak, Cao ve ark. (2013) , PLE'den sonra bir OASIS HLB kullanarak çeşitli biyolojik numunelerden 28 mikotoksin için bir ekstraksiyon deneyi geliştirmiştir.



Şekil 5. SPE prosedürünün şematik protokolü

IAC, sorbent bileşikler yerine ilgilenilen analitlere özel antikorlar kullanan başka bir kartuş formatıdır. Hedef analitler, klasik SPE'de olduğu gibi adsorpsiyonla değil, immünoafinite ile tutulur. IAC tekniği, mikotoksinleri çıkarmak için en sık kullanılan SPE stratejilerinden biridir, çünkü bu sütunlar hedef mikotoksinler için oldukça spesifik ve seçicidir ve matris girişimlerini ortadan kaldırır. Bu metodolojinin dezavantajları, IAC'lerin maliyeti ve genellikle bir tür analit için tasarlanmış olmaları ve dolayısıyla sınırlı bir multi-mikotoksin belirleme kapasitesine sahip olmalarıdır (Beltrán ve ark., 2013). Bununla birlikte, birden fazla mikotoksin için kullanılabilen ticari olarak temin edilebilen birkaç IAC vardır. İki örnek, tahıllardan ve tahıl ürünlerinden AF'lerin, OTA ve *Fusarium* toksinlerinin eş zamanlı belirlenmesi için uygun olan Myco6in1 + ™ ve adından da anlaşılacağı gibi aflatoksinleri ve OTA'yı (Beltrán ve ark., 2013) belirlemek için kullanılan aflaochra HPLC ™ 'dir.

Bir temizleme stratejisi olarak yaygın olarak kullanılan başka bir format, sorbentin dağıldığı ve ekstraksiyon prosedürü sırasında numune ile temas halinde olduğu dSPE'dir. DSPE'de en yaygın kullanılan sorbentler MgSO4, PSA, GCB, Florisil®, alümina ve silika jeldir. Bazı yazarlar, mikotoksin ekstraksiyonu için sorbent kullanmanın etkililiğini değerlendirmiş (Campone ve ark., 2009; Zhou, 2016), ancak bir çalışma bu sorbentlerin önemli bir gelişme sağlamadığını bildirmiştir. GCB, pigmentleri ve sterolleri çıkarmak için yararlıdır ve PSA, Florisil® ve C18, yağ asitlerini ve şekerleri çıkarmak için kullanışlıdır. Her bir sorbent farklı amaçlar için faydalı olduğundan, bu sorbentlerin farklı karışımları kullanıldığında sonuçlar daha iyidir. Örneğin, Sharmili ve ark. (2016), bitkisel yağlardan çoklu mikotoksin ekstraksiyonu için 3: 1 C18: GCB oranının optimal olduğu sonucuna vardı ve Zhou ve ark. (2016), buğday unundan çoklu mikotoksin ekstraksiyonu için 1:1 PSA:C18 oranının optimal olduğu sonucuna varmıştır. Hedef mikotoksinlere ve matrislere bağlı olarak, temizleme adımı olarak farklı kombinasyonlar uygundur.

2.6.2. Ayırma ve algılama teknikleri

Ekstraksiyon aşamasından sonra, bazı mikotoksinlerin benzer fizikokimyasal özellikleri nedeniyle ve ME'yi mümkün olduğunca azaltmak için etkili bir kromatografik ayırmaya ihtiyaç duyulur, çünkü hedef mikotoksinleri ve istenmeyen birlikte elüsyon matris bileşenlerini ayırarak etkileşimler azaltılır. Günümüzde, sıvı kromatografi (LC) ve gaz kromatografisi (GC), mikotoksinleri ve bunların değiştirilmiş formlarını tanımlamak

için baskın tekniklerdir. Bir tekniğin veya diğerinin seçimi, hedef analitlerin fizikokimyasal özelliklerine (örneğin, polariteleri, uçuculukları ve termal stabiliteleri) bağlıdır (Hışıl, 2002a; 2002b).

Yukarıda bahsedildiği gibi GC, mikotoksinlerin tanımlanması ve ayrılması için kullanılmıştır. Bununla birlikte, GC, mikotoksinlerin polaritesinden dolayı birden fazla türetme reaksiyonu içerebilir. Dahası, çok çeşitli mikotoksinler genellikle bir arada bulunur. Sonuç olarak, GC, mikotoksinlerin belirlenmesi için tercih edilen ayırma tekniği değildir. Buna rağmen, bazı yazarlar son zamanlarda biyolojik örneklerde mikotoksinlerin belirlenmesi için GC-MS / MS'ye dayalı çoklu analit yöntemleri geliştirdiler . Örneğin Mahmoud ve ark. (2018), değiştirilmiş bir QuEChERS tekniği ile ekstrakte edilmiş tavuk karaciğerinden trikotesenlerin belirlenmesi için bir GC-MS / MS yöntemi geliştirdi. Başka bir örnek, Rodríguez-Carrasco ve arkadaşları tarafından geliştirilen metodolojidir. İnsan idrar örneklerinde çoklu mikotoksinlerin belirlenmesi için. İnsan idrarındaki mikotoksinleri belirlemek için LC'ye alternatif olarak bir GC yöntemi önerdiler. Bu örneklerin yanı sıra, GC tahıllar ve tahıl türevlerindeki mikotoksinlerin belirlenmesi için de kullanılmıştır .

Buna rağmen, esas olarak mikotoksinlerin polaritesi nedeniyle, LC yem ve gıda maddelerindeki mikotoksinleri analiz etmek için tercih edilen ayırma tekniği haline gelmiştir (Berthiller, 2007). LC ile iyi kromatografik sinyaller ve yüksek hassasiyet seviyeleri elde edilebilir. Ayrıca, LC tabanlı yöntemler, birden çok mikotoksini verimli bir şekilde ayırmayı mümkün kılar. Bu nedenle, tek bir LC yöntemine çok sayıda mikotoksin dahil edilebilir.

Tespit teknikleri söz konusu olduğunda, analizör olarak üçlü dört kutuplu (QqQ) MS / MS, çok çeşitli gıda, yem ve biyolojik numunelerde mikotoksinlere karşı oldukça hassas ve seçicidir. Örneğin, biyolojik numunelerdeki konsantrasyon seviyeleri, tahıl numunelerinde bulunanlardan çok daha düşüktür. MS/MS tabanlı yöntemler, mikotoksinlerin bu düşük konsantrasyon seviyelerinde belirlenmesini sağlar ve bu, örneğin diyet maruziyetini izlerken yararlıdır. Bunun aksine, rutin analizde, gıda ve yem numunelerinde yeterince düşük konsantrasyonlarda mikotoksinleri belirleyebilen tekli MS gibi daha basit algılama yaklaşımları kullanılır.

2.6.2.1. Sıvı kromatografi

Belirtildiği gibi, LC, polar ve uçucu olmayan özelliklerinden dolayı gıda, yem ve biyolojik numunelerden ekstraktlardaki mikotoksinleri ayırmak için en yaygın kullanılan tekniktir. Mikotoksin ayrışmasını etkileyen faktörlerden en önemlileri sabit faz ve hareketli faz seçimi.

Uygun sabit fazın seçilmesi, LC ayrımının belki de en önemli kısmıdır. Hedef mikotoksinlerin fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak kromatografik ayırma için birkaç sabit faz kullanılabilir. Ana mikotoksinlerin polaritesinden dolayı, ters fazlı kolonlar kullanılır (özellikle C18). Bununla birlikte, C8 (Pallaroni ve von Holst, 2003) ve pentaflorofenil gibi diğer ters fazlı sabit fazlar da kullanılabilir. Daha az apolar durağan fazlar mikotoksin elüsyonunu yavaşlatır. Bu nedenle, yaygın mikotoksin çeşitliliğine rağmen, çoğu çalışma Tablo 6'de açıklandığı gibi C18 sabit fazı kullanır. Örneğin, Romero-González ve ark. (2011) mikotoksinler, pestisitler ve biyopestisitler dahil olmak üzere 90'dan fazla bileşiğin eş zamanlı belirlenmesi için toplam kromatografik çalışma süresi 13 dakika olan bir C18 kolonu kullandı.

Küçük parçacıklarla dolu kısa dar kolonlar, 15.000 psi'ye kadar ultra yüksek basınçlar üretir. Sonuç olarak, analitlerin tutulma süreleri (RT) azalır ve bu da NIV ve DON gibi apolar mikotoksinlerin çoğunun ilk iki dakika içinde ayrışmasına neden olur. Bu sayede en yüksek çözünürlükten ödün vermeden analiz süresi kısaltılır. Bu nedenle, ultra yüksek performanslı LC (UHPLC), örneklerin çoğunun bu tekniği kullandığı Tablo 6'de detaylandırıldığı gibi, mikotoksinleri ayırmak için aslında en çok kullanılan tekniktir. Bu kolonlar genellikle 1,7 µm ile 1,8 µm arasındaki küçük partiküllerle doldurulur ve bu da daha kısa sürelerde iyi performanslar verebilir. Bu kolonlar ayrıca, Tablo 6'da açıklandığı gibi sıklıkla 2,1 mm'lik küçük çaplara sahiptir. Sonuç olarak, 0,2 ve 0,5 mL dk-1 arasında azaltılmış akış hızları, analiz süresi ve en yüksek performanstan ödün vermeden uygulanabilir. Daha geniş çaplı ve daha büyük partiküllü kolonlar kullanılıyorsa, Tablo 6'de açıklanan bazı örneklerde olduğu gibi akış hızlarının 1 mL dak-1 gibi daha hızlı olması gerekebilir. Yukarıdaki ile aynı örnekle devam ederek, Romero-González ve ark. . (2011) 0,45 mL dk-1 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) akış hızı uygularken, Berthiller ve ark. (2007) 0.8 mL dk-1 (100 mm x 4.6 mm, 3 µm) akış hızı uyguladı.

Çok yüksek basınçlarda, mikotoksinler belirlendiğinde önemli olan tek bir yönteme birden fazla mikotoksin dahil edilebilir. Çoklu mikotoksin LC yöntemleri, gıda

güvenliğini artırmak için önemli bir araçtır, çünkü küreselleşme ve işlenmiş ürünlerin artan varlığı, her türden mikotoksinin her tür matriste bulunabileceği anlamına gelir. Bu şekilde son yıllarda birkaç UHPLC-MS/MS bazlı multi-mikotoksin yöntemi geliştirilmiştir. Örneğin, Veprikova ve ark. (2015) 57 mikotoksinin eşzamanlı ayrılması ve belirlenmesi için bir LC-MS / MS yöntemi geliştirdi ve Sulyok ve ark. (2002) 87 mikotoksin ve bazı metabolitlerinin belirlenmesi için başka bir LC-MS / MS yöntemi geliştirdi. Bu makalelerin ikincisinde, hedef mikotoksinler, farklı iyonizasyon koşulları altında 21 dakikalık iki kromatografik çalışma içinde ayrıştırıldı. Beklendiği gibi, MRM modunda çoğu bileşik kolayca ayırt edilebilmesine rağmen, hedef analitlerin büyük miktarından dolayı birlikte elüsyondan kaçınılmadı.

Mobil fazların spesifik bileşimi, hedef mikotoksinlere ve analiz sırasında kullanılan polarite moduna bağlıdır. Organik faz için en yaygın iki çözücü ACN ve MeOH'dir. Tablo 6'da açıklanan örnekleri takiben, Dors ve ark. (2013), LC-DAD tarafından AF'ler, DON, OTA ve ZEA'nın belirlenmesi için MeOH, ACN ve su karışımlarından oluşan çeşitli mobil fazları test ettikten sonra organik mobil faz olarak ACN'yi kullandılar. Öte yandan, Vaclavikova ve ark. (2011), LC-QTrap ile benzer bir mikotoksin grubunun belirlenmesi için MeOH kullandı. Sulu faz genellikle esas olarak sudur, ancak bazı durumlarda küçük bir organik çözücü yüzdesi de eklenir .

Aynı zamanda, analit iyonizasyonunu iyileştirmek için her iki mobil faz da genellikle küçük yüzdelerde asitler ve küçük tuz konsantrasyonları ile karıştırılır. HCOOH ve CH3COOH en çok kullanılan asitlerdir ve amonyum asetat (NH_4Ac) ve amonyum format (NH_4HCO_2) en çok kullanılan tuzlardır çünkü MS iyonizasyonuyla uyumludurlar. Bazı durumlarda, mobil faz katkı maddeleri yalnızca bir faza eklenir. Bununla birlikte, tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek ve tüm analiz boyunca aynı konsantrasyonu sağlamak için, katkı maddeleri her iki mobil faza dahil edilebilir. Örneğin, Romero-González ve ark. (2016) sulu mobil faz olarak su 5 mM NH_4HCO_2 ve organik faz olarak MeOH kullanırken Schwartz-Zimmermann ve ark. (2017) her iki faza da su ve MeOH olan% 0.1 HCOOH eklediler. Diğer bir örnek ise Zachariasova ve ark. (2010), metanol organik fazına 5 mM NH_4HCO_2 eklendi, ancak mobil fazın daha sonra HCOOH tarafından asitleştirilmesi gerekti, çünkü FB'ler önceki koşullar altında tespit edilemezdi.

2.6.2.2. Kütle spektrometresi algılama

Kromatografik ayırmadan sonra, saptama ve kantifikasyon tekniklerinin de birleştirilmesi gerekir. Son yirmi yılda, MS'ye bağlı LC, mikotoksin analizinde kullanılan ana metodoloji haline geldi. Bununla birlikte, başlangıçta en yaygın dedektörler floresans (FLD) Campone ve ark. (2009), ultraviyole (UV) ve diyot dizisi (DAD) dedektörleriydi. Bu belirleme tekniklerinin MS gibi diğerlerine göre daha az özelliği vardır, ancak elde edilen sınırlar rutin ve hizmet laboratuvarları için yeterlidir. Bu laboratuvarlar, konsantrasyon seviyelerinin mevcut mevzuata uygun olup olmadığını görmek için düzenlenmiş mikotoksinlerin varlığını belirler. Sonuç olarak, bu ekipmanlar gıda ve yem örneklerindeki mikotoksinleri belirlemek için sıklıkla kullanılır. Bir dezavantaj, bu analitik yöntemlerin genellikle her bir analiz için yapısal olarak ilişkili tek bir mikotoksin grubuyla sınırlı olmasıdır. Tablo 5'de verilen örneklerde görülebileceği gibi, Dors ve ark. (2013), LC-DAD ile 6 mikotoksini belirlemek için bir yöntem geliştirdi ve Campone ve ark. (2009) LC-FLD ile 4 AF için bir yöntem geliştirdi.

Dolayısıyla, yukarıda bahsedildiği gibi, LC-MS yöntemlerinin mikotoksin analizinde daha fazla uygulaması vardır. Son yirmi yılda, LC-MS yöntemleri, tek bir analizde yapısal olarak çok çeşitli mikotoksinleri analiz eden ve aynı zamanda duyarlılığı artıran çoklu mikotoksin yöntemlerini içerecek şekilde genişletildi. Kütle spektrometre detektörleri, mikotoksin çalışmaları için vazgeçilmez araçlar haline gelmiştir, çünkü yukarıda tartışıldığı gibi, birkaç mikotoksin genellikle düşük konsantrasyon seviyelerinde bir arada bulunur.

Ek olarak, mikotoksinler çok düşük konsantrasyon seviyelerinde çok çeşitli karmaşık matrislerde mevcut olduğundan, MS / MS, QqQ, quadrupole - Time of Flight (Q -ToF) ve dört kutuplu iyon tuzağı (QTrap). Son yıllarda, mikotoksinlerin belirlenmesinde en çok kullanılan ikili yaklaşım QqQ'dur çünkü çalışmaların çoğu, düşük konsantrasyonlarda gıda ve yem örneklerinde hedef mikotoksinlerin belirlenmesi ve miktarına odaklanır ve QqQ analizörü çoklu reaksiyon izlemede yüksek hassasiyet sağlar. (MRM) modu. Bu modlar kullanıldığında, genellikle her bir mikotoksin için üç geçiş seçilir: biri en yoğun olan geçişi nicelendirir ve ikisi, hedef mikotoksini doğrulamak için geçişleri niteler. Yüksek hassasiyetin bir sonucu olarak, tespit ve kantifikasyon limitleri düşük olabilir. Tablo 6, bu sınırların ilgili mikotoksine, matrise ve ekstraksiyon ve tayin tekniklerine bağlı olabileceğini göstermektedir. Önemli miktarda parazit içeren karmaşık

matrisler, düşük sınırlara ulaşmayı zorlaştırır. Örneğin, AF'ler ve daha spesifik olarak AFG1, genellikle düşük miktar belirleme sınırlarında elde edilirken, DON genellikle daha yüksek kantifikasyon sınırlarında elde edilir. Örnek olarak Tablo 6, Arroyo-Manzanares ve ark. bir QuEChERS ekstraksiyonu ve ardından biri beyaz pirinç olan çeşitli tahıl örneklerinden LC-QqQ kullanarak 15 mikotoksinden oluşan karmaşık bir grup belirledi. Bu matriste, AFG1 için yöntem nicelik sınırı (MQL) 0,23 µg kg^{-1} iken, DON için 18,2 µg kg^{-1} idi ve bu, neredeyse iki büyüklük derecesinin bir farkıdır. Beyaz pirinç örneğinden devam ederek, NIV için elde edilen MQL'in 233 µg kg-1 olduğu da belirtilmelidir. Beltrán ve ark. (2009), SLE ve ardından LC-QqQ kullanarak mısır çekirdeklerinde, kuru makarnada ve çok çörekli bebek maması örneklerinde AFG1 ve DON varlığını belirlediklerinde benzer sonuçlar elde ettiler. Kuru makarnada ve çok çörekli bebek mamasında AFG1 için MQL'ler sırasıyla 0,3 µg kg^{-1} ve 0.5 µg kg^{-1} idi ve DON için bunlar her ikisi için 80 µg kg-1 idi. Bu çalışmada, mısırda DON için elde edilen MQL (150 µg kg-1), yukarıda ayrıntıları verilen diğer matrislerde elde edilenin neredeyse iki katı olduğundan, matrisler arasındaki farklar da gözlemlenebilir. Bu iki örneğin gösterdiği gibi, mikotoksinler arasındaki farklar dikkate değerdir, ancak matrisler arasındaki farklar da öyle. Sonuç olarak, mikotoksinlere ve ilgili matrislere özel dikkat gösterilmelidir.

En uygun tandem yaklaşımın seçimi araştırmanın amacına bağlıdır. Q-ToF analizörü, numunelerdeki analitlerin tanımlanmasını doğrulayan niteliksel bilgiler sağlar. Sonuç olarak, Q-ToF genellikle hedeflenmemiş analizler için ve genellikle mikotoksin metabolitlerinin değerlendirilmesi için kullanılır. QqQ gibi diğer hibrit yaklaşımlardan genellikle daha az duyarlı olmasına rağmen mikotoksinlerin varlığını belirlemek ve doğrulamak için kullanılabilir. Tablo 6'deki iki Q-ToF analizi örneğinden Nathanail ve ark. (2016), bu cihazı HT-2 ve T-2'nin kararlı izotopik etiketlemesi ve planta biyotransformasyonundan çeşitli türev ürünlerin tanımlanması için kullandı. Benzer şekilde Schwartz-Zimmermann ve ark. (2017), biyolojik numunelerde DON-sülfonatlar ve DON-glukoronidler gibi aynı öncül iyonlara sahip birkaç bileşiği belirlemek için Q-ToF kullandı. Öte yandan, Kostelanska ve ark. (2016), DON'u ve bira ve bira alt ürünlerinden bazı türevlerini ölçmek için Q-ToF'u kullandı. QqQ analizörü ile elde edilen sonuçlara benzer şekilde minimum düzeyde girişim ve düşük tespit limitleri (tüm analitler için 1 µg L^{-1}) buldular.

Yukarıda bahsedildiği gibi, mikotoksinleri belirlemek için kullanılan diğer bir ikili yaklaşım QTrap'tir. Bu analizör performansı geliştirir ve tam tarama ve ürün iyon tarama modlarında hassasiyeti artırır ve aynı zamanda doğru niceleme ve yapısal bilgi sağlar. Dolayısıyla, QTrap analizörü kalitatif ve kantitatif bilgi verir. Tablo 6'de örneklendiği gibi, birkaç makale mikotoksinleri ve modifiye edilmiş mikotoksinleri belirlemek için QTrap kullanmıştır. Örneğin Berthiller ve ark. (2007), DON glukozitlerini belirlemek için LC- (APCI) QTrap kullandı ve Schwartz-Zimmermann ve ark. (2017), DON glukuronidlerini belirlemek için LC-QTrap kullandı.

Tablo 5. Mikotoksinlerin belirlenmesi için kullanılan yaygın teknikler

Mikotoksinler	Sütun ve Akış Hızı	Fazlar	Belirleme Yöntemi	LOQ	Kaynak
ABF1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, HT-2, T-2, diğer pestisitler ve biyopestisitler	C_{18}, 100 x 2.1 mm, 1.7 µm 0.45 mL dk^{-1}	A: MeOH B: Su 5 mM NH4HCO2	LC-(ESI)QqQ	10	Sharmili , 2016
17 Fusarium mikotoksini	C_{18}, 150 x 2.1 mm, 5 µm 0.3 mL dk^{-1}	A: 94:5:1 B: 2:97:1 Su/MeOH/ CH3COOH her ikisi de 5 mM NH4Ac ile	LC-(ESI)QqQ	0,64 – 30,6 NIV ve Fusarenon-X hariç (41.2-175)	Chilaka, 2016
AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, OTA, HT-2, T-2, FB1, FB2, ZEA	C_{18}, 50 x 2.1 mm, 1.7 µm 0.3 mL dk^{-1}	A: su B: MeOH Her ikisi de 0,5 mM NH4Ac, %0,1 HCOOH ile	LC-(ESI)QqQ	0,3 – 3,5 DON (80-150) ve HT-2 (6.5-15) hariç	Beltrán, 2009
ABF1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, OTA, HT-2, T-2, FB1, FB2, ZEA, NIV	C_{18}, 50 x 2.1 mm, 1.8 µm 0.4 mL dk^{-1}	A: su B: MeOH Her ikisi de 5 mM NH4HCO2, %0,3 HCOOH ile	LC-(ESI)QqQ	0.2 – 3.4 (beyaz pirinç) DON (18.2) hariç	Manzanares, 2014
BF1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, OTA, HT-2, T-2, FB1, FB2, ZEA	C_{18}, 100 x 2.1 mm, 1.7 µm 0.4 mL dk^{-1}	A: su B: MeOH Her ikisi de 5 mM NH4Ac ile	LC-(ESI)QTrap	0.1 - 10	Vaclavikova, 2013

DON-3- glikozit, DON-15-glikozit, DON, 3AcDON, 15AcDON	C_{18}, 100 x 4.6 mm, 3 µm 0.8 mL dk^{-1}	MeOH/su 15:85	LC-(ESI)QTrap	LODs: 6 – 20	Berthiller, 2007
31 farklı Fusarium, Aspergillus, Penicillium ve Claviceps metaboliti	İnertsil fazı 150 x 2.1 mm, 5 µm 0.1-0.2 mL dk-1	A: %0.2 HCOOH içeren su B: %0,2 HCOOH ile ACN C: 1 mM NH4Ac D: CAN	LC-(ESI)QqQ	1 – 620 (buğday)	Kokkonen , 2009
6 Fusarium mikotoksinleri	C_{18}, 150 x 2 mm, 3 µm 0.2 mL dk^{-1}	A: ACN B: MeOH 20 Mm NH4HCO	LC-(ESI)QqQ	0.05 – 0.5	Serrano , 2013
izo-DON glukuronidler izo-deepoksi-DON glukuronidler	C_{18}, 150 x 2.1 mm, 2.6 µm 0.25 mL dk^{-1}	A. su B: MeOH Her ikisi de %0,1 HCOOH ile	LC-(ESI)QToF LC-(ESI)QTrap	kalitatif tahlil	Zimmerman, 2017
HT-2, T-2	C_{18}, 150 x 2.1 mm, 1.8 µm 0.25 mL dk^{-1}	A. su B: MeOH Her ikisi de %0,1 HCOOH ile	LC-(ESI)QToF	kalitatif tahlil	Nathanail, 2016
T-2 ve HT-2	C_{18}, 150 x 4.6 mm, 3 µm 1 mL dk^{-1}	A. su B: CAN	LC-DAD	T-2: 254.1 HT-2: 229.	Medina, 2010
AFB1, AFB2, AFG1, DON, ZEA, OTA	C_{18}, 250 x 4.6 mm, 4 µm 1 mL dk^{-1}	A. su B: CAN	LC-DAD	0.18-1.5	Dors ve ark., 2013
ABF1, AFB2, AFG1, AFG2	C_{18}, 250 x 4.6 mm, 5 µm 1 mL dk^{-1}	MeOH/ACN/water 20:20:60	LC-FLD	0.04-0.12	Campone ve ark., 2009

İyonizasyon modlarından, elektrosprey iyonizasyon (ESI), özellikle çevresel ve gıda örneklerinde polar ve orta polar bileşikler için en çok kullanılanıdır. Bunu, özellikle orta polar ve polar olmayan bileşikler için atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) izler. ESI ve APCI, sağlamlıkları, yüksek duyarlılıkları, doğrulukları, seçicilikleri ve pratik olarak tüm analit polariteleri çeşitleriyle uyumlulukları nedeniyle en çok kullanılan kaynaklardır . Her ikisi de, moleküller aşırı derecede parçalanmadığı için yumuşak iyonizasyon yöntemleri olan atmosferik basınç iyonizasyon arayüzleridir. Yayınlanan çalışmaların çoğu iyonizasyon modu olarak ESI'yi kullanır çünkü daha yüksek APCI kaynak parçalanması sayesinde daha duyarlıdır (bkz. Tablo 6). Ek olarak ESI, polar mikotoksin metabolitleri için, özellikle yüklü metabolitler için APCI'den daha uygundur, çünkü APCI yüklü iyonları gaz fazına aktaramaz . Ayrıca, ESI'nin APCI'dan daha sağlam göründüğü de bildirilmiştir . Öte yandan, yukarıda açıklandığı gibi APCI, orta polar ve polar olmayan bileşikler için daha uygundur ve sıklıkla DON ve DON glukozitler gibi birkaç Fusarium mikotoksinin iyonizasyonu için kullanılır . Sonuç olarak, hedef mikotoksinlere bağlı olarak, iki iyonizasyon kaynağı olan ESI ve APCI'nin verimliliğinin karşılaştırmalı bir değerlendirmesi sıklıkla yapılır (Zachariasova, 2010). Örnek olarak Berthiller ve ark. (2009), iyonizasyon kaynağı olarak APCI kullanarak buğday ve mısırda DON glukozitlerinin doğal oluşumunu belirlemek için bir yöntem geliştirdiler (Tablo 6). Bu arayüzler, hedef analitler arasındaki iyonizasyon sürecindeki olası rekabet ve matris bileşiklerinin varlığı nedeniyle iyonizasyon zorluklarına maruz kalabilir. Bu zorluklar, sinyalleri artırabilir veya baskılayabilir, bu da analit konsantrasyonlarının fazla tahmin edilmesine veya yetersiz tahmin edilmesine yol açabilir. Bu durumlarda, parazitlerin varlığını azaltmak için temizleme adımları, matriks uyumlu kalibrasyon eğrileri ve / veya izotopik olarak etiketlenmiş referans standartların kullanımı, bu iyonizasyon zorluklarını çözmek ve analitleri daha doğru bir şekilde ölçmek için kullanılabilir.

Uygun bir polarite modunun (pozitif veya negatif) seçilmesi de önemlidir. Bununla birlikte, tek bir LC yöntemiyle birden fazla mikotoksin belirlendiğinde, analit duyarlılığını artırmak için genellikle farklı polarite modları gereklidir. Bazı yazarlar aynı kromatografik çalışmada iki iyonizasyon modunu birleştirirken, diğer yazarlar farklı polarite modları ile iki ardışık kromatografik çalışma kullanmışlardır. Örneğin, Beltrán ve ark. (2009) hem pozitif hem de negatif iyonizasyon modlarında tek bir kromatografik

çalışmada 11 mikotoksin belirledi. Sulyok ve ark. (2002), biri pozitif modda ve biri negatif modda olmak üzere iki ardışık kromatografik çalışmada 87 mikotoksin belirlemiştir. 31 hedef mikotoksinin duyarlılığını artırmak için Kokkonen ve ark. (2010), hem pozitif hem de negatif polaritelerde iki ardışık kromatografik çalışma kullanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Mısır İrmiğinden İmal Cipslerin Temini

Çalışmada, evren olarak İstanbul'daki ulusal, yerel marketler ve pazar yerleri seçilmiştir. Ulusal ve uluslararası iştiraklerin üretmiş olduğu mısır irmiği cipsleri iki grup halinde perakende satış noktalarından toplanmış, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Laboratuvarlarına getirilen örneklerin menşei ve etiket bilgileri kaydedilmiştir. Toplam 100 paket örnek toplanmıştır.

3.2. UV ile Vizüel Muayene

Kayıt altına alınan örneklerin paketleri %70 etanol ile dezenfekte edilerek açılmıştır. Bir miktar örnek temiz porselen bir tabağa aktarılarak karanlık ortamda, 366 nm UV lamba (Merck 1.3203.0001) kullanılarak vizuel olarak aflatoksin muayenesine tabi tutulmuştur.

3.3. LC/MS-MS Yöntemi ile Mikotoksin Analizi

Örneklerde Aflatoksin B1, Toplam Aflatoksin (B1+B2+G1+G2), Okratoksin A, Zeralenon (ZEA), Deoksinivalenol (DON), Fumonisin FB1, FB2, Sitrinin, HT-2 ve T-2 analizi için LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, dezenfekte edilerek açılan paketlerden 50 g numune stomacher poşetine alınarak, içlerine nem tutucu silika jel paketlerinden ilave edilmiştir. LC/MS-MS cihazı için Nanolab Laboratuvar Hizmetleri Kimya Gıda Danışmanlık Çevre Eğitim San. ve Tic. Ltd. Şti.'den hizmet alımı yapılmıştır.

3.3.1. Kullanılan Alet Ekipman

- 50 mL' lik falkon tüp
- Otomatik pipet (100 µL, 1000 µL ve 5000 µL)
- 1 mL mini santrifuj tüpü
- Pipet Ucu
- Vorteks
- Çoklu karıştırıcı (Shaker)
- Santrifüj
- 0,45 µm 'lik filtreler
- HPLC Kolon C18 (2,1mm x 50mm x 3µ)
- LC/MS-MS Cihazı (Agilent 6420 Triple Quad/G6420A/SG 13387002)
- Homojenizasyon (öğütme) cihazı

3.3.2. Kullanılan Kimyasallar

Ekstrakisyon Çözeltisi: 800 mL metanol 200 mL su karıştırılarak hazırlanır.

HPLC Hareketli Faz (A): 0,252 g amonyum format 1000 mL MS grade suda çözündürülür ve üzerine 1 ml formik asit eklenir.

HPLC Hareketli Faz (B): 0,252 g amonyum format 1000 mL MS grade metanolde çözündürülür ve üzerine 1 mL formik asit eklenir.

Standart Solusyonlar: Aflatoksin Standartları (Pa Grup), Okratoksin Standardı (Pa Grup), Fumonisin Standartları (Pa Grup), DON Standardı (Triology), ZEA Standardı (Triology), Citrinin Standardı (TRC), HT-2 Standardı (HPC), T-2 Standardı (HPC).

3.3.3. Örneklerin Hazırlanması

Örnekler öğütücüde ve karıştırıcıda su katılarak homojen hale getirilir. Homojenizasyon aşamasında kullanılan su miktarı kaydedilerek, tartım esnasında hesaba katılır. Örneklerden 5 g tartılır.

3.3.4. Örneklerin Ekstraksiyonu

Tartılan örnekler üzerine 12 mL özütleme çözeltisinden koyularak iki saat çalkalanır. Süre sonunda 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir, 0,45 µL'lik filtreden geçirilerek 15 mL'lik santrifüj tüpünde toplanır. Elde edilen örnek süzüntüsünden 800 µL çekilir 1 ml'lik viale alınır. Üzerine 800 µL hareketli faz A eklenerek cihaza verilir.

3.3.5. LC/MS-MS Analiz

3.3.5.1. HPLC Analiz

Akış Hızı: 0,35 ml/dak

Enjeksiyon Hacmi: 20 µl

Kolon Sıcaklığı:35 °C

Tablo 6. Gradient Akış Programı

Zaman (dakika)	A [%]	B [%]
0,00	75,0	25,0
3,00	30,0	70,0
5,00	0,0	100
7,00	0,0	100
7,10	100	0,0

3.3.5.2. MS Analiz

Delta EMV: 400(+), 400(-)

Gas Sıcaklığı:350ºC

Gas Flow:11 l / dakika

Nebulizer:30 psi

Capillary: 3500 V (+), 2500 V (-)

Tablo 7. MS-MS İyon geçişleri

Bileşik Adı	Precursor İyon	Product İyon	Ret. Time (dk)	Delta Ret Time	Fragmentor	Collusion energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
Aflatoksın B1	313,2	269,9	4,8	1,08	130	28	7	Positive
Aflatoksın B1	313,2	257	4,8	1,08	130	24	7	Positive
Aflatoksın B1	313,2	285,2	4,8	1,08	130	12	7	Positive
Aflatoksın B2	315,1	287	4,64	1,18	130	24	7	Positive
Aflatoksın B2	315,1	259	4,64	1,18	130	32	7	Positive
Aflatoksın B2	315,1	243	4,64	1,18	130	44	7	Positive
Aflatoksın G1	329,1	311	4,43	1,06	100	20	7	Positive
Aflatoksın G1	329,1	282,9	4,43	1,06	100	24	7	Positive
Aflatoksın G1	329,1	243,1	4,43	1,06	100	28	7	Positive
Aflatoksın G2	331	313	4,25	0,73	90	24	7	Positive
Aflatoksın G2	331	245	4,25	0,73	90	32	7	Positive
Aflatoksın G2	331	216,9	4,25	0,73	90	40	7	Positive
Citrinin	251,1	233	5,39	1,13	88	12	7	Positive
Citrinin	251,1	205	5,39	1,13	88	28	7	Positive
Citrinin	251,1	91	5,39	1,13	88	50	7	Positive
Deoksinivalenol	297,1	249,1	2,39	2,82	90	8	7	Positive
Deoksinivalenol	297,1	231	2,39	2,82	90	8	7	Positive
Deoksinivalenol	297,1	202,9	2,39	2,82	90	12	7	Positive
Fumonisin B(1)	722,4	704,3	5,11	0,99	116	32	7	Positive
Fumonisin B(1)	722,4	352,2	5,11	0,99	116	40	7	Positive
Fumonisin B(1)	722,4	334,2	5,11	0,99	116	44	7	Positive
Fumonisin B(2)	706,4	337,1	5,66	0,6	90	32	7	Positive
Fumonisin B(2)	706,4	319	5,66	0,6	90	36	7	Positive
Ht-2 Toxın	442,2	263,2	5,3	0,96	80	8	7	Positive
Ht-2 Toxın	442,2	197,2	5,3	0,96	80	12	7	Positive
Okratoksın A	404,1	358	5,98	1,01	102	12	7	Positive
Okratoksın A	404,1	238,9	5,98	1,01	102	24	7	Positive
Okratoksın A	404,1	220,9	5,98	1,01	102	40	7	Positive
T-2 Toxın	484,2	305	5,63	1,06	88	8	7	Positive
T-2 Toxın	484,2	215	5,63	1,06	88	16	7	Positive
T-2 Toxın	484,2	185	5,63	1,06	88	20	7	Positive
Zearalenone	317,2	273,1	6,07	1,05	130	12	7	Negative
Zearalenone	317,2	175,1	6,07	1,05	130	20	7	Negative

3.3.6. Hesaplama

Sonuç (µg/kg)=$A \times SK \pm U\ (X)$

A: Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak bunulan etken madde miktarı(µg/ml)
SK: Seyreltme katsayısı
U (X): Genişletilmiş Belirsizlik x Sonuç

Genişletilmiş Belirsizlik=Standart Belirsizlik x k

k= 2 (%95 güven aralığı için genişleme kat sayısı)

Seyreltme Katsayısı= m veya VÖ / VS

m: Tartılan örnek miktarı(g)
Vö: Örnekten alınan hacim (mL)
Vs: Son hacim (mL)

4. BULGULAR

4.1. Mısır İrmiğinden İmal Cipslerin UV ile Vizüel Muayene Sonuçları

Örneklerin 366 nm UV altında yapılan vizuel kontrolleri sonucunda 8 örnekte yoğun ışıma, 24 örnekte hafif ışıma tespit edilmiştir. 68 örnekte ise ışıma tespit edilememiştir. Yoğun ışımalar mavi-yeşil renkte gözlemlenmiş, hafif ışımaların ise sarımsı-beyaz renkte olduğu tespit edilmiştir (Tablo 9).

4.2. LC-MS/MS'de Kullanılan Yöntemin Geri Kazanım Çalışmaları

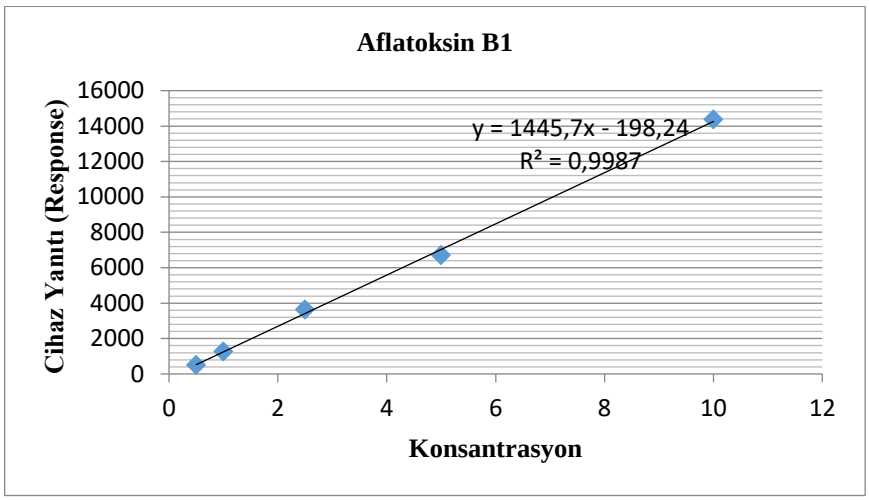
Çalışmamızda LC-MS/MS'de kullanılan yöntemde multitoksin analizlerinde uygulanan Limit of Detection (LOD), Limit of Quantification (LOQ), geri kazanım ve Standart belirsizlik oranları Tablo 9' de belirtilmiştir.

Tablo 8. Tahıl ve tahıl içerikli ürünlerde multitoksin analizinde geri kazanım sonuçları

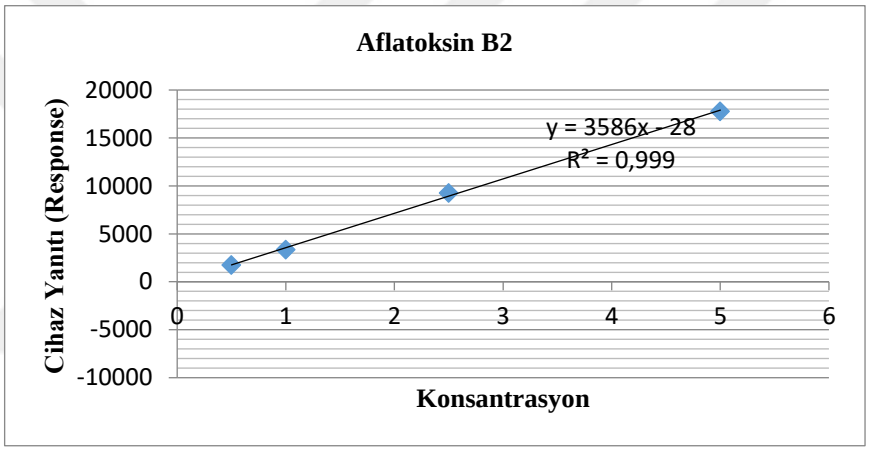
Mikotoksin Türü	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Geri Kazanım (%)	Standart Belirsizlik
Deoksinivalenol	29,78	95,03	91,586	0,135
Aflatoksin G2	0,24	0,78	96,759	0,156
Aflatoksin G1	0,23	0,74	92,948	0,291
Aflatoksin B2	0,26	0,82	94,698	0,175
Aflatoksin B1	0,24	0,75	95,228	0,169
Fumonisin B1	32,52	103,79	97,684	0,122
HT-2 Toksin	3,47	11,08	103,529	0,185
Citrinin	31,80	101,50	99,714	0,143
T-2 Toksin	3,31	10,55	102,591	0,169
Fumonisin B2	17,87	57,04	90,481	0,175
Okratoksin-A	0,27	0,85	94,209	0,125
Zearalenone	3,07	9,80	93,968	0,139

4.3. Kalibrasyon Eğrileri

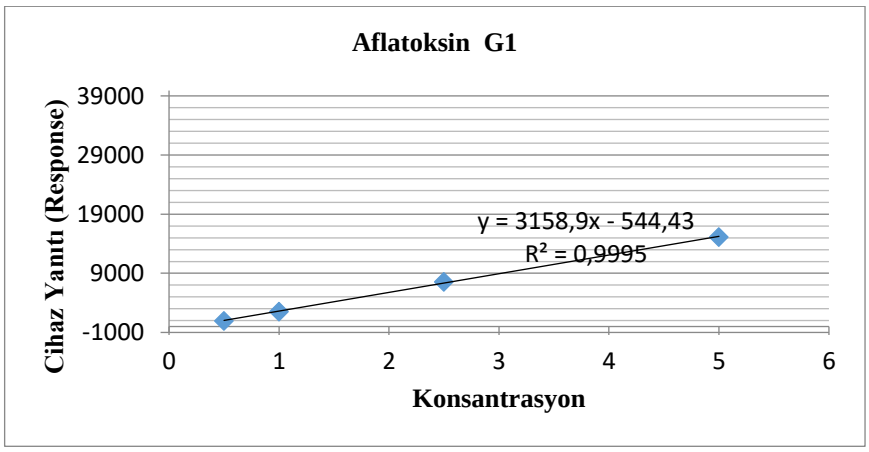
Çalışmamızda LC/MS-MS cihazında kullanılan mikotoksin standartlarının analizinden elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 6-17'de verilmiştir.



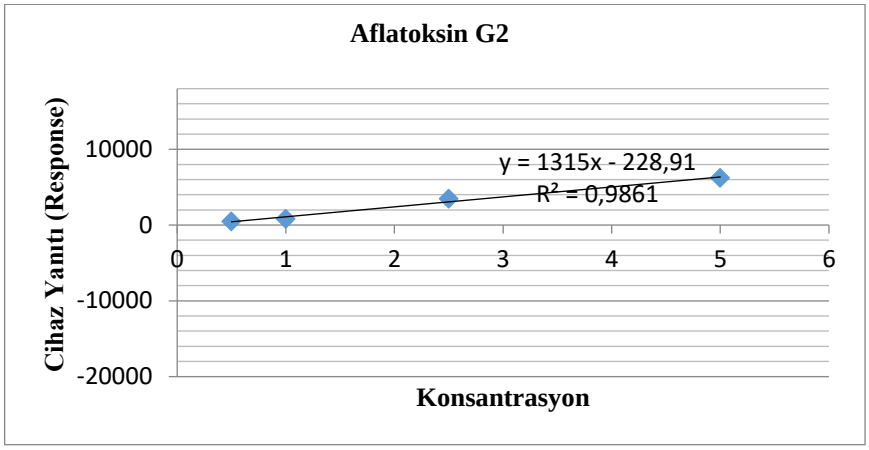
Şekil 6. Aflatoksin B1 kalibrasyon eğrisi



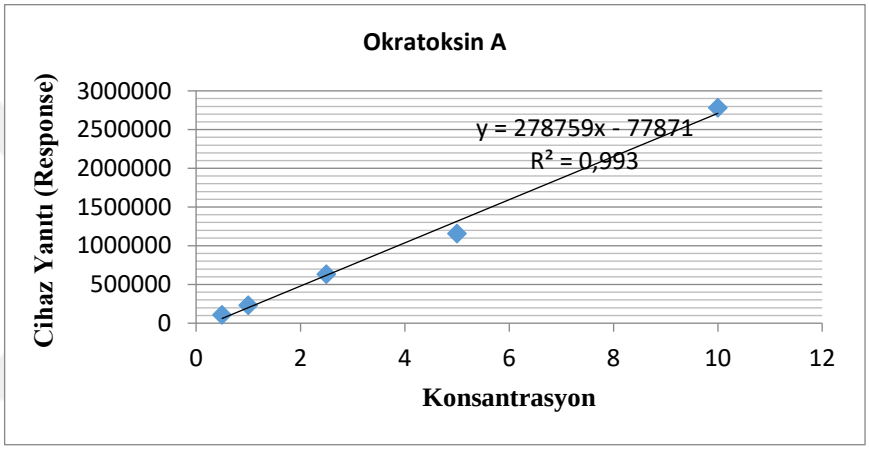
Şekil 7. Aflatoksin B2 kalibrasyon eğrisi



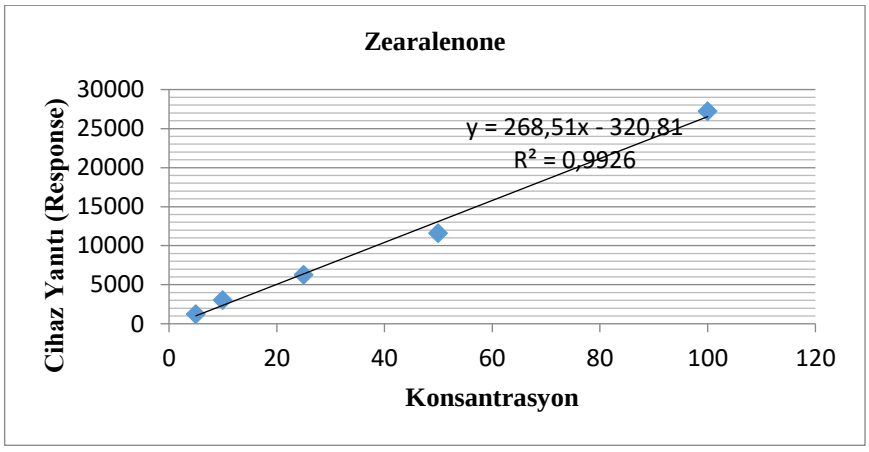
Şekil 8. Aflatoksin G1 kalibrasyon eğrisi



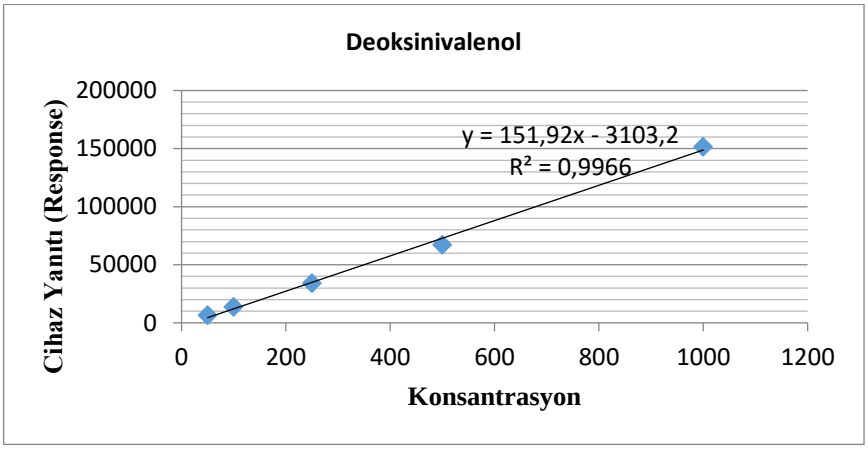
Şekil 9. Aflatoksin G2 kalibrasyon eğrisi



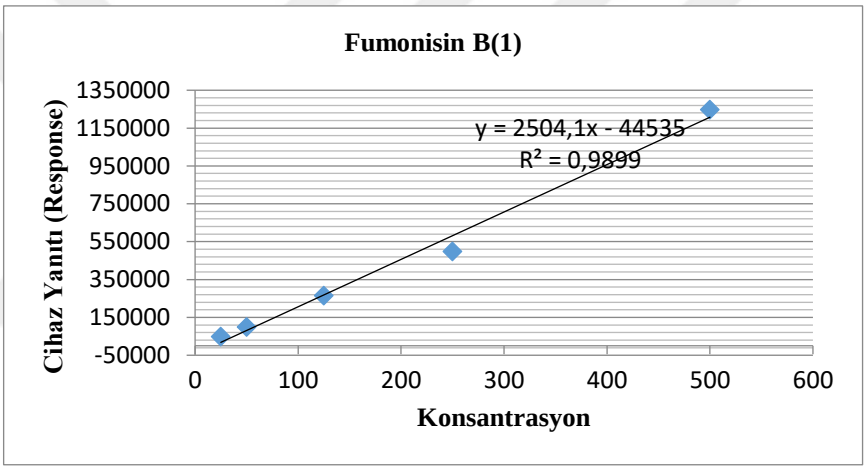
Şekil 10. Okrataoksin A kalibrasyon eğrisi



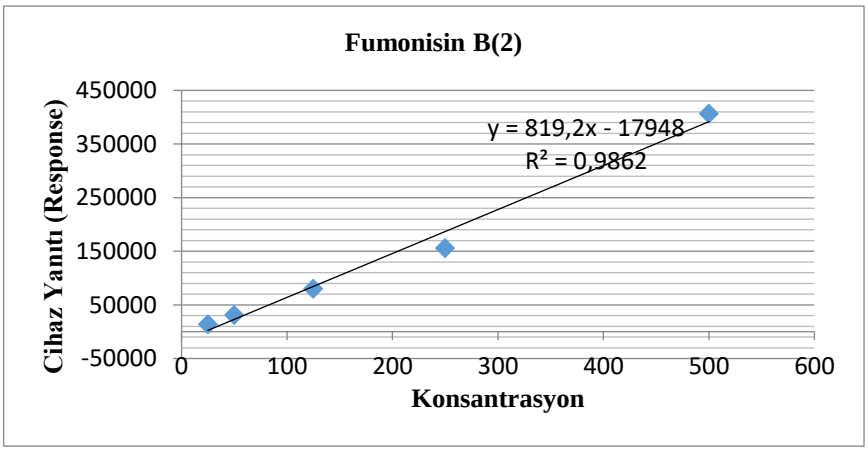
Şekil 4. Zearalenon kalibrasyon eğrisi



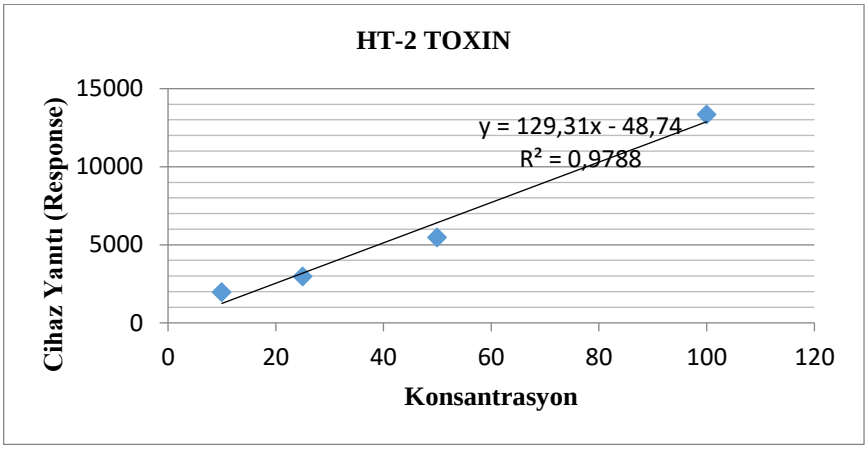
Şekil 5. Deoksinivalenol kalibrasyon eğrisi



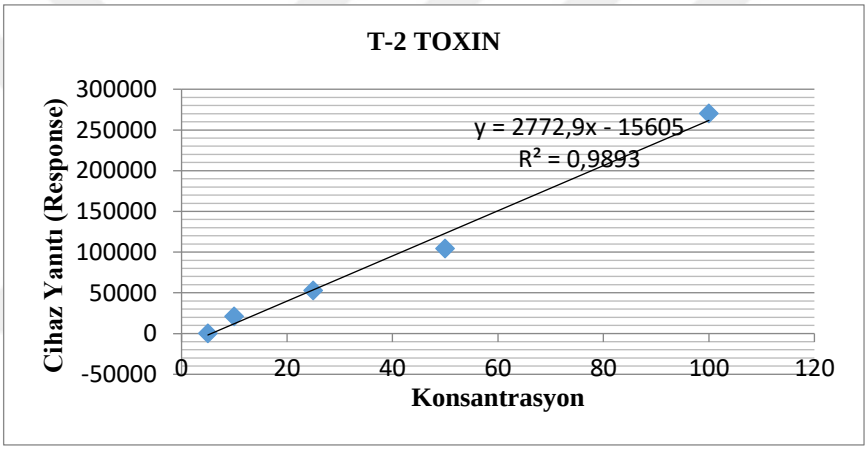
Şekil 6. Fumonisin B1 kalibrasyon eğrisi



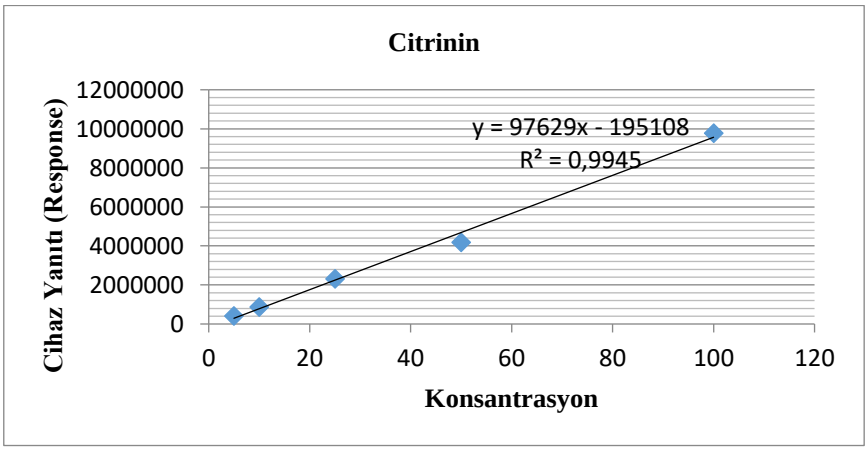
Şekil 14. Fumonisin B2 kalibrasyon eğrisi



Şekil 7. HT-2 Toksin kalibrasyon eğrisi



Şekil 16. T-2 Toksin kalibrasyon eğrisi



Şekil 17. Sitrinin toksini kalibrasyon eğrisi

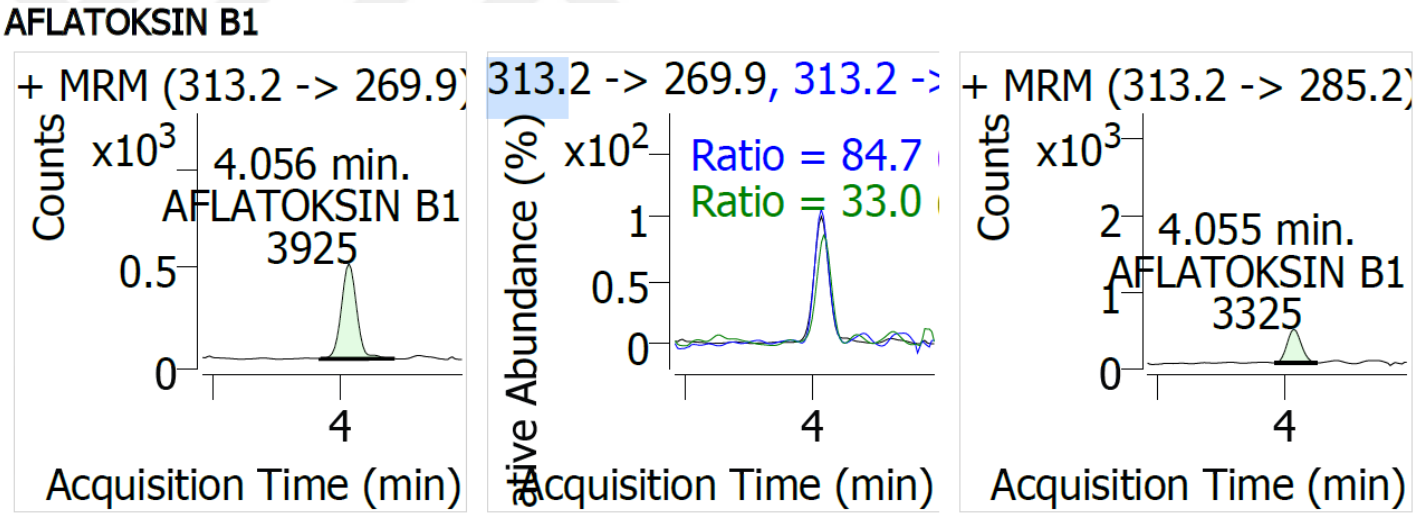
4.4. Mikotoksin Analiz Sonuçları

Yapılan analizler sonucunda 3 örnekte (%3) AFB1, 2 örnekte (%2) Fumonisin B1 ve Fumonisin B2 tespit edilmiştir (tablo 9). Okratoksin A, Zeralenon, Deoksinivalenol, Sitrinin, HT-2 ve T-2 toksin hiç bir örnekte tespit edilememiştir.

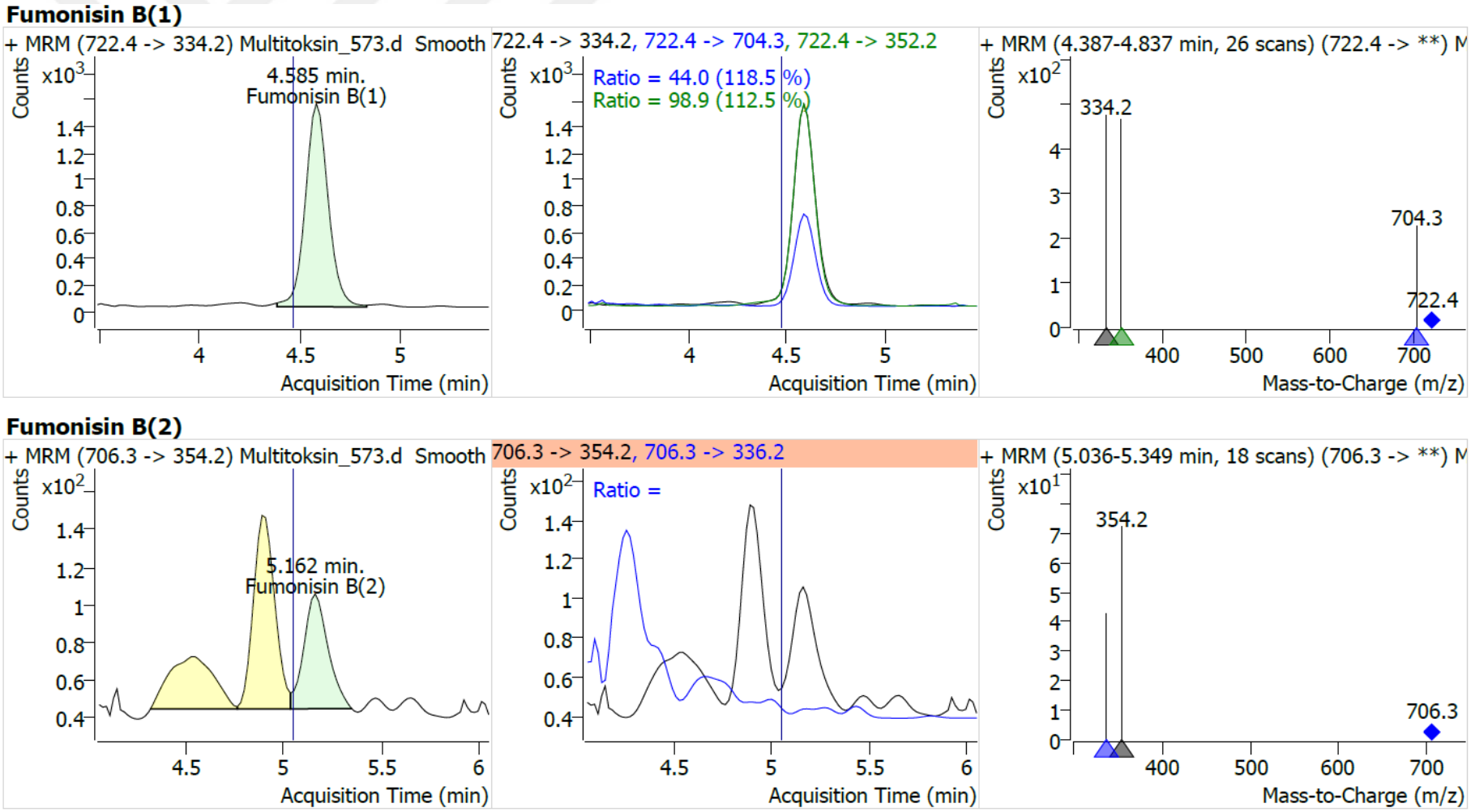
Tablo 9. Mikotoksin tespit edilen örneklerin değerleri

Mikotoksin Tespit Edilen Örnek	AFB1(ppb)	Toplam AF (ppb)	FB1(ppb)	FB1+ FB2(ppb)	UV Işıma
1	5*	8*	T.E	T.E	Mavi-yeşil
2	8*	13*	T.E	T.E	Mavi-yeşil
3	17*	25*	T.E	T.E	Mavi-yeşil
4	T.E	T.E	151	172	Sarımsı-beyaz
5	T.E	T.E	151	172	Sarımsı-beyaz

*: TGK Bulaşanlar Yönetmeliği'nde mısır irmiğinden imal cipslerde belirlenen maksimum limitleri aşan değer



Şekil 18. . Pozitif bir örnekte AFB1 kromotogramı



Şekil 19. Pozitif bir örnekte Fumonisin B1ve B2 kromotogramı

5. TARTIŞMA

Ülkemizde mısır irmiğinden imal edilen cipslerle ilgili olarak LC-MS/MS yöntemi kullanılarak risk unsuru tüm mikotoksin profilini ortaya koyan bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Dünya perspektifinde ise mısır irmiğinden imal edilen cipslerle ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. İncelenen mikotoksin profilleri ise oldukça yetersizdir. Küfler, bitkinin vejetasyonunda, hasat esnasında ve depolama süreçlerinde hububatlarda sıcaklık, nem ve çevresel diğer unsurların etkisiyle çoğalabilir. Aflatoksin, Okratoksin, Fumonisin, Deoksinivalenol, Zearalenon, Trikotesen gibi mikotoksinleri üretebilirler (Sweeney ve Dobson, 1998).

"Mısır irmiğinden imal cipslerde mikotoksin profilleri sağlık için risk oluşturacak düzeyde mi?", "Mısır irmiğinden imal cipslerde IARC tarafından risk gruplamasına tabi tutulan mikotoksinler için Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen kritik limitler aşılmakta mıdır?" problemlerine cevap aradığımız çalışmamızda İstanbul'un farklı ilçelerindeki ulusal, yerel marketlerden ve pazar yerlerinden temin edilen 100 adet mısır irmiğinden imal cips örneği toplanmış ve bu örneklerin Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde belirlenen mikotoksin limitlerine (Tablo 5) uygunluğu açısından kontrol edilmiştir.

Toplanan örnekler İstanbul-Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalına ait laboratuvara getirilerek, aseptik koşullarda açılmış ve UV ışık ile vizuel mikotoksin kontrolü gerçekleştirilmiştir. Muayene sonucunda 32 adet örnekte ışıma saptanmıştır. Ancak ışıma saptanan örneklerin sadece 3'ünde LC-MS/MS yöntemiyle yapılan analiz sonucunda AF ve ikisinde Fumonisin tespit edilmiştir. UV ile yapılan taramanın mikotoksin varlığı açısından kalitatif bir kanaat verebileceği ancak yoğun ışımanın kantitatif bulaşma derecesi hakkında kesin bir görüşe varılması için yeterli olamayacağı düşünülmüştür.

Mikotoksin varlığı tespit edilen örneklerin üçünün (%3) AFB1 ve Toplam AF değerleri yönünden Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde belirlenen limitleri aştığı tespit edilmiştir. Bu husus mısır irmiğinden imal cipslerde mikotoksin profillerinin AFB1, Toplam AF, FB1 ve FB2 limitleri bakımından sağlık için risk oluşturacak düzeyde olduğunu, mısır irmiğinden imal cipslerde IARC tarafından Grup 1 ve Grup 2b risk

gruplamasında bulunan mikotoksinler için Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen kritik limitlerin aşıldığı tespit edilmiştir.

Meerpoel ve ark. (2021) LC-MS/MS metoduyla tahıl ve tahıl ürünlerinin içinde olduğu çeşitli gıdalarda mikotoksin araştırması yapmışlardır. Belçika'da yapılan araştırmada 367 örnek araştırılmış ve 123 örnekte CIT ve 137 örnekte OTA pozitif bulunmuştur.

Raza ve ark. (2020) tarafından HPLC metoduyla mısır ürünlerinin içinde olduğu çeşitli tahıl ürünlerinde mikotoksin araştırması amacıyla Pakistan'da yapılan bir araştırmada 200 örnek araştırılmıştır. Buğday ve mısır ürünlerinin %63`ünde DON pozitif tespit edilmiştir.

Çatak ve ark. (2020) tarafından Türkiye'de HPLC metoduyla mısır cipslerinde mikotoksin araştırması yapılmıştır. Yapılan araştırma sonuçlarına göre, örneklerin %63'ünde AFB1 ve % 41'sinde AFB2 kontaminasyonu tespit edilmiştir.

Alim ve ark. (2018) tarafından floresan detektörlü ters faz HPLC metoduyla tahıl ürünlerinin içinde olduğu çeşitli gıdalarda mikotoksin araştırması yapılmıştır. Pakistan'da yapılan araştırmada 229 örnek araştırılmıştır. Sonuçlara göre, 211/229 (%92,14) örnek AFB1 pozitif olarak tespit edilmiştir. Örneklerin %12'si AFB1 ve total AF limit değeri üzerinde bulunmuştur. 115/229 (%50,22) örnek OTA pozitif bulunmuş, toplam örneklerin %26'sı OTA limit değeri üzerinde tespit edilmiştir. 130/229 (%56,76) örnek ZEN pozitif bulunmuştur. Örneklerin %31'inin ise ZEN limit değeri üzerinde olduğu bildirilmiştir.

Pleadin ve ark. (2018) Hırvatistan'da tahıllarda ELISA metoduyla yaptıkları mikotoksin araştırmasında 189 örnek üzerinde çalışmışlar ve sonuçlara göre örneklerin %49'unda CIT ve %7'sinde OTA'nın pozitif çıktığını bildirmişlerdir.

Chen ve arkadaşları (2018) tarafından LC-MS/MS metoduyla mısır ürünlerinde mikotoksin araştırması yapılmıştır. Araştırmada alınan 4 mısır numunesi arasındaki mikotoksin değerlerinin birbirinden gözle görünecek şekilde farklılık gösterdiği görülmüştür. T-2 mikotoksini bir numunede saptanmazken, 2. numunede 5,65 ng/ml derecesinde en yüksek değeri almıştır. 3. ve 4. örneklerde bu değerler sırasıyla 1,03 ng/ml ve 2,93 ng/ml olarak bulunmuştur.

Amirahmadi ve ark. (2018) LC-MS/MS metoduyla mısır ununda mikotoksin araştırması yapmıştır. Sonuçlara göre, AFB1, OTA ve ZEA, ortalama kontaminasyon, 30

numunenin 23'ünde (%76,6) 154,1 ng g^{-1}, 6'sında (%20) 25 ng g^{-1} ve 14'ünde (%46) 358,7 ng g^{-1} olarak hesaplanmıştır. AFB1+ ZEA ve AFB1+ OTA+ ZEA'nın birlikteliği, mısır örneklerinin sırasıyla %20 ve %23'ünde kaydedilmiştir. Ayrıca, AFB1, OTA, ZEA, DON ve T2-toksinin diyet alımının tahmini, günde vücut ağırlığının kilogramı başına sırasıyla 5,8, 1,1, 32,1, 5,58 ve 0,06 ng olarak belirlenmiştir.

Kirinčič ve ark. (2015) tarafından HPLC, LC-MS/MS, GC-MS metotları kullanılarak tahıl ve tahıl ürünlerinde mikotoksin araştırması yapılmıştır. Slovenya'da yapılan araştırmada 290 örnek araştırılmıştır ve sonuçlara göre, 4/235 (%1,7) örnek OTA pozitif, 8/84 (%9,52) örnek FB1 pozitif, 109/246 (%44,31) örnek DON pozitif, 36/227 (%15,86) örnek ZEN pozitif, 6/145 (%4,14) T-2/HT-2 pozitif çıkmıştır. Hiçbir örnekte AF tespit edilememiştir.

Bakırcı (2014) tarafından HPLC metoduyla tahıl ve tahıl ürünlerinde mikotoksin araştırması yapılmıştır. Türkiye'de yapılan araştırmada 381 örnek araştırılmış ve sonuçlara göre 4/67 (%) OTA pozitif, 42/57(%) Fumonisin pozitif, 13/144(%) DON pozitif çıkmıştır.

Numanoğlu (2013) tarafından HPLC metoduyla mısır ürünlerinde mikotoksin araştırması yapılmıştır. Türkiye'de 38 örnek üzerinde yapılan araştırma sonuçlarına göre, örneklerin %79'unda ZEA pozitif, %61'inde DON pozitif, %30'unda T-2 ve HT-2 pozitif bulunmuştur.

Sheng ve ark. (2012) mikotoksinlerin mısır ve fındık ürünlerinde tespit edilme metodolojisi üzerinde bir çalışma gerçekleştirmiştir. Dört mikotoksinin 4 saat içinde eşzamanlı tespiti için bir süspansiyon dizisi yöntemi, minimum konsantrasyondaki mikotoksin içeren numuneler kullanılarak başarıyla geliştirilmiştir. Yöntemin yüksek verim, esneklik, doğruluk ve tekrarlanabilirliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Ibáñez-Vea ve ark. (2011) tarafından İspanya'da floresan detektörlü ters faz HPLC metoduyla mısır ürünlerinde mikotoksin araştırması yapılmıştır. Yapılan araştırmada 46 örnek araştırılmış ve sonuçlara göre örneklerin %9'u AFB1 pozitif, %48'i Zearalenone ve %39'u OTA pozitif çıkmıştır.

Lombaer ve ark. (2011) tarafından GC-MS metoduyla tahıl ürünlerinde mikotoksin araştırması yapılmıştır. Kanada'da yapılan araştırmada 373 örnek araştırılmıştır ve sonuçlara göre, 30/71(%) örnek ZEN pozitif, 62/86(%) DON pozitif, 21/72 OTA(%) pozitif, 22/69 (%) fumonisin pozitif, 6/75(%) ergot alkoloidleri pozitif çıkmıştır.

Marcela Beatriz Rogie ve ark. (2009) tarafından LC-MS/MS metoduyla buğday ürünlerinde mikotoksin araştırması yapılmıştır. Arjantin'de yapılan araştırmada 58 örnek araştırılmıştır ve yapılan çalışma sonuçlarına göre, alınmış 58 mısır ürününde DON, Zearalenone, T-2 ve Aflatoksin tespit edilmiştir. En yüksek miktarın DON mikotoksininde görüldüğü bildirilmiştir.

Garon ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada hayvancılık ve çiftlik çalışanlarının mantar sporlarına ve mikotoksinlere maruziyetini araştırmak için bir multimikotoksin analiz yöntemi geliştirilmiştir. Altı mikotoksin (aflatoksin B1, sitrinin, deoksinivalenol, gliotoksin, okratoksin A ve zearalenon), katı faz ekstraksiyonundan sonra kütle spektrometrisine bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile nicelendirilmiştir. Fransa Normandiya'da mısır silajında mantar türleri ve mikotoksinler üzerinde yapılan deneysel çalışmada 9 aylık izleme süresince. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium verticillioides* ve *Monascus ruber* gibi toksijenik mantarların olduğu yaklaşık 20 farklı türün tespit edildiği ve aflatoksin B1 (4-34ppb), sitrinin (4-25 ppb), zearalenon (23-41 ppb) ve deoksinivalenol (100-213 ppb) için tespit edilen bu düşük mikotoksin seviyelerinin olası bir kronik maruziyeti düşündürdüğü bildirilmiştir.

Bittencourt ve ark. (2005) tarafından mısır ve un ürünlerinde mikotoksin varlılığının araştırılması yapılmıştır. Bu çalışmada, Sao Paulo'da ticareti yapılan 60 mısır unu ve unu örneği, aflatoksinler ve FB1, FB2'nin belirlenmesi için analiz edilmiştir. Numunelerde aflatoksin tespit edilemediği bildirilmiştir. Mısır ununda, FB1 ve FB2 konsantrasyonları sırasıyla 1,1 ila 15,3 mg kg^{-1} (ortalama: 5,2 mg kg^{-1}) ve 0,2 ila 3,9 mg kg^{-1} (ortalama: 1,0 mg kg^{-1}) arasında değişmektedir. Mısır ununda ise, daha düşük FB1 (0,5–7,2 mg kg^{-1}; ortalama: 2,1 mg kg^{-1}) ve FB2 (0,1–1,8 mg kg^{-1}; ortalama: 0,7 mg kg^{-1}) seviyeleri tespit edilmiştir.

Ono ve ark. (2000) tarafından fumonisinlerin mısır ürünlerindeki varlığını test etmek adına yapılan bir araştırmada, mısırda fumonisin tespiti için monoklonal antikor (MAb) bazlı dolaylı rekabetçi ELISA'nın (IC-ELISA) performansı değerlendirilmiştir. Parana Eyaletinde Nisan 1995 ve Mart-Nisan 1996 mahsulünden hasat sonrası 150 mısır numunesi kullanılarak yapılan incelemede 85 numunede (%56,6) HPLC'den 1,1 ila 1,5 kat daha yüksek toplam fumonisin seviyeleri tespit edilmiştir. ELISA ile analiz edilen numunelerin %26'sında ve HPLC ile %29'unda 1,0 ila 5,0 mg g^{-1} konsantrasyon aralığı gözlemlenmiştir. Ek olarak, dört numune (%2,7) ELISA/HPLC oranı 0,7 ila 0,99 ve yedi

numune (%4,7) 1,0 oranı gösterdi. 29 (%13,3) numunede IC-ELISA, HPLC'den 1,6 ila 2,0 kat daha yüksek değerler saptamıştır. Bu veriler, 93 ng g^{-1}'lik bir saptama limiti ile 10 mg g^{-1} ile kirlenmiş mısırdaki fumonisin konsantrasyonu için IC-ELISA ve HPLC'nin yüksek korelasyonunu (r = 0.91) göstermiştir.

Jin Jeoul Kim ve arkadaşları (1993) tarafından Kore'de yapılan çalışmadaysa mısır ürünlerinde mikotoksinler araştırılmıştır. Doğal olarak mikotoksinlerin arpa ve mısır ürünlerinde bulunmasını araştıran bu makalede DON, 3-ADON, 15-ADON , 3,15-ADON, NİV, 4-ANİV, 4,15-DANİV, ZEA bulunmuştur.

Sonuç olarak yapılan literatür taramalarında 10 farklı mikotoksin analizini mısır irmiğinden imal cipslerde aynı anda araştıran araştırıcının bulunmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızın bu yönüyle literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Özellikle çocuklar tarafından beğeni ile yoğun olarak tüketilme potansiyelinde olan mısır irmiğinden imal cipslerin çocuklardaki sağlık risklerinin ortaya koyulması açısından önemli bir çalışma olabileceği düşünülmektedir.

Hububatın hasat, depolama ve transport işlemlerinin, hububatın mamüllere işlenmesi ve ürünlerin depolanması aşamalarındaki her basamağın küf kontaminasyonu ve mikotoksin üremeleri açısından kontrolü oldukça önemlidir. Mısır irmiğinden imal cipslerin imalat aşamalarında gıda güvenliği ve gıda kalite güvence sistemlerinin bu riskler göz önüne alınarak kurulması ve çalışmasının sağlanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Amirahmadi, M., Shoeibi S., Rastegar H., Elmi, M., Khaneghah A.M. (2018). Simultaneous analysis of mycotoxins in corn flour using LC/MS-MS combined with a modified QuEChERS procedure. *Toxin Reviews, **37(3)**,* 187-195.

Bean, G.A., Fernando, T., Jarvis, B.B., Burton, B. (1984). The isolation and identification of trichothecene metabolites from a plant pathogenic strain of Myrothecium roridum. *J Nat Prod, **47***, 727–729.

Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Cortés, M.A., Yusà, V., Hernández, F. (2011). UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chem, **126**,* 737–744.

Beltrán, E., Ibáñez, M., Portolés, T., Ripollés, C., Sancho, J.V., Yusà, V., Marín, S., Hernández, F. (2013). Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study. *Analytica chimica acta, **783***, 39–48.

Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F. (2009). Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry, **23(12)***, 1801–1809.

Benkerroum, N. (2016). Mycotoxins in dairy products: A review. *Int Dairy J,* **62**, 63–75.

Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R. (2007). Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *Int J Food Microbiol, **119**,* 33–37.

Bittencourt, A.B.F., Oliveira, C.A.F., Dilkin, P., Corrêa, B. (2005). Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control, **16(2)**,* 117-120.

Büyükünal, S.K., Persil Özkan, Ö. (2017). Mikotoksin Kaynaklı Gıda Zehirlenmeleri. *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics, **3(3)**,* 259-6.

Campone, L., Piccinelli, A.L., Aliberti, L., Rastrelli, L. (2009). Application of pressurized liquid extraction in the analysis of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nuts. *J Sep Sci*, ***32***, 3837–44.

Cao, X., Wu, S., Yue, Y., Wang, S., Wang, Y., Tao, L., Tian, H., Xie, J., Ding, H. (2013). A high-throughput method for the simultaneous determination of multiple mycotoxins in human and laboratory animal biological fluids and tissues by PLE and HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B*, ***942,*** 113–125.

Capriotti, A.L., Foglia, P., Gubbiotti, R., Roccia, C., Samperi, R., Laganà, A. (2010). Development and validation of a liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometric method for the analysis of mycotoxins subjected to commission regulation (EC) No. 1881/2006 in cereals. *J Chromatogr A*, ***1217***, 6044–6051.

Chen, D, Cao, X., Tao, Y., Wu, Q., Pan, Y., Huang, L., Wang, X., Wang, Y., Peng, D., Liu, Z., Yuan, Z. (2012). Development of a sensitive and robust liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and a pressurized liquid extraction for the determination of aflatoxins and ochratoxin A in animal derived foods. *J Chromatogr A*, ***1253***, 110–11.

Chen, Y., Meng, X., Zhu, Y., Shen, M., Lu, Y., Cheng, J., Xu, Y. (2018). Rapid detection of four mycotoxins in corn using a microfluidics and microarray-based immunoassay system. *Talanta*, ***186***, 299–305.

Cole, R.A., Jarvis, B.B., Schweikert, M.A. (2003). *Handbook of Secondary Metabolites*. New York, USA: Academic Press.

D'Arco, G., Fernández-Franzón, M., Font, G., Damiani, P., Mañes, J. (2008). Analysis of fumonisins B1, B2 and B3 in corn-based baby food by pressurized liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, ***1209***, 188–194.

Desmarchelier, A,, Oberson, J,M,, Tella, P,, Gremaud, E., Seefelder, W., Mottier, P. (2007). Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Analysis of 17 Mycotoxins in Cereals by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*, ***58***, 7510–7519.

Dors, G.C., Caldas, S.S., Hackbart, H.C., Primel, E.G., Fagundes, C.A., Badiale-Furlong, E. (2013). Fungicides and the effects of mycotoxins on milling fractions of irrigated rice. *J Agric Food Chem*, ***61***, 1985–1990.

Dutton, M.F. (1996). Fumonisins, mycotoxins of increasing importance: Their nature and their effects. *Pharmacol Ther*, ***70***, 137–161.

Ediage, E.N., Di Mavungu, J.D., Monbaliu, S., Van Peteghem, C., De Saeger, S. (2011). A validated multianalyte LC-MS/MS method for quantification of 25 mycotoxins in cassava flour, peanut cake and maize samples. *J Agric Food Chem*, ***59***, 5173–5180.

Edwards, S.G. (2004). Influence of agricultural practices on Fusarium infection of cereals and susequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, ***153***, 29-35.

Eriksen, G.S., Pettersson, H., Lindberg, J.E. (2003). Absorption, metabolism and excretion of 3- acetyl don in pigs. *Arch Anim Nutr*, ***57***, 335–345.

European Commission, EC (2006). Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off J Eur Union, **L70***, 12-34.

European Food Safety Authority (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. Request No EFSA-Q-2003-035. *The EFSA Journal*, ***39***, 1-27.

European Food Safety Authority (2006). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. *The EFSA Journal*, **365**, 1-56.

European Food Safety Authority (2014). Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *The EFSA Journal*, **12**, 3916.

European Food Safety Authority (2012). Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *The EFSA Journal*, **10**, 2605.

Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., Lebailly, P. (2006). Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***54***, 3479–3484.

González, L., Juan, C., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2006) Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. *Int J Food Microbiol*, ***107***, 223–227.

Hallier, A., Celette, F., David, C. (2011). Effects of sampling and extraction on deoxynivalenol quantification. *Food Chem*, ***127***, 303–307.

Hawra Wahab, M.N.A, Khadim, S.A. (2014). The chemical and biological pollution of potato and corn chips. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*, ***2***, 1191-1193.

Hickert S., Gerding J., Ncube E., Hübner F., Flett B., Cramer B., Humpf H.U. (2015). A new approach using micro HPLC-MS/MS for multi-mycotoxin analysis in maize samples. *Mycotoxin Res*, ***31***, 109–115.

Hışıl, Y. (2002)a. *Enstrümental Gıda Analizleri-II.* İzmir. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları Yayın No:30.

Hışıl, Y. (2002)b. *Enstrümental Gıda Analizleri-I.* İzmir. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları Yayın No:31.

IARC (1987a). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – IARC, ***10***, 440. Erişim tarihi (12.12.2021), https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-80/

IARC (1987b). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, ***40***, 452. Erişim tarihi (12.12.2021), https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-80/

IARC (1993a). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, ***56***, 599. Erişim tarihi (12.12.2021), https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-65/

IARC (1993b). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, ***56***, 397– 444. Erişim tarihi (12.12.2021), https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-65/

IARC (2002). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, ***82***, 338. Erişim tarihi (12.12.2021), https://doi.org/10.1002/food.19940380335

IARC (2006). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans PREAMBLE. Erişim tarihi (12.12.2021), https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/CurrentPreamble.pdf

IARC (2012). Aflatoxins. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Chemical agents and related occupations, 100F, 225– 248. Erişim tarihi (12.12.2021), http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Chemical-Agents-And-Related-Occupations-2012

IARC (2019). Agents classified by the IARC monographs. Volumes 1–123. IARC. Erişim tarihi (12.12.2021), https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/

Ibáñez-Vea, M., Martínez, R., González-Peñas, E., Lizarraga, E., de Cerain, A. L. (2011). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from Spanish market. *Food Control*, ***22(12)***, 1949-1955.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, ***56***: 245–395. IARC Lyon France: World Health Organization.

International Agency Research on Cancer, IARC (1993) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinoenic Risks of Chemicals to Humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC ***56***, 1–521.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2011) Safety evaluation of certain contaminants in food. *WHO Food Addit Ser*, ***63***, 1-791.

Juan, C., Ritieni, A., Mañes, J. (2013). Occurrence of Fusarium mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food Chem*, ***141***, 1747–1755.

Keller, N.P. Turner, G. Bennett, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. *Nat. Rev Microbiol*, ***3***, 937–947.

Klötzel, M., Gutsche, B., Lauber, U., Humpf, H.U. (2005). Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, ***53***, 8904–8910.

Köppen, R., Bremser, W., Stephan, I., Klein-Hartwig, K., Rasenko, T, Koch, M. (2015). T-2 and HT-2 toxins in oat flakes: development of a certified reference material. *Anal Bioanal Chem*, ***407***, 2997–3007.

Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, ***86(6)***, 1595-1612.

Krska, R., Josephs, R. (2001). The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. *Fresenius J Anal Chem*, ***369***, 469–476.

Li, Y.N., Wang, Y.Y., Zheng, Y.Q., Guo, Y.H. (2010). Preparation and characterization of the high specificity monoclonal antibodies against citrinin. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, ***37***, 1248-1253.

Mahmoud, A. F., Escrivá, L., Rodríguez-Carrasco, Y., Moltó, J. C., Berrada, H. (2018). Determination of trichothecenes in chicken liver using gas chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry. *LWT*, ***93***, 237-242.

Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez, J., Buckler, E., Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***99(9)***, 6080-6084.

McMullen, M., Jones, R., Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis*, ***81***, 1340–1348.

Nejati, P., Nosrati, A.C., Bayat, M., Azar, O.L. (2014). An investigation on measurement means of Citrinin toxin quantity by toxigenic Aspergillus species in biomass, using ELISA. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, ***2***, 2466-2471.

Ono, E.Y., Kawamura, O., Ono, M.A., Ueno, Y., Hirooka, E.Y. (2000). A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. *Food and agricultural immunology*, ***12(1)***, 5-14.

Oteiza, J.M., Khaneghah, A.M., Campagnollo, F.B., Granato, D., Mahmoudi, M.R., Sant'Ana, A.S., Gianuzzi, L. (2017). Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. *LWT*, ***80***, 200-207.

Pagán-Jiménez, J.R., Guachamín-Tello, A.M., Romero-Bastidas, M.E., Constantine-Castro, A.R. (2016). Late ninth millennium BP use of Zea mays L. at Cubilán area, highland Ecuador, revealed by ancient starches. *Quaternary international*, ***404***, 137-155.

Pallaroni, L., von Holst, C. (2003). Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A*, ***993***, 39–45.

Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L. (1995). Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathol*, ***44***, 207–238.

Rašić, D. (2012). The impact of mycotoxicoses on human history. *Arch Ind Hyg Toxicol*, ***63***, 513–518.

Pestka, J.J. (2008). Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit Contam*, ***22***, 1128–1140.

Pestka, J.J., Forstell, J.H. (1998). Inhibition of human lymphocyte transformation by the macrocyclic trichothecenes roridin A and verrucarin A. *Toxicol Lett*, ***41***, 215–222.

Picarelli, A., Di Tola, M., Sabbatella, L., Gabrielli, F., Di Cello, T., Anania, M. C., De Vincenzi, M. (2001). Immunologic evidence of no harmful effect of oats in celiac disease. *The American journal of clinical nutrition*, ***74(1)***, 137-140.

Piperno, D.R. (2011). The origins of plant cultivation and domestication in the New World tropics: patterns, process, and new developments. *Current anthropology*, ***52(S4)***, 453-470.

Pleadin, J., Frece J., Markov, K. (2019). Mycotoxins in food and feed. F. Toldra (Ed.), Advances in Food and Nutrition Research içinde (297-345. ss.). Academic Press.

Qasem, M., Jaradat, Amer, T. (2014). Heavy metals content and health risk of potato and corn chips being sold in Jordanian. *Jordan J of chem*, ***9(2)***, 69-80.

Richard, J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *Int J Food Microbiol*, ***119***, 3–10.

Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Martínez, Vidal, J.L., Prestes, O.D., Grio, S.L. (2011). Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, ***1218***, 1477–1485.

Sharmili, K., Jinap, S., Sukor, R. (2016). Development, optimization and validation of QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of multimycotoxin in vegetable oil. *Food Control*, ***70***, 152-160.

Sheng, Y., Jiang, W., De Saeger, S., Shen, J., Zhang, S., Wang, Z. (2012). Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of fumonisin B1 in maize. *Toxicon*, ***60(7)***, 1245-1250.

Shephard, G.S. (2008). Determination of mycotoxins in human foods. *Chem Soc Rev*, ***37***, 2468– 2477.

Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom*, ***20***, 2649–2659.

Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R. (2007). A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem*, **389**, 1505–1523.

Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W. (1998). Mycotoxin production byaspergillus, fusarium and penicillium species. *Int J FoodMicrobio*, ***43***, 141–158.

T.C. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı (2005). Hububat, Baklagiller ve Yağlı Tohumlar Lisanslı Depo Yönetmeliği. Erişim tarihi: 10.01.2022, https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/10/20051008-7.htm

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı (2013). Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Mısır Tarımı, Babaoğlu, M. Erişim tarihi: 10.01.2022, https://arastirma.tarimorman.gov.tr/ttae/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=89

T.C. Ticaret Bakanlığı (2013). Tarim Ürünleri Lisanslı Depoculuk Yönetmeliği. Erişim tarihi: 10.01.2022, https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=17274&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5

Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S., Ong, E.S. (2010) Pressurized hot water extraction (PHWE). *J Chromatogr A*, ***1217***, 2484–94.

TGK (2011). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. Resmî Gazete Tarihi: 29.12.2011 Resmî Gazete Sayısı: 28157 (3.mükerrer) Erişim tarihi: 02.01.2022, https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=15692&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5

TMMOB (2020). Ziraat Mühendisleri Odasi Mısır Raporu- 2020. Erişim tarihi: 10.12.2022, https://www.zmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=32780

Toprak Mahsulleri Ofisi (TMO) Genel Müdürlüğü (2020). 2019 yılı hububat sektör raporu. Erişim tarihi: 11.09.2022, https://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/sektorraporlari/hububat2019.pdf

Toprak Mahsulleri Ofisi (TMO) Genel Müdürlüğü (2021). 2020 yılı hububat sektör raporu. Erişim tarihi: 10.12.2022, https://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/sektorraporlari/hububat2020.pdf

Trabalón, L., Nadal, M., Borrull, F., Pocurull, E. (2017). Determination of benzothiazoles in seafood species by subcritical water extraction followed by solid-phase microextractiongas chromatography-tandem mass spectrometry: estimating the dietary intake. *Anal Bioanal Chem*, ***409***, 5513–5522.

Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal Chim Acta*, ***632***:168–180.

Ueno, Y. (1977). Mode of action of trichothecenes. *Pure Appl Chem*, ***49***, 1737–1745.

United Nations Environment Programme, UNEP (1998). Montreal Protocol. Erişim tarihi: 20 June 2018

https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/21383/Montreal_protocol_green_economy.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Veprikova, Z., Zachariasova, M., Dzuman, Z., Zachariasova, A., Fenclova, M., Slavikova, P., Vaclavikova, M., Mastovska, K., Hengst, D., Hajslova, J. (2015). Mycotoxins in Plant-based Dietary Supplements: Hidden Health Risk for Consumers. *J Agric Food Chem*, ***63,*** 6633-43.

Wen-Hsiung, C., Nion-Heng, S. (2007). Effect of citrinin on mouse embriyonic development in vitro and in vivo. *Reproductive Toxicology*, ***24***: 120-125.

Whitaker, T.B. (2006). Sampling foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, ***23(1)***, 50-61.

WHO 2002 (World Health Organisation) Fumonisins Food Safety Digest. Erişim tarihi: 02.01.2022 https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Fumonisins_EN.pdf

Fox, W.S., Banner, M.G. (1983). Social and economic context of folklore variants: The case of potato chip legends. *Western folklor*, ***42(2)***, 114-126.

Wu, Q., Kuča, K., Humpf, H., Klímová, B., Cramer, B. (2017). Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during cereal-based thermal food processing: a review study. *Mycotoxin Res*, ***33***, 79–91.

Zachariasova, M., Cajka, T., Godula, M., Malachova, A., Veprikova, Z., Hajslova, J. (2010). Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, ***24***, 3357–67.

Zhou, Q., Li, F., Chen, L., Jiang, D. (2016). Quantitative analysis of 10 mycotoxins in wheat flour by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a modified QuEChERS strategy. *J Food Sci*, ***81***, T2886–T2890.

Zinedine, A., Blesa, J., Mahnine, N., El Abidi, A., Montesano, D., Mañes, J. (2010). Pressurized liquid extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of ochratoxin A in breakfast and infants cereals from Morocco. *Food Control*, ***21***, 132–135.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI