

OKRATOKSİN A'NIN MODİFİYE BİR
YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
(YBSK) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ
VE BAZI UYGULAMALARI

ÖZLEM BANU KUTLUK
Yüksek Lisans Tezi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Eylül – 2001

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Proje No: 010335

Tezimin tamamından veya bir kısmından
yararlanılabilir.

E. Kutluk

Anadolu Üniversitesi
Medya Dairesi

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Özlem Banu KUTLUK'un OKRATOKSİN A'NIN MODİFİYE BİR YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (YBSK) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ VE BAZI UYGULAMALARI başlıklı Analitik Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 13.09.2004 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yrd. Doç. Dr. Göknel Altıokta	
Üye	: Prof. Dr. M. Tuncel	
Üye	: Doç. Dr. Sibel A. Çelen	
Üye	:
Üye	:

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 05.09.2004 tarih ve 2013 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. M. Tuncel

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

OKRATOKSİN A'NIN MODİFİYE BİR YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (YBSK) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ VE BAZI UYGULAMALARI

ÖZLEM BANU KUTLUK

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yar. Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA

Yardımcı Danışman: Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL

2001

Bu çalışmada, gıda maddeleri içerisindeki Okratoksin A düzeylerinin tayini için floresans detektörlü, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) tekniğinin kullanıldığı bir yöntem tanıtılmaktadır. Asetonitril:su:asetik asit (99:99:2) den oluşan hareketli faz ortamında, 3mm x 150 mm, 3µ tanecik çaplı ODS kolonda ve iç standart olarak diflunisal (IS) kullanılarak okratoksin A'nın (OTA) tayini gerçekleştirilmiştir. Alkonma zamanı OTA için 11.7, IS için 12.8 olarak gözlenmiştir. Yöntemin tekrar edilebilirliği, seçiciliği, doğrusalığı ve geri kazanım oranı validasyon kuralları altında incelenmiş, güvenilir, doğru ve çok düşük miktarların tayin edilebileceği sonucuna varılmıştır. Geliştirilen yöntem kullanılarak buğday, mısır, kırmızı biber, peynir ve şarapta OTA düzeyleri tayin edilerek uygulanabilirliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: OTA, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK),
miktar tayini

ABSTRACT

Master of Science Thesis

A MODIFIED METHOD FOR THE DETERMINATION OF OCHRATOXIN A BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY USING FLUORESCENCE DETECTOR AND CERTAIN APPLICATIONS

ÖZLEM BANU KUTLUK

University of Anadolu

Institute of Health Sciences

Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Ass. Prof. Göksel Altıokka

Second Supervisor: Prof. Dr. Muzaffer Tunçel

2001

A High Pressure Liquid Chromatographic method (HPLC) with florescent detector is described for the determination of ochratoxin A . A mobil phase consisting of acetonitrile:water: acetic acid (99:99:2) was used for the resolution of the compounds in a 3 μ particle size ODS column having 3 mm ID x150 mm length. OTA and diflunisal (IS) were appeared at 11.7 and 12.8 min., respectively. The selectivity, linearity, repeatability and recovery studies of the progressed method were examined considering the validation process and it was found that it is reliable, precise and low detection limits. Applicability of the method was tested by recovering from wheat, corn, red pepper, cheese and wine.

In conclusion, the method can be suggested for the routine analysis laboratories where OTA analysis is performed.

Keywords: OTA, HPLC and determination

TEŞEKKÜR

Bize özgür ve demokratik bir ortamda bilimsel çalışma imkanını kazandıran ulu önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

Tecrübe ve bilgisiyle desteğini esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Başkanı Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e,

Çalışmalarımın başından sonuna kadar benimle olan, bana yol gösteren sevgili hocam Yar. Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA'ya,

Çalışmamın gerçekleşmesinde lisans üstü tez proje desteğini sağlayan Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanı Prof. Dr. Nezh VARCAN'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı personeline,

Eğitim hayatım boyunca bana emeği geçen tüm hocalarıma,

Tüm yardımları için arkadaşlarım Engin Konuk ve Araş. Gör. Erol Şener'e,

Bana hep cesaret veren ve sevgileri ile hep yanımda olan annem ve babama,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Okratoksin A ile İlgili Genel Bilgi..	3
2.2. Okratoksinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	3
2.3. Okratoksin A Tayini ile İlgili Çalışmalar	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Kimyasallar	13
3.2. Aletler	13
3.3. Hareketli Faz	13
3.4. Standart Çözeltiler	14
3.5. Analiz Edilecek Gıda Maddelerinin Ekstraktlarının Hazırlanması	14
3.5.1. Mısır ve kırmızı biber numunelerinin hazırlanması	14
3.5.2. Peynir numunelerinin hazırlanması	15
3.5.3. Buğday numunelerinin hazırlanması	15
3.5.4. Şarap numunelerinin hazırlanması	15

4. SONUÇ VE TARTIŞMA	16
4.1. Yöntemin Seçiciliği	18
4.2. Doğrusallık Aralığının İncelenmesi	19
4.3. Geri Kazanım Oranının Belirlenmesi	20
4.4. Saptama Sınırı ve Tayin Sınırı	21
4.5. Gıda Maddeleri İçerisindeki OTA Miktar Tayini İçin Uygulama	22
5. KAYNAKLAR	26
ÖZGEÇMİŞ.....	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı	3
4.1. Standart OTA çözeltilisine ait kromatogram	16
4.2. (a) Standart OTA çözeltilisine ait kromatogram	
(b) Kırmızı biber ekstresine ait kromatogram	19
4.3. (a) Standart OTA çözeltilisine ait kromatogram	
(b) Kaşar peyniri ekstresine ait kromatogram	
(c) Mısır unu ekstresine ait kromatogram	
(d) Buğday ekstresine ait kromatogram	
(e) Şarap numunesine ait kromatogram	
(f) Kırmızı biber ekstresine ait kromatogram	22

ÇİZELGELER DİZİNİ

4.1. OTA ve IS ile ilgili çeşitli parametrelerin %RSD değerleri	15
4.2. Standart OTA'nın derişim alan ilişkileri	17
4.3. OTA'nın gün içi ve günler arası kalibrasyon eşitlikleri	18
4.4. OTA'nın geri kazanım değerleri	19
4.5. Çeşitli gıda maddelerinde bulunan OTA değerleri	21

1. GİRİŞ

Okratoksinler çeşitli çevre şartlarının etkisi altında; *Aspergillus* ve *Penicillium* türü mantarlardan kolaylıkla ve doğal olarak üreyebilen, çok sık rastlanan önemli toksik maddelerdir [1]. Dünyanın pek çok bölgesinde insan dokusu, sütü ve kanının yanında hayvan yemlerinin, tahılların ve çeşitli tarım ürünlerinin okratoksin A (OTA) ile kirlendiği rapor edilmiştir [2]. OTA'nın varlığını "Agent of Balcan Endemic Nephropaties" topluluğu kümes hayvanlarının böbreklerinde saptamıştır [3]. Son yıllarda OTA'nın toksik etkisinin araştırılması için pek çok uluslararası sağlık kuruluşu bilimsel işbirliği yapmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve FAO'nun gıda katkı maddeleri üzerinde uzman araştırmacılarının OTA'nın nefrotoksik etkilerini inceledikten sonra insanlar için belirledikleri haftalık tolere edilebilir OTA miktarı 0.1 µg/kg dır. Bu değer günlük olarak 14 ng/kg'a karşı gelmektedir ve belirtilen dozun üzerine çıktığında OTA'nın böbrek ve karaciğer tümörüne yol açabildiği belirtilmektedir. Ayrıca bu grup maddeler üzerinde yapılan çalışmalarda nefrotoksik, hepatotoksik, teratojenik ve immünotoksik etkilerin gözlemlendiği belirlenmiştir [4,5]. Okratoksin grubu maddeler arasında en çok bilineni ve analizi yapılmakta olanı OTA'dır.

OTA tayini için kapiler elektroforez (Capillary electrophoresis, CE) [6,7,8], jel elektroforez (Gel electrophoresis, GE) [9], iyon değişimi kromatografisi (Ion exchange chromatography, IEC) [10], ince tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography, TLC) [11,12], sıvı kromatografisi (Liquid Chromatography, LC) [12,13,14], sıvı kromatografisi - kütle spektrometrisi (Liquid chromatography- Mass spectrometry, LC-MS) [12,15], elektro spreysel kütle spektrometrisi (Electro spray mass spectrometry, ESMS) [6] gibi yöntemler kullanılmıştır. Bunlara ek olarak hem ayırma, hem de tayin yöntemi olarak en çok kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK)

(High pressure liquid chromatography, HPLC) dir [5,6,11,12,16-26]. YBSK kullanılarak hububatlarda, kurutulmuş meyvelerde, kahve, bira, süt ve Şarapta OTA tayini yapıldığı görülmektedir. Bunlar florimetrik detektörlerin kullanıldığı [5,6,11,12,15-26], oktadesilsilan (ODS) kolonlarda gıda maddeleri iĀerisindeki OTA'nın tayinlerini kapsamaktadır.

Bu ĀalıŐmada gıda maddeleri iĀerisinde bulunan OTA'nın miktarının belirlenmesi iĀin YBSK yönteminin geliŐtirilmesi amaĀlanmıŐtır. Deneylerde tekrar edilebilirliği arttırmak amacıyla iĀ standart (IS) olarak diflunisal kullanılmıştır. Yöntem on bir dakika iĀinde OTA'nın tayinine olanak sağlamaktadır. Tayin iĀin uygulanan işlemler basit, duyarlı, seĀici ve tekrar edilebilir özelliktedir. Önerilen yöntem gıda maddeleri kalite kontrolünde kolaylıkla kullanılabilir niteliktedir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Okratoksin A ile İlgili Genel Bilgi

OTA kimyasal olarak 7-(L-β-phenylanalylcarbonyl)-carboxyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihidro-3r-methylisocumarin diye adlandırılır [5]. Bazik çözeltilerinde OTA sodyum tuzu halindedir. Biyolojik yarılanma ömrü oldukça uzun olup, hücre proteinleri veya DNA ile karşılıklı etkileşimi gerekir [9]. Toksik ve karsinojenik etkileri nedeniyle OTA'nın besinlerdeki miktarının tayini ve vücuda girdikten sonra vermiş olabileceği zararın belirlenmesi oldukça önem taşımaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü OTA'yı karsinojenik etkili maddeler sınıfına almıştır. Bu nedenle gıda maddeleri içerisindeki OTA düzeyi insanlar açısından önem taşımaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün insanlar için belirlediği haftalık tolere edilebilir OTA miktarının 100 ng/kg olduğu belirtilmektedir [4].

2.2. Okratoksin A'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

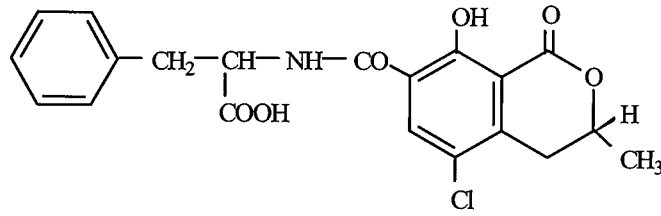
Okratoksinler yapı olarak pentaketides grubuyla ilişkilendirilirler. Beş metaboliti içerisinde OTA gıdalarda en sık rastlanan ve aynı zamanda en toksik olanıdır. Bu metabolitler daha çok *Aspergillus* ve *Penicillium* türü mantarlar tarafından üretilmektedirler. OTA çoğunlukla bitki kökenli yiyeceklerde ve hayvan yemlerinde bulunur. Örneğin kahve çekirdeğinde, buğday, arpa, yulaf ve mısırdaki doğal olarak oluşur.

Çok toksik olan OTA karaciğer ve böbreklerde ciddi hasarlara neden olur.

OTA'nın kimyasal formülü 7-(L-β-phenylanalylcarbonyl)-carboxyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihidro-3r-methylisocumarin'dir [5]. Açık kimyasal formülü Şekil 2.1'de verilmektedir. Kapalı formülü C₂₀H₁₈ClNO₆ dir. Molekül ağırlığı 403.8 dir.

Ksilden kristallendirilmesiyle oluşan şeklinin asidik çözeltisi UV lambası ışığında yeşil, bazik çözeltisi de mavi floresanslı renk verir. Erime derecesi 169 °C dir. OTA'nın asidik hali polar organik çözücülerde çözünürken,

sodyum tuzu suda çözünür. OTA'nın ışık ve havayla teması halinde stabilitesinin azaldığı, özellikle ışık alan ve nemli ortamlarda bozunduğu saptanmıştır. Etanollü çözeltisinin soğukta ve karanlıkta bir yıldan fazla süreyle stabil olduğu belirtilmektedir [27]. Ayrıca, OTA'nın sıcaklığa oldukça dayanıklı olduğu, OTA içerdiği bilinen tahıl ürünlerinin üç saatten fazla yüksek ısıdaki otoklavda kalmasına rağmen içerdikleri OTA'nın ancak %35 kadarının bozunduğu ifade edilmektedir. Bu bozunma ürünleri ısıtıldığında, toksik buhar olan Cl₂ ve NO_x yaymaktadırlar [27].



Şekil 2.1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı

2.3. Okratoksin A Tayini ile İlgili Çalışmalar

Visconti ve arkadaşları [5] şarap içerisindeki OTA tayini için floresans detektörlü YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Hareketli faz asetonitril:su:asetik asit (99:99:2) karışımından oluşmaktadır. 330 nm eksitasyon, 460 nm emisyon dalga boyunda çalışılmıştır. Ortalama geri kazanım pembe ve kırmızı şaraplarda 0.04 ile 10 ng/mL aralığında %88 - %103 olarak bulunmuştur. Relatif standart sapma %0.2 ve %9.7 dir. Saptama limiti 0,01 ng/mL, sinyal/gürültü oranı ise 3/1 olarak bildirilmiştir. Bu yöntem otuz sekiz kırmızı, sekiz pembe, dokuz beyaz, birde tatlı şarap olmak üzere toplam elli altı değişik şarap üzerinde uygulanmıştır. Kırmızı ve pembe şarap içindeki OTA miktarının beyaz şaraba oranla daha fazla olduğunu saptamışlardır.

Wilkes ve arkadaşları [6] OTA ve sitrinin gibi karboksil içeren mikotoksinlerin miktar tayinleri için YBSK, ESMS ve kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma ve tayinden önce toksinler gıda ve dokulardan ekstrakte edilmiştir. YBSK ve kapiler elektroforeze verilmeden

önce mikotoksin içeren örneklere immunoaffinity kolon yöntemi uygulanmıştır. Özellikle konsantre mikotoksin içeren kromatografik yöntemler uygulanmadan önce immunoaffinity kolon yöntemi uygulanması kullanışlı bir yöntemdir. Organik çözücüler içinde çözünen maddelerin gaz kromatografisinde ayrılması zor olurken, Floresans türevlendirme ve ESMS ile eser miktarda bile olsa mikotoksinlerin tayini mümkün olmaktadır. Toksikolojik çalışmalar için mikotoksin standartlarının saflığı sıvı kromatografisi ve ESMS kullanılarak kolaylıkla belirlenebilmektedir. Bu çalışma sonucunda kapiler elektroforez, LC ve ESMS ile çok düşük düzeydeki mikotoksinlerin tayini gerçekleştirilmiştir.

Cornely ve arkadaşları [7] OTA'nın yiyeceklerde ve hayvansal kaynaklı gıdalarda miktar tayini için LIF detektörlü kapiler elektroforez yöntemini geliştirmişlerdir. Kavrulmuş kahve, mısır ve süpürge otu bitkisi olmak üzere üç farklı gıda maddesindeki OTA miktarı ve geri kazanım oranları hesaplanmıştır. Ekstraksiyon ve izolasyon işlemleri silika kolon ve immunoaffinity kolonun beraber kullanılmasıyla diğer ekstraksiyon metotlarındaki gibi uygulanmıştır. OTA bu gıda maddelerine 0.2-10 ng/g (ppb) oranında ilave edilmiştir. Kavrulmuş kahve ve mısır için sekiz deney, süpürge otu bitkisi için ise dört deney yapılmıştır. Kavrulmuş kahve, mısır ve süpürge otu bitkisi için geri kazanım sırasıyla %86, %99 ve %91 olarak bulunurken, standart sapma sırasıyla 12.2, 10.1 ve 14.8 olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinden sonra 13. dakikada OTA sinyalinin gözlemlendiği belirtilmektedir.

Bohs ve arkadaşları [8] mikotoksinlerin analizini kapiler elektroforez kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Başlıca mikotoksinlerden olan OTA, okratoksin B, zearalenon ve moniliformin kapiler zon elektroforez kullanılarak tayin edilmiştir. Bu maddelerin spektroskopik özellikleri, hareketlilik ve seçicilik parametreleri incelenerek optimum koşullar belirlenmiştir. pH 5.5 ile 11 arasında, UV detektör ve floresans detektör kullanılarak bu maddelerin analizi yapılmıştır. Diode-array detektörü kullanarak da piklerin son derece iyi gözlemlendiği bildirilmektedir.

Schwerdt ve arkadaşları [9] OTA'nın fare plazma ve farklı organ hücrelerindeki proteinlere bağlanmasını GE yöntemini kullanarak incelemişlerdir. OTA'nın bağlandığı hücresel proteinleri tayin edebilmek için OTA'ya yabanturpu

peroksidaz enzimi (HRP) bağlanmıştır. Konjugatın peroksidaz aktivitesinden bu proteinleri Western blot analiz yöntemi ile detekte edebilmek için kullanılmıştır. Sadece HRP'nin hiçbir proteini detekte edemediği, ancak OTA-HRP bileşimi incelendiğinde OTA'nın proteinlere bağlandığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Fare bağırsağı, karaciğeri, dalak ve böbreğinde OTA ile bağlanan pek çok protein detekte edilmiştir. Ayrıca OTA'nın farenin plazma proteinlerine de bağlandığı görülmüştür.

Breitholtzman ve arkadaşları [10] sütteki OTA tayini için sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile hazırlanmış numunelerle çalışılan bir yöntem geliştirmişlerdir. Hazırlanan örnekler floresans detektörlü iyon değişimi sıvı kromatografisi kullanılarak analiz edilmiştir. İnek sütündeki OTA tayini için yapılan analizlerde saptama limiti 10 ng, tayin limiti ise 40 ng olarak belirlenmiştir. Benzer limitler insan sütünde yapılan analizlerde de gözlenmiştir. 36 inek sütü, 40 da insan sütü olmak üzere toplam 76 süt numunesi analiz edilmiştir. Bütün süt örnekleri İsviçre'den toplanmıştır. İnek sütü örneklerinin 5'inde (%14), insan sütü örneklerinin de 23'ünde (%58) 10-40 ng aralığında OTA bulunmuştur. Süt örneği veren annelerden toplanan 39 kan örneği analiz edilmiş ve bütün kan örneklerinde tayin limitini aşan konsantrasyonlarda (60 ng/L kan) OTA tespit edilmiştir. Örneklerdeki ortalama OTA konsantrasyonu 167 ng/L kan olarak bulunmuştur. İnsan sütündeki OTA konsantrasyonunun insan kanındakine oranla daha düşük veya yakın değerde olduğu bildirilmiştir.

Valenta [11] hayvan ve insan dokularının yanı sıra vücut sıvılarında da YBSK ve TLC yöntemi ile OTA'nın tayinini gerçekleştirmiştir. Örnekleme, ekstraksiyon, dışarıdan katma, clean-up, saptama ve tayin yöntemleri uygulanmıştır.

Richard ve arkadaşları [12] biriktirilmiş ev tozu içerisindeki OTA miktar tayinini gerçekleştirebilmek için YBSK kullanılan bir metot geliştirmişlerdir. Ev hayvanlarında görülen zehirlenmeler sonucu sahiplerinin şüphelenmesi üzerine böyle bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Isıtma sistemleri içerisindeki toz örnekleri toplanmış ve 24 saat içinde laboratuvar ortamında analizlere başlanmıştır. Çalışmalarda %98 saflıkta OTA kullanılmıştır. 8 g toz, 32 mL metanol % 1 lik sulu sodyum bikarbonat (70:30) çözülüp, 3 dakika karıştırılmış ve bu karışım

analiz edilmeden önce süzölmüştür. Optimize koşulların asetonitril:su:asetik asit (45:54:1) den oluşan hareketli faz ve 1 mL/dk akış hızı ile sağlandığı bildirilmektedir. Floresans detektör kullanılarak 333 nm eksitasyon, 460 nm emisyon dalga boyunda çalışılmıştır. Kolon %0,01 Tween 20 içeren, 10 mL fosfat tampon tuzu ile yıkanmış ve bunu takibinde 10 mL su ile yıkanmıştır. Bu koşullarda OTA'nın alıkonma zamanı 5 dakika olarak bulunmuştur. Karşılaştırma yöntemi olarak LC-MS ve TLC metotları kullanılmıştır. LC-MS metodunda, saflaştırılmış ekstrakt örnekleri 200 mL metanol:su (85:15) ile çözülmüş, alete 10 µl numune enjekte edilmiştir. Akış hızı 0.3 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Saptama sınırı 1 ng olarak bildirilmektedir. TLC metodunda OTA'nın alimünyum klorür (AlCl₃) belirteci ile parlak mavi renk verdiği gözlenmiştir. Bütün örneklerde eser miktarda da olsa OTA'ya rastlanmıştır. Geri kazanım %90 civarında bulunmuştur. Metodun seçiciliği 0.01 ppb, saptama limiti 0.1 ng olarak bulunmuştur. Toz içerisindeki OTA oranı diğer mikotoksinlere göre daha yüksek bulunmuştur. YBSK ve LC-MS sonuçları karşılaştırıldığında birbirine yakın sonuçlar elde edildiği görölmüştür.

Nesheim ve arkadaşları [13] arpa, mısır ve domuz böbrek dokularındaki OTA miktar tayini için AOAC, International Union of Pure and Applied Chemistry ve Nordic Committee on Food Analysis kuruluşlarının idare ettiği Avrupa, Kanada ve ABD'deki 16 farklı laboratuarda sıvı kromatografisi yöntemini kullanarak ortak bir çalışma yapmışlardır. OTA arpa ve mısıra 10, 20 ve 50 ng/L oranında, domuz böbreğine ise 5, 10 ve 20 ng/L oranında ilave edilmiştir. Tekrar edilebilirlik deneyleri için arpa ve mısıra 20 ng/g, böbreğe ise 10 ng/g OTA eklenerek örnekler hazırlanmıştır. Ortalama geri kazanım %53 - %97 aralığında bulunmuştur. Laboratuar içi çalışmalarda relatif standart sapma (RSD) arpa, mısır ve böbrek dokusu için sırasıyla %7.9, %20.1 ve %15.7 olarak bulunmuştur. Laboratuarlar arası çalışmalarda ise OTA'nın arpa ve mısırdaki bütün konsantrasyonları için RSD %20.7 - %31.7 olarak hesaplanmıştır. Böbrek dokularında ise 5, 10 ve 20 ng/g konsantrasyonlar için RSD sırasıyla %68, %41.8 ve %32.7 olarak hesaplanmıştır.

Larsson ve arkadaşları [14] iki farklı laboratuar ortamında arpa, beyaz kepek ve çavdar içerisindeki OTA tayini için sıvı kromatografi yöntemi

geliştirmişlerdir. Üç beyaz kepek, üç çavdar, üç sonradan OTA eklenmiş ve üç de doğal olarak OTA ile kontamine olmuş arpa numunesinin analizi sonucunda 2-9 mu-g/kg OTA'ya rastlanmıştır. Ortalama geri kazanım %64 ile %72 arasında bulunmuştur. Standart sapma ise çavdar, arpa ve beyaz kepek için laboratuvar içi çalışmalarda sırasıyla %21, %17 ve %12, laboratuvarlar arası çalışmalarda ise sırasıyla %23-28, %20-28 ve %18-31 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma sonucunda hububatlarda OTA miktarı 2 mu-g/kg ve daha üzerinde bulunmuştur.

Lau ve arkadaşları [15] OTA'nın tayini için Sıvı Kromatografisi (LC) ve Elektro Sprey Kütle Spektrometrisi (ESMS) yöntemini geliştirmişlerdir. İnsan plazma örneklerinde OTA'nın tayininde LC-MS in son derece seçici olduğu bildirilmektedir. Minimum saptama limiti her enjeksiyon için 10-20 pg aralığındadır. 20-40 µg insan plazmasında 0.05 ppb'ye karşılık gelmektedir. Bu çalışmada iç standart olarak okratoksin B kullanılmıştır. Her iki okratoksinin de sodyuma bağlı olduğu gözlenmiştir. İnsan kan plazmasında, standart katma metodu, iç standart katma metodu, dış standart katma metodu yöntemleri karşılaştırılmıştır. Kütle spektrometrisi metodu ile floresans detektörlü sıvı kromatografisi metodunun sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu metot aynı zamanda OTA içerdiği tahmin edilen kahve örneklerine de uygulanmıştır.

Jornet ve arkadaşları [16] ters faz sıvı kromatografisi yöntemini kullanarak şaraplarda OTA miktar tayini için katı faz ekstraksiyonlu sıvı kromatografisi metodunu geliştirmişlerdir. Florimetrik detektör kullanılan bu yöntemde standart sapma %10 dan daha düşük bulunmuştur. Geri kazanım için OTA ticari şaraplara 0.1 ile 3 µg/L düzeyinde ilave edilmiştir. Farklı 15 çeşit şarap üzerinde çalışılmıştır. Şaraplar içerisindeki OTA miktarı 1 µg/L den daha düşük seviyede bulunmuştur. Geri kazanımın %80 dolaylarında olduğu bildirilmiştir. Kırmızı şaraplarda geri kazanım %87.6, beyaz şaraplarda ise %83.2 bulunmuştur. Tekrar edilebilirlik (ortalama geri kazanım) %91.8 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemin avantajı uzun işlemler gerektirmemesi ve geri kazanım oranlarının yüksek olmasıdır.

Vazquez ve arkadaşları [17] ters faz YBSK sistemi ile peynir içerisindeki başlıca mikotoksin olan OTA ve sitrinin tayinini gerçekleştirmişlerdir. Hareketli faz olarak pH 5.5 e ayarlanmış 10^{-3} M tetrabutylamonyumhidroksit içeren

metanol:su sistemi kullanılmıştır. Floresans detektör kullanılarak, 331nm eksitasyon, 545 nm emisyon dalga boyunda çalışılmıştır. Standart OTA çözeltilerinin kalibrasyonu için $1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında çalışılmış ve bu derişim aralığında doğrusallık olduğu gözlenmiştir. Saptama limiti 3×10^{-6} M olarak bildirilmiştir. Bu yöntemin idrar ve serum gibi kompleks maddeler için de geçerli olduğu söylenmektedir.

Frohlich ve arkadaşları [18] domuz böbreklerinde OTA'nın tayini için enzimatik ve immünolojik çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Çalışma yöntemi olarak ters faz sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Gradient sistemle pH'ı fosforik asitle 2.1'e ayarlanmış su (solvent A) ve %10 luk izopropanol içeren metanol (solvent B) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Akış hızı 1.5 mL/dk, sıcaklık ise 40°C ye set edilmiştir. Solvent B ilk 10 dakika %30 dan %48 e ayarlanmış, sonraki 6 dakika %48 de sabit tutulmuş, 9 dakika %70 yapılmıştır. Kolon %90 lık solvent B ile 6 dakika yıkanmıştır. Floresans detektörle çalışılmış ve 333 nm eksitasyon ,450 nm emisyon dalga boyu kullanılmıştır. Böbrek örnekleri ELISA testine tabi tutulmuş karboksipeptidaz A ile muamele edildikten sonra YBSK ile analiz edilmiştir. OTA miktarı dört örnekte 12 ppb den daha yüksek bulunurken, on dört örnekte 10 ppb den yüksek bulunmuştur. Örnekler içerisindeki OTA miktarının mevsimsel farklılık, sıcaklık ve nemle değiştiği saptanmıştır. Örneğin aralık ayında toplanan örneklerin, ekim ayında toplananlardan daha az OTA içerdiği bulunmuştur.

Marquardt ve arkadaşları [19] Avrupa ve Kuzey Amerika'da OTA'yu yiyeceklerde, yemlerde, hayvan dokularında ve insan kanında tayin etmişlerdir. OTA'nın gastrointestinal sistemde böbrekte kolaylıkla adsorbe edildiğini gözlemişlerdir. Askorbik asit gibi antioksidanların OTA'nın toksik etkisini azalttığı belirtilmiştir. OTA'nın birkaç çeşidi tespit edilmiş ve bunların bazılarının yüksek, bazılarının da düşük toksisite gösterdiği belirtilmiştir.

Sharman ve arkadaşları [20] OTA'nın hububat ve hayvansal ürünlerdeki analizi için immunoaffinity kolon YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu yöntem arpa, çavdar ve buğdayın yanı sıra domuz böbrekleri ve sosise uygulanmıştır. Standart katma yöntemi ile geri kazanım %70-80, relatif standart sapma ise 8 deney için %1.3 olarak bulunmuştur. Sadece buğday örneğinde 13.7

mu-g/kg OTA'ya rastlanmıştır ve standart sapması da 8 deney için %3 olarak bulunmuştur. Saptama limiti ise 0.2 mu-g/kg dır. İmmunoaffinity kolon kullanımının bu yöntem için hızlı ve belirleyici olduğu söylenmektedir.

Krogh [21] OTA içeren besinlerle beslenen hayvanların (fare, köpek,kuş ve geviş getiren hayvanlar) zarar görmüş böbreklerinde deneysel çalışmalar yapmışlardır. Domuzlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalar esnasında OTA'nın böbrekler üzerindeki etkisi ile ilgili önemli veriler elde edilmiştir. Renal zararlar morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerle tanımlanabilir. Renal etki 200-4000 mu-g/kg aralığında OTA içeren yemler kullanıldığında gözlenmiştir. OTA oluşumunun iklim şartları, nem, ürünün hasadı ve depolanma şartlarıyla ilgili olduğu belirtilmiştir.

Pittet ve arkadaşları [22] saf ve karışım halindeki çözünebilir kahvelerdeki OTA tayini için immunoaffinity kolon kullanarak bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Yeşil kahve çekirdeği, kavrulmuş kahve çekirdeği ve çözünebilir kahveler içindeki geri kazanımı %80 den daha fazla bulmuşlardır. Bu metodu değişik ülkelerdeki farklı üreticiler tarafından üretilen 116 çözünebilir kahve örneğine uygulamışlar, bir kısmında OTA'ya rastlanmazken, gözlenen en yüksek OTA miktarını 15.9 mu-g/kg olarak bulmuşlardır. En fazla OTA oranı karışım halindeki çözünebilir kahvelerde bulunurken saf çözünebilir kahvelerde bu oranın daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Ortalama OTA değeri 1.1 mu-g/kg olarak bulunmuştur.

Studerrohr ve arkadaşları [23] kahve içerisindeki OTA oluşumunu incelemişlerdir. OTA'nın başlıca hububatlarda ve gıda maddelerinde bulunduğu bilinirken kahve çekirdeğinde de oluştuğu gözlenmiştir. Bu çalışmada yeşil ve kavrulmuş kahve çekirdekleri içindeki OTA miktarı kahve demlendikten sonra analiz edilmiştir. Demleme yoluyla hazırlanan kavrulmuş kahve YBSK'ye verilmeden önce clean-up step programı uygulanmıştır. Analizler sonucunda saptama limiti yeşil kahve çekirdeğinde 13-25 mu-g/kg, ticari kahve örneği analizi sonucunda ise saptama limiti 0.5 mu-g/kg olarak bulunmuştur. 40 kahve örneğinin 18'inde 0.4 ile 7.8 mu-g/kg aralığında OTA'ya rastlanmıştır.

Hurst ve arkadaşları [24] kakao çekirdeğindeki OTA tayini için otomatik sample clean-up lı bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Ppb seviyesindeki

OTA'nın bile bu yöntemle belirlenebilmesi amaçlanmıştır. Örnek asetik asit içeren metanol:su karışımıyla ekstre edildikten sonra pH'ı istenilen değere ayarlanarak kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. C₁₈ katı faz ekstraksiyonundan sonra floresans detektörlü YBSK ile analiz edilmiştir. Relatif standart sapma %1 ve %2.5 olarak hesaplanmıştır. Standart ilave yöntemiyle geri kazanım %87-106 aralığında bulunmuştur.

Wrabcheva ve arkadaşları [25] Bulgaristan'da yetişen hububatlar içinde OTA ve sitrinin oluşumunu araştırmışlardır. Bir kontrol, üçte yöresel bölge belirlenmiş, kontrol bölgesinden 20 örnek, birinci yöresel bölgeden 21, ikinci yöresel bölgeden 30, üçüncü yöresel bölgeden 23 örnek alınmıştır. Bu örnekler buğday, mısır ve yem olarak kullanılan arpa, yulaf ve beyaz kepektir. Enzim immuno assay yöntemiyle yapılan OTA ve sitrinin analizi sonucunda saptama limiti OTA için 0.5 ng/g, sitrinin için 5 ng/g bulunmuştur. OTA için immunoaffinity kolon işleminden sonra YBSK uygulanmasıyla oldukça pozitif sonuçlara ulaşılmıştır. Buğday, beyaz kepek ve yulafta oldukça yüksek seviyede OTA'ya rastlanmıştır. OTA kontrol bölgesinde %35, birinci bölgede %29, ikinci bölgede %30, üçüncü bölgede ise %47 bulunmuştur. Ortalama/orta değer göz önüne alındığında kontrol bölgesi için 1.5/1.3 ng/g, birinci bölge için 11/1.6 ng/g, ikinci bölge için 18/1.6ng/g, üçüncü bölge için ise 3.5/1.5 ng/g olarak bulunmuştur. OTA için en yüksek derişim 140 ng/g bulunurken, sitrinin için ise 420 ng/g bulunmuştur.

Scott ve arkadaşları [26] besin maddeleri ve hayvan yemlerinden izole edilmiş mantar ve küfler üzerinde, bunların aflotoksin oluşturabilme ve mikotoksin içerme potansiyellerini belirleyebilmek için, ince tabaka kromatografisinin kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemle pek çok aflatoksin ve mikotoksin tayin edilebilmiştir. Yöntem loş ışık altında uygulanmıştır. Plak 0.3 mm Adsorbosil 5 silika jel ile kaplanmış ve 110 °C de 2 saat aktive edilmiştir. Standart ve ekstrakte edilerek hazırlanmış toksin çözeltilerinin her birinden 5 µl düzeyinde alınarak plağa uygulanmıştır. Çözücü sistem olarak toluen:etilasetat:%90 formik asit (6:3:1) ve benzen:metanol:asetik asit (24:2:1) kullanılmıştır. 10 mL glasiyel asetik asit ve 5 mL konsantre H₂SO₄ içeren, 85 mL metanol ve 0.5 mL p-anisaldehitin taze hazırlanmış karışımı 130°C

de 8-20 dakika ısıtılıp plağa uygulanmasından önce ve sonra toksinler görünür ışık altında ve UV de gözlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Okratoksin A SIGMA, iç standart olarak kullanılan diflunisal ise Sanovel İlaç Firması A.Ş. den elde edilmiştir.

Gradient grade metanol (CH₄O), etanol (C₂H₆O), kloroform (CHCl₃), asetonitril (C₂H₃N), asetik asit (C₂H₄O₂), hekzan (C₆H₁₄) Merck firmasının ürünüdür. Bidistile su tümüyle camdan oluşan sistem ile laboratuvarımızda hazırlanmıştır.

3.2. Aletler

Bu çalışma, tümü Shimadzu firmasının ürünü olan LC 10A serisi gradient Sıvı Kromatografisi ile yapılmıştır. Sistem; LC-10AT gradient donanımlı pompa , RF-10A XL floresans detektör, CBM-10A iletişim sağlayan modül'den oluşmaktadır. Veriler LC Workstation Class LC10 (Version 1) ile işlenmektedir. Enjeksiyon tablası Rheodyne (Cotati) olup üzerinde 20 µL hacimli loop taşımaktadır. Enjeksiyonlar 22 gauge enjektör ucu ile loop'u doldurarak yapılmıştır.

Ayırma ve miktar tayini işlemlerinde Luna 3 µ tanecik çapında C₁₈ 150x3.00 mm Phenomenex marka kolon kullanılmıştır. Akış hızı 0.4 mL/dk dır. Çözeltilerin içerisindeki oksijen gazının uzaklaştırılmasında B-220 model ultrasonik banyodan (Branson, CA, USA) yararlanılmıştır.

Floresans detektörde 330 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda çalışılmıştır.

3.3. Hareketli Faz

Deneyler süresince kullanılacak olan hareketli faz (asetonitril:su:asetik asit) (99:99:2) 500 mL hazırlanmıştır. Hazırlanan hareketli faz içerisindeki çözünmüş gazların ve oksijenin uzaklaştırılması için ultrasonik banyoda yarım

saat tutulmuştur. Ayırma ve miktar tayini işlemleri bu çözelti ile gerçekleştirilmiştir.

Günlük çalışmalarda deneylere başlamadan önce kolon %75'lik metanolle bir saat yıkandıktan sonra, hazırlanışı yukarıda anlatılan hareketli faz ile yarım saat yıkanarak kolonun şartlanması sağlanmıştır.

Ekstrakt ile yapılan çalışmalardaki tekrar edilebilirliğin sağlanabilmesi için gradient koşullarda bir yıkama programı kullanılmıştır. Bunun için A çözücü sistemi hareketli faz, B çözücü sistemi metanol (%75, h/h) olmak üzere analizin on dört dakika içinde sona ermesinin ardından doğrusal gradient kontrollü sistem ile aşağıdaki gibi yıkanmıştır.

Süre (dk)	:	0	14	22	25	
Çözücü B (%)	:	0	100	100	0	gradient yıkama sonu

3.4. Standart Çözeltiler

5 mg OTA 50 mL'lik balon jofeye alınarak distile etanolde çözülmüştür. Gerekli seyreltmeler söz edilen stok standartlardan bidistile su kullanılarak yapılmıştır.

Diflunisal (IS) ise 11.5 mg tartılarak, 100 mL lik bir balon jofeye alınarak birkaç damla derişik sodyum hidroksit damlatıldıktan sonra su ile çözülmüştür. İç standart (IS) tüm deneyler boyunca 9.2×10^{-8} M derişimde kullanılmıştır.

Standart stok çözeltilerin saklandığı kaplar alüminyum folia ile kaplanarak buzdolabında +4°de saklanmıştır.

3.5. Analiz Edilecek Gıda Maddelerinin Ekstraktlarının Hazırlanması

3.5.1. Mısır ve kırmızı biber numunelerinin hazırlanması

İçerisinde OTA miktarı belirlenecek olan gıda maddelerinin her biri için farklı bir ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Mısır ve kırmızı biberden belirli miktar tartılıp 20 mL kloroform ile 2 saat ekstre edildikten sonra süzülerek

kloroform fazı uçurulmuştur. Ekstrakt 10 mL metanol ile çözümlenerek santrifüj edilmiştir. Gerekli seyreltmeler su ile yapılarak YBSK'ye verilmiştir.

3.5.2. Peynir numunelerinin hazırlanması

Analizi yapılacak peynir numunelerinden belirli miktar tartılıp, 20 mL kloroform ile 2 saat ekstre edildikten sonra süzülerek kloroform fazı uçurulmuştur. Ekstrakt 5 mL hekzanla çalkalandıktan sonra hekzan fazı atılmış, ekstrakt 10 mL metanolde çözümlenerek santrifüj edilmiştir. Gerekli seyreltmeler su ile yapılarak YBSK'ye enjekte edilmiştir.

3.5.3. Buğday numunelerinin hazırlanması

Analizi yapılacak buğday numunelerinden belirli miktar tartılıp, 10 mL metanolla 2 saat ekstre edildikten sonra süzülerek, santrifüj edilmiştir. Gerekli seyreltmeler su ile yapılarak YBSK'ye enjekte edilmiştir.

3.5.4. Şarap numunelerinin hazırlanması

Analizi yapılacak şarap numuneleri 0,2 µm por çapı olan disposable filtrelerden süzülerek süzüntüden 0.8 mL alınıp üzerine 0.2 mL 4.6×10^{-7} M'lık iç standart olarak kullanılan diflunisal çözeltisinden katılarak YBSK'ye doğrudan enjeksiyonu yapılmıştır.

Çizelge 4.1. OTA ve IS ile ilgili çeşitli parametrelerin %RSD değerleri (n=9).

Alıkonma Zamanı (OTA) (9.6×10^{-9})	Alan (OTA) (9.6×10^{-9})	Alıkonma Zamanı (IS) (9.2×10^{-8} M)	Alan (IS) (9.2×10^{-8} M)	PN (OTA) /PN (IS)	
11.734	137848	12.879	425387	0.356	
11.723	137235	12.870	429323	0.351	
11.686	131337	12.831	399197	0.361	
11.689	131337	12.831	399197	0.361	
11.672	132134	12.812	399735	0.363	
11.650	125149	12.789	394998	0.348	
11.640	128316	12.773	396152	0.355	
11.609	127920	12.733	405148	0.346	
11.662	118912	12.795	370628	0.352	
Standart Sapma	0.039	5870	0.05	17289	0.01
% RSD	0.34	4.52	0.36	4.30	1.70
Ortalama	11.7	130021	12.8	402196	0.36

YBSK çalışmaları da bir kromatografik çalışma olduğundan kesinlikle IS uygulamasının yapılması gereği üzerinden, maddelerin olası polariteleri düşünülerek, bir IS bulunmaya çalışılmıştır. En uygun IS'nin gerek yapı gerekse geliş zamanı olarak diflunisal olduğu belirlenmiştir. Bu maddenin uygun bir derişimi belirlenerek enjekte edildiğinde 12.8 dakika dolayında pik verdiği gözlenmiştir. Kaydedilen özgün bir kromatogram Şekil 4.1'de verilmektedir.

Belirtilen koşullarda değerlendirme için uygun bir kromatogramın eldesi sonucu, yontemin kesinliği ve doğruluğunu belirlemek amacıyla OTA ve IS'nin alıkonma zamanları, bunların alanlarının ve pik normalizasyon (PN OTA/PN IS) değerlerinin tekrarlanabilirlikleri incelenmiştir. Değerlendirme sonuçları izelge 4.1'de verilmektedir.

OTA için elde edilen pik alanları iç standart için elde edilen pik alanlarına oranlanarak değerlendirilmiş ve tekrar edilebilirlik incelenmiştir. Yapılan değerlendirmelere göre tekrar edilebilirlik % 1.7 bulunmuştur.

Çizelgeden grldğu gibi en iyi tekrar edilebilirlik, OTA ve IS'nin pik normalizasyon değerlerinin birbirine oranlanması ile sağlanabilmektedir. Bu sonuca göre zaten bir çok hatanın ortadan kaldırılmasına neden olan işlemin, en iyi tekrarlanabilirlik vermesi ile paralel gitmektedir. Sonuçta, bundan sonraki miktar tayini ile ilgili tüm çalışmalarda tümüyle pik normalizasyon oranları değerleri kullanılacaktır.

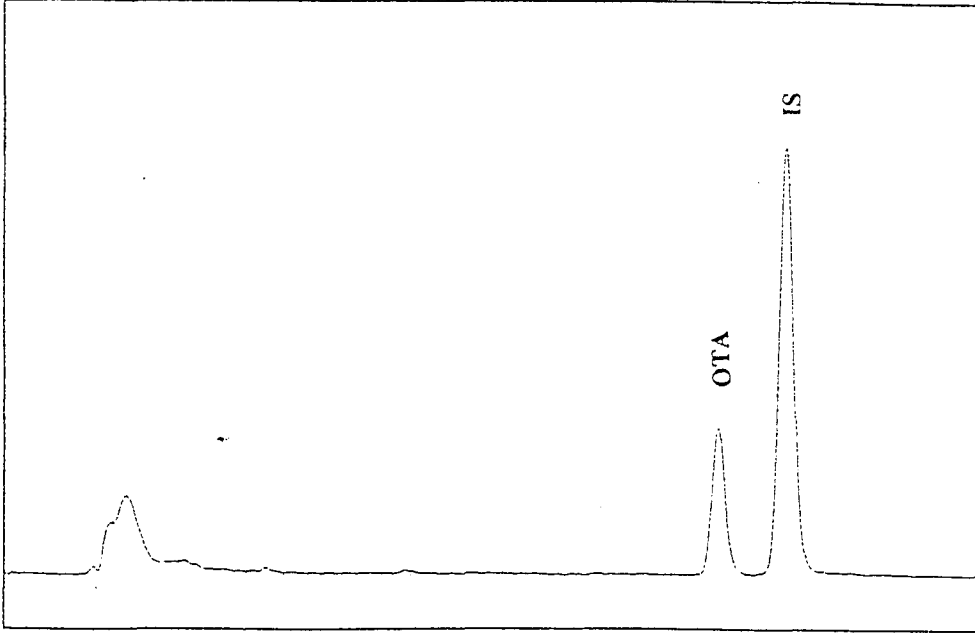
4.1. Yontemin Seçiciliği

Standart OTA ozelteleri ile ayrılma ve tekrar edilebilirlik koşullarının sağlanması ardından, yontemin seçiciliğinin incelenmesine geçilmiştir. Deneysel kısımda tarif edildiği gibi hazırlanan gıda maddeleri ekstre edildikten sonra YBSK'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar arasında en karışık kromatograma sahip olan kırmızı biberinde bile piklerin tümüyle birbirinden ayrılması gerçekleşmektedir. Aynı koşullarda standart OTA ozeltisinin kromatogramı ile kırmızı bibere ait kromatogramlar Şekil 4.2'de verilmektedir. Standart ve ekstraktların aynı alıkonma zamanlarında pikler verdiği ve girişime neden olacak yabancı pikler taşımadığı gözlenmektedir. Böylelikle yontemden beklenen seçiciliğin sağlandığı sonucuna varılmaktadır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

YBSK, yüksek ayırma gücünün yanı sıra seçiciliği ve düşük saptama limiti gibi özelliklerinden dolayı hemen her çeşit analiz için yaygın olarak kullanılan bir ayırma tekniğidir. Miktar tayininin söz konusu olduğu tüm laboratuarlarda YBSK cihazı bulunmaktadır. Ancak hareketli faz sistemlerinin yüksek saflıkta olması zorunluluğu ve çözücülerin maliyetinin yüksek olması yöntemin tek dezavantajını oluşturmaktadır. Yinede analizlerde çok düşük düzeyde numunelerle çalışılabilmesi büyük bir üstünlüktür.

Visconti ve arkadaşlarının tarif ettiği çalışmada [5] kullanılan detektör ve hareketli faz bileşimi kullanılmış, ancak koşulların optimizasyonu yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Sinyaller 330 nm deki uyarılma ve 450 nm yayım dalgaboylarında kaydedilmişlerdir. Hareketli faz sistemi olarak yukarıda belirtildiği gibi Visconti ve arkadaşlarının kullandığı asetonitril:su:asetik asit (99:99:2) kullanılmış, en iyi akış hızının 0.4 mL/dk olduğu saptanmıştır. Bu koşullarda OTA'nın 11.7 dakikada geldiği bulunmuştur. Bu sürenin, laboratuvar çalışmalarında bir analizin gerçekleştirilebilmesi için oldukça uygun bir süre olduğu söylenilebilir.



Şekil 4.1. Standart OTA çözeltisine ait kromatogram

farkın olduğunu işaret etmektedir. Korelasyon katsayıları ise analitik açıdan kabul edilebilir değerdedir.

Çizelge 4.2. Standart OTA'nın derişim alan ilişkileri

Derişim Aralığı (M)	$2.5 \times 10^{-9} - 1.5 \times 10^{-8}$
IS Derişimi (M)	9.2×10^{-8}
Alıkonma zamanı R_t	11.7
OTA/ R_t / IS/ R_{ti}	$35453347.14 C (M) + 0.0027$ $r=0.9999$

OTA = Okratoksin A içeren çözeltinin alanı
 R_t = Okratoksin A içeren çözeltinin sinyalinin gözleendiği zaman (dk)
 IS = İç standart içeren çözeltinin alanı
 R_{ti} = İç standart içeren çözeltinin sinyalinin gözleendiği zaman (dk)
 r = Korelasyon katsayısı

Çizelge 4.3. OTA'nın gün içi ve günler arası kalibrasyon eşitlikleri

Regresyon Parametresi	Gün İçi (l=1; n=5)	Günler Arası (l=3; n=15)
Eğim \pm SD	$35453347.1 \pm 565996,4$	$35608699.8 \pm 1034375,5$
Eğim \pm CL	$35453347.1 \pm 539148,3$	$35608699.8 \pm 470051,3$
Kesim	0.0027	0.0042
Korelasyon katsayısı	0.9999	0.9996

l : Set sayısı n : Analiz sayısı
 SD : Standart sapma CL : Güven sınırı

4.3. Geri Kazanım Oranının Belirlenmesi

$2.5 \times 10^{-9} - 1.5 \times 10^{-8}$ M derişim aralığında yüksek korelasyonlu kalibrasyon eşitlikleri ile doğrusallık elde edildikten sonra standart OTA çözeltilerine yukarıda belirtilen ekstraksiyon yöntemi uygulanarak % geri kazanım değerlerinin

belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı derişime sahip OTA çözeltileri farklı altı buğday numunesine ilave edilmiş, iki ayrı ekstraksiyon yöntemi uygulanarak % geri kazanım değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ekstreler YBSK cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen piklerin OTA standart çözeltisinin doğrudan enjekte edilmesi koşullarında elde edilen piklerle aynı karakteristiklere sahip olduğu gözlenmiştir. İlave edilen OTA derişimleri için elde edilen düzeltilmiş alan oranları değerleri OTA çözeltilerinin kalibrasyon eşitliğinde çözülerek bulunan OTA değerleri hesaplanmış ve katılan miktar ile oranlanarak % geri kazanım değerleri bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 4.4’de verilmektedir. Geri kazanım değerleri %79 ile %95 arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.4. OTA’nın geri kazanım değerleri

Katılan OTA (M)	Bulunan OTA (M)	% Geri Kazanım
9.88×10^{-9}	7.99×10^{-9}	83.23
9.88×10^{-9}	7.88×10^{-9}	82.06
9.88×10^{-9}	9.12×10^{-9}	95.05
9.88×10^{-9}	7.74×10^{-9}	80.63
9.88×10^{-9}	7.57×10^{-9}	78,86
9.88×10^{-9}	8.99×10^{-9}	93,67
Ortalama Geri Kazanım		85,58
Standart Sapma		6,96
Relatif Standart Sapma (%)		8.14

4.4. Saptama Sınırı ve Tayin Sınırı

Sinyal/gürültü oranı (S/N) 3 kabul edilerek yöntemin saptama sınırı (Limit of Detection, LOD) OTA için 2.5×10^{-10} M hesaplanmıştır. En düşük tayin edilebilir miktar (Limit of Quantification, LOQ) ise 8.2×10^{-10} M olarak bulunmuştur. Bu miktarlara karşılık gelen veriler ng/mL değerlerine çevrildiğinde, en düşük saptama sınırının 9.97×10^{-5} ng/mL, en düşük tayin sınırının ise 3.32×10^{-4} ng/mL' ye karşılık geldiği bulunmuştur.

4.5. Gıda Maddeleri İçerisindeki OTA Miktar Tayini İçin Uygulama

Çeşitli besin maddeleri içerisindeki OTA miktarının belirlenmesi için deneysel bölümde tarif edildiği şekilde ekstraksiyon işlemleri yapıldıktan sonra, ekstreler gerekli seyreltmeler yapılarak YBSK cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen piklerin düzeltilmiş alan oranı değerleri standart çözeltilerin ekstraksiyonu ile bulunan kalibrasyon eşitliğinde çözülmüş ve her birine karşılık gelen molar derişimler hesaplanmıştır. Buradan μg olarak gıda maddeleri içerisindeki OTA miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmektedir.

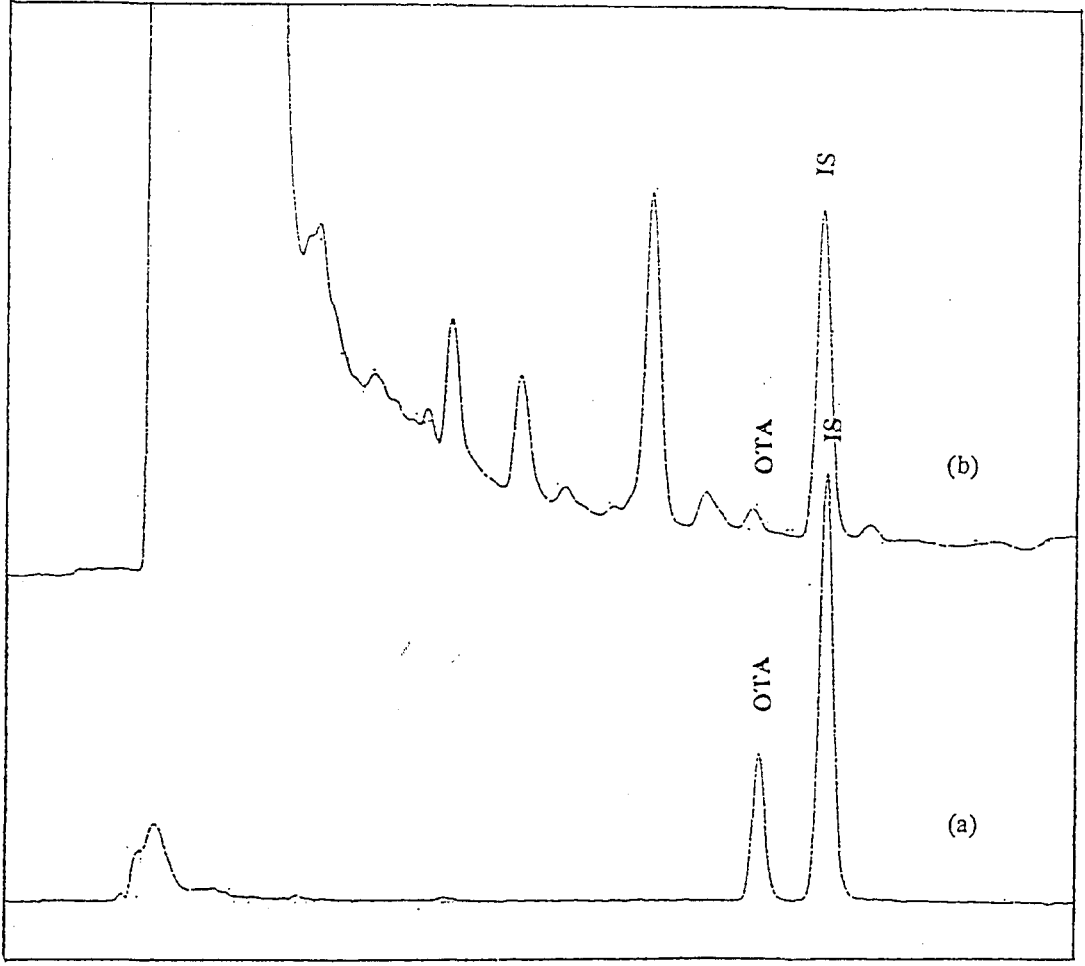
Buradan çıkartılan sonuca göre şarap numunelerinin hemen hemen hepsinde OTA oldukça yüksek düzeyde saptanırken, peynir çeşitlerinde bu miktarın çok daha az olduğu gözlenmiştir. Analizi yapılan buğday numunelerinin yarısında az miktarda OTA saptanmıştır. Aynı şekilde mısır unu ve kırmızı biber de çok az miktarda OTA saptanırken, beyaz un, kepekli un, ayçiçeği, fındık, bira ve tatlı şarapta ise OTA'ya hiç rastlanmamıştır. Burada seçilen yöntemin bir diğer üstünlüğü de, özellikle şaraplara uygularken herhangi bir ön işleme gereksinim duyulmaksızın analizlerin kısa sürede gerçekleştirilebilmesidir. Aşağıda Şekil 4.3'de şarap, kırmızı biber, kaşar peyniri, mısır unu ve buğday numunelerine ait kromatogramlar verilmektedir.

Analizi yapılan tüm numuneler gelişigüzel (random) olarak seçilmiş özellikle şaraplarda çok çeşitli firmaların ucuz ve pahalı şarapları analizlenmiş ve bir değerlendirmeye varılmaya çalışılmıştır.

Analitik çalışmalarda doğruluk ve kesinlik çok önemli olduğundan bunların sağlanabilmesine çalışılmıştır. Özellikle kromatografik yöntemlerde IS kullanma zorunluluğu vardır ve bu çalışmada IS kullanılmıştır. UV detektörünün kullanıldığı YBSK sistemlerinde IS bulunma olasılığı daha fazladır. Floresans detektörlerin kullanıldığı durumlarda bu olasılık daha düşüktür. Ancak bu çalışmada Diflunisal OTA'ya çok uygun bir IS olmuştur. Hataları minimuma indirmede önemli olan iç standart yönteminin kullanıldığı sadece bir tek çalışmaya rastlanmıştır ve belirtilen çalışmada okratoksin B IS olarak kullanılmıştır [15]. Böyle bir kullanımın analitik açıdan kullanılabilirliği kesinlikle tartışılabilir.

Bu çalışmanın diğerlerine göre üstünlüğü koşulların optimizasyonu sonucunda analizin kısa sürede gerçekleştirilmesi yanında iç standart kullanılmasıdır. Kromatografiye içine alan tüm yöntemlerde koşulların ayarlanması hem zor, hem de olanaksızdır. Çünkü kromatografik yöntemlerde kullanılan hareketli fazın bileşimi her zaman aynı hazırlanamaz, böylece pH'ı ve iyon şiddeti çok az da olsa değişebilir. Ayrıca maddelerin göç hızları sıcaklığa bağlı olarak değişeceğinden alıkonma sürelerindeki artma veya azalma ile pik boylarındaki değişmelere yansımaktadır. Bu etkiler sonucunda pik boylarında görülebilecek artma veya azalmalar iç standart kullanımı ile ortadan kaldırılabilmektedir. Değişmez derişimde tutulan iç standardın sinyali ile madde sinyali arasındaki ilişkiye dayanarak sonuca ulaşılabilmektedir. İç standart sinyali ile madde sinyali arasındaki oranın sabit kalacağı fikrinden hareketle yukarıda belirtilen hatalardan kaçınılabilmektedir. İç standart kullanılarak gerçekleştirilen OTA miktar tayinlerinde bu yolla doğruluk ve duyarlılık sağlanmıştır. Bu yöntemin rutin laboratuvar çalışmalarında son derece seçici, basit ve hızlı olduğu söylenebilir.

Yukarıdaki analiz sonuçlarından çıkardığımız verilere göre özellikle içeceklerde, ucuz olarak bilinen ürünler içerisindeki OTA miktarları az olabildiği gibi, pahalı içecekler içerisindeki OTA miktarları daha yüksek düzeyde olabilmektedir. Sonuçta gıdalar içerisindeki OTA'nın varlığının üretimdeki özene bağlı olduğu söylenebilir. Bütün bu değerlendirmelerin miktar olarak toksik doz düzeylerine çıkmadığı açıktır.



Şekil 4.2. (a) Standart OTA çözeltisine ait kromatogram
(b) Kırmızı biber ekstresine ait kromatogram

4.2. Doğrusallık Aralığının İncelenmesi

Doğrusallık aralığının incelenmesi için OTA 2.5×10^{-9} – 1.5×10^{-8} M derişim aralığında hazırlanmıştır. Standart OTA'nın derişim alan ilişkileri Çizelge 4.2'de verilmektedir. Toplam altı derişim düzeyi için elde edilen piklerin düzeltilmiş alan oranlarının değerlendirilmesi sonucunda elde edilen kalibrasyon eşitlikleri Çizelge 4.3'de verilmektedir.

Çizelgeden de görüldüğü gibi belirtilen derişim aralığının tamamında yüksek korelasyonlu kalibrasyon eşitlikleri elde edilmiştir.

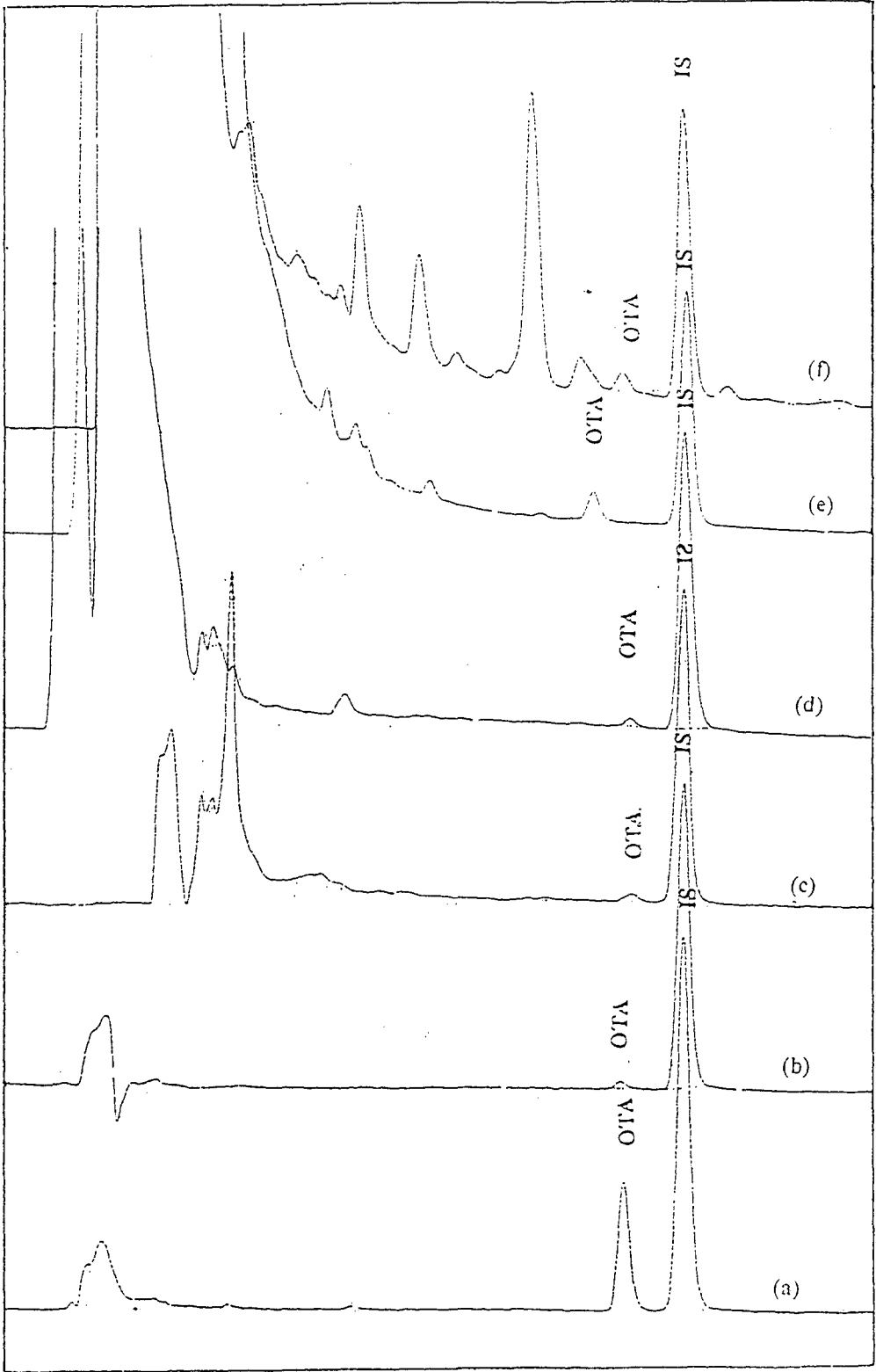
Üç ayrı günde yapılan kalibrasyon çalışmaları arasında % 0.43'lük bir fark gözlenmektedir. Bu sonuç günler arası analizler arasında önemsenmeyecek bir

Geliştirilen yöntemin halk sağlığı başta olmak üzere, gıda maddelerinin rutin analizlerinde doğru ve kesin sonuçlara ulaşmada rahatlıkla kullanılabileceği söylenilebilir. Ayrıca bu yöntemin dış ülkelere ihraç edilecek besin maddelerinin zorunlu analizlerinde güvenilirlikle kullanılabilmesi söylenebilir.

Çizelge 4.5. Çeşitli gıda maddelerinde bulunan OTA değerleri

Gıda Maddeleri	OTA ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	İçecekler	OTA ($\mu\text{g}/1\text{ L}$)
Mısır Unu	7.48	E. Birası	-
Kepekli Un	-	T. Birası	-
Beyaz Un	-	T. Birası (Dark)	-
Buğday 1	0.84	T. Şarabı	3.80
Buğday 2	0.33	Y. Şarabı	11.14
Buğday 3	-	B. Şarabı	17.82
Buğday 4	-	H. Şarabı	6.35
Kaşar Peyniri	0.97	D. Şarabı	7.51
Çerkez Peyniri	-	P. Şarabı	0.26
Beyaz Peynir	-	K. Şarabı	16.25
Kars Peyniri	-	İ. Şarabı	-
Lor Peyniri	1.00	V. Şarabı	-
Fındık	-	M. Şarabı	-
Kırmızı Biber	1.06	Şampanya	2.97
Ayçiçeği	-		

Not: Yukarıdaki değerlere kalibrasyon denkleminden yola çıkılarak ulaşılmıştır. Katı gıda maddeleri için gerçek değerler sonuçların 1.17 düzeltme faktörü ile çarpılması ile hesaplanacaktır.



Şekil 4.3. (a) Standart OTA çözeltilisine ait kromatogram
(b) Kaşar peyniri ekstresine ait kromatogram
(c) Mısır unu ekstresine ait kromatogram
(d) Buğday ekstresine ait kromatogram
(e) Şarap numunesine ait kromatogram
(f) Kırmızı biber ekstresine ait kromatogram

KAYNAKLAR

1. STEYN, P., *Toxicol. Lett.*, **82**, 843-851, 1995.
2. HALD, B., *Mycotoxins and Phytotoxins*, **88**, 57-65, 1989.
3. Van EGMOND, H.P., *Food Addit. Contam.*, **2**, 139-188, 1989
4. Ochratoxin A – Toxicological Evaluation of Contaminants, WHO Food Additives Series 35, World Health Organization (WHO), Geneva, 363-376, 1996.
5. VISCONTI, A., PASCALE, M. and CENTONZE, G., *Journal of Chromatography A*, **864**, 89-101, 1999.
6. WILKES, J.G. and SUTHERLAND, J.B., *Journal of Chromatography B*, **717**, 135-156, 1998.
7. CORNELI, S. and MARAGOS, C.M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3162-3165, 1998.
8. BOHS, B., SEIDEL, V. and LINDNER, W., *Chromatographia*, **41**, 631-637, 1995.
9. SCHWERDT, G., FREUDINGER, R., SILBERNAGL, S. and GEKLE, M. *Toxicology*, **135**, 1-10, 1999.
10. BREITHOLTZEMANUELSSON, A., OLSEN, M., OSKARSSON, A., PALMINGER, I. and HULT, K., *Journal of Food Protection*, **76**, 842-846, 1993.
11. VALENTE, H., *Journal of Chromatography A*, **815**, 75-92, 1998.
12. RICHARD, J.L., PLATTNER, R.D., MAY, J. and LISKA, S.L., *Mycopathologia*. **146**, 99-103, 1999.
13. NESHEIM, S., STACK, M.E., TRUCKSESS, M.W., EPPLEY, R.M. and KROGH, P., *Journal of AOAC International*, **75**, 481-487, 1992.
14. LARSSON, K. and MOLLER, T., *Journal Of AOAC International*, **79**, 1102-1105, 1996.
15. LAU, B.P.Y., SCOTT, P.M., LEWIS, D.A. and KANHERE, S.R., *Journal of Mass Spectrometry*, **35**, 23-32, 2000.
16. JORNET, D., BUSTO, O. And GUASCH, J., *Journal of Chromatography A*, **882**, 29-35, 2000

17. VAZQUEZ, B.I., FENTE, C., FRANCO, C., CEPEDA, A., PROGNON, P. and MAHUZIER, G., *Journal of Chromatography A*, **727**, 185-193, 1996.
18. FROHLICH, A.A., MARQUARDT, R.R. and CLARKE, J.R., *Journal of Food Protection*, **60**, 172-176. 1997
19. MARQUARDT, R.R. and FROHLICH, A.A., *Journal of Animal Science*, **70**, 3968-3988, 1992.
20. SHARMAN, M., MACDONALD, S. and GILBERT, J., *Journal of Chromatography A*, **603**, 285-289, 1992.
21. KROGH, P., *Food and Chemical Toxicology*, **30**, 213-224, 1992.
22. PITTET, A., TORNARE, D., HUGGETT, A. and VIANI, R., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 3564-3569, 1996.
23. STUDERROHR, I., DIETRICH, D.R., SCHLATTER, J. and SCHLATTER, C., *Food and Chemical Toxicology*, **33**, 341-355, 1995.
24. HURST, W.J. and MARTIN, R.A., *Journal of Chromatography A*, **810**, 89-94, 1998.
25. VRABCHEVA, T., USLEBER, E., DIETRICH, R. and MARTLBAUER, E., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2483-2488, 2000.
26. SCOTT, P.M., LAWRENCE, J.W. AND WALBEEK, VAN W., *Applied Microbiology*, **20**, 839-842, 1970.
27. INTERNATIONAL AGENCY for RESEARCH on CANCER, **31**, 1983.