

Pul Kırmızıbiberde (*Capsicum annuum* L.) Aflatoksin B1 Oranının Yakın Kızılötesi Spektroskopi (NIRS) İle Belirlenmesi

Murat Reis Akkaya¹, Osman Kola¹, Tarık Yörükoğlu², Tuğberk Ançel²

¹Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

²Kahramanmaraş Ticaret Borsası, Kahramanmaraş

Geliş Tarihi (Received): 27.06.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 22.07.2016

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): mrakkaya@adanabtu.edu.tr (M.R. Akkaya)

☎ 0 322 455 00 00 📠 0 322 455 00 09

ÖZ

Bu araştırma kırmızı pul biberde (*Capsicum annuum* L.) aflatoksin B1 oranının Yakın Kızılötesi Spektroskopi (NIRS) yardımıyla belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür ve ülkemizde bu konuda yapılan ilk araştırma olması sebebiyle de önemlidir. Numunelerin spektrumları Foss NIRSystem XDS Rapid Content Analyzer yakın kızılötesi cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Materyal olarak Kahramanmaraş Ticaret Borsası'nın pul biber üreticilerinden temin ettiği 15 adet kırmızı pul biber numunesi kullanılmıştır. NIRS'da kalibrasyon eşitliği üretmek için kırmızı pul biber numunelerinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak referans aflatoksin B1 değerleri belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, kırmızı pul biber numunelerinde aflatoksin B1 oranının 0.29-1.59 ppb arasında değiştiği saptanmıştır. Referans yöntem ile NIRS okumaları arasında elde edilen kalibrasyon belirleme katsayısı (RSQ) aflatoksin B1 oranında 0.861 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular, NIRS yönteminin kırmızı pul biberde aflatoksin B1 oranlarının belirlenmesinde hızlı ve etkili bir yöntem olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Pul biber, Aflatoksin B1, NIRS, HPLC

Determination of Aflatoxin B1 in Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Flakes Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS)

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the amount of aflatoxin B1 in red pepper (*Capsicum annuum* L.) flakes by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS). To the best of our knowledge, this is the first study on the determination of aflatoxins in red paper flakes in Turkey. Spectra of 15 different red pepper flakes obtained from producers by Kahramanmaraş Commodity Exchange were scanned using the Foss NIRSystem XDS Rapid Content Analyzer. Aflatoxin B1 contents of red pepper flakes were determined using HPLC in order to obtain reference values for the construction of calibration correlation in NIRS. Aflatoxin B1 amounts in red pepper flakes were between 0.29 and 1.59 ppb. Calibration coefficient (RSQ) between reference HPLC method and NIRS were calculated as 0.861. The results of this study showed that NIRS can serve as a quick and efficient method for the determination the Aflatoxin B1 amount in red pepper flakes.

Keywords: Pepper flakes, Aflatoxin B1, NIRS, HPLC

GİRİŞ

Biber Patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasının *Capsicum* cinsinden olup ılıman iklimlerde tek yıllık olarak yetişen bir kültür bitkisidir. Anavatanı Orta ve Güney Amerika olan biber Amerika'dan Avrupa ülkelerine ilk kez 1493 yılında İspanya'ya, daha sonra 1548 yılında İngiltere'ye ve 1578 yılında diğer Avrupa bölgelerine yayılmıştır. Biber Anadolu topraklarına 16. yy'da ilk olarak Osmanlı İmparatorluğu döneminde girmiş, Orta Avrupa ülkeleriyle kurulan sıkı ilişkiler sonucunda ilk kez İstanbul'a getirilmiş ve daha sonra Anadolu'nun diğer bölgelerine yayılmıştır. Kırmızıbiber günümüzde Antarktika kıtası haricinde dünyanın tüm yörelerinde üretilmektedir [1].

Kırmızı pul-toz biber ve isot, *Capsicum annum* L. türüne dâhil bu sebzenin kurutulmuş öğütülmesi sonucu elde edilen bir baharat [2] olup dünyada ve ülkemizde yaygın olarak sofralarda kullanılmaktadır. Kırmızıbiber dünyada karabiberden sonra ticareti en fazla yapılan baharat olması sebebiyle [3] ekonomik anlamda da oldukça önemlidir.

Ülkemizde baharatlık kırmızıbiber üretimi daha çok Akdeniz-Güneydoğu Anadolu bölgelerimizde yapılmaktadır. Türkiye biber üretiminde dünyada Çin ve Meksika'dan sonra yaklaşık 2.1 milyon ton ile 3. sırada yer almasına rağmen, kurutulmuş işlenmiş biber üretiminde 16500 ton ile ilk 20 ülke arasına girememekte ve mevcut ihracat potansiyelini değerlendirememektedir [4].

Kırmızıbiberlerin de içinde yer aldığı tarım ürünlerinin kontamine olduğu biyolojik maddelerin başında küf mantarları gelmektedir. Ürünün bulunduğu ortamın bağıl nemi, ürünün su aktivitesi ve sıcaklık küf mantarlarının gelişmesinde belirleyici bir rol oynamaktadır. Küflerin gelişimi sırasında normal metabolizması için önemli bir role sahip olmayan, ancak insan ve hayvanlarda kanserojen, mutajen, teratojen ve östrojenik etkiler gibi akut ve kronik etkilere neden olabilen mikotoksinler oluşmaktadır [5,6]. Bu mikotoksinlerden kırmızıbiberlerde en yaygın oluşmaları ise aflatoksinlerdir.

Avrupa Birliği (Commission Regulation EC No.1881/2006, Commission Regulation EU No 165/2010) ve Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Tebliğine göre kurutulmuş biber ve baharatlarında bulunabilecek maksimum aflatoksin miktarı aflatoksin B1 için 5 ppb, toplam aflatoksin için ise 10 ppb'dir. Ülkemizde kırmızıbiberlerle ilgili ilk ciddi sorunlar 90'lı yıllarda ihraç edilen ürünlerin Avrupa ülkelerinden iade edilmesi ile dikkati çekmiş, Türkiye'den 1994 yılının sonlarında Almanya ve İsviçre'ye ihraç edilen kırmızıbiberler aflatoksin içerdikleri gerekçesi ile iade edilmiştir [7].

İnsan sağlığı ve sosyal gelişimle yakın ilişkisi olan gıda güvenliği ve gıda kalitesi tüm Dünya ülkelerinde hala önemli bir konu olarak ele alınmaktadır. Tüketiciler gün geçtikçe gıda ürünleri üzerinde kalite etiketleri ve güvenilir olduğuna dair işaretler aramakta, üreticilerden yüksek kalitede ürünler beklemektedirler. Tüm bu

faktörler gıda kalitesinin değerlendirilmesinde güvenilir tekniklerin önemini vurgulamaktadır.

Uygulamadaki ihtiyaçlar göz önüne alındığında, NIRS teknolojisi gibi hızlı ve etkili metotlar geliştirmenin önemi ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda, gerek gıdaların üretiminde gerekse gıda araştırmalarında hızlı, güvenilir ve çevre dostu teknolojilere olan ilgi artmakta, buna bağlı olarak da geleneksel metotlara alternatif çeşitli teknolojiler geliştirilmektedir. Bu teknolojilerin en önemlilerinden birisi de yaygın kullanım alanı olan Yakın Kızılötesi (NIR) Spektroskopisidir [8]. Uygun bir kalibrasyondan sonra gıda analizlerinde kolaylıkla kullanılabilen hızlı, güvenilir ve çevre dostu NIR Spektroskopisi 400-2500 nm dalga boyu aralığında ki elektromanyetik radyasyon absorpsiyonu temeline dayanan ve analiz amaçlı kullanılan bir teknolojidir [9].

Gıda örneklerindeki analitik ve kalite faktörlerinin bahsedilen dalga boyu aralığındaki elektromanyetik spektrumundaki absorpsiyonunun korelasyon ile çözümlenmesi prensibine dayanan NIR spektroskopisi özellikle gıda ve tarımsal ürünlerin duyuşal, fiziksel ve kimyasal analizlerinde rutin olarak kullanılabilmesine imkan sağlamaktadır [10].

Aflatoksin analizleri maliyetli, sonuç alınması uzun süren ve ciddi korunma tedbirleri alınmadığı takdirde insan sağlığı açısından çok tehlikeli olabilen analizlerdir. NIRS analiz yöntemi ise oldukça hızlı, analiz sırasında hiçbir kimyasal maddeye ihtiyaç duyulmayan, son yıllarda tahıllar başta olmak üzere birçok üründe kalite parametrelerinin saptanmasını gerektiren her aşamada yaygın olarak kullanılan ve aynı anda birden fazla parametrede sonuç elde edilebilen bir analiz yöntemidir. Bu araştırma artık birçok gıda maddesinin analizinde kullanılan NIRS analiz yönteminin ülkemizde tüketimi oldukça yaygın bir baharat olan kırmızı pul biberde aflatoksin B1 oranının belirlenmesinde kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla yürütülmüştür ve ülkemizde bu konuda yapılan ilk araştırma olması sebebiyle de önemlidir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada materyal olarak Kahramanmaraş Ticaret Borsasının pul biber üreticilerinden temin ettiği 15 adet kırmızı pul biber numunesi kullanılmıştır. Kırmızı pul biber numunelerinde referans yöntemle aflatoksin B1 oranlarının belirlenmesi Shimadzu marka HPLC (LC-20AT) FD (RF-10AXL) cihazı kullanılarak AOAC.999.07 metoduna [11] göre yapılmıştır.

Araştırmada, referans analizleri yapılan kırmızı pul biber numunelerinden spektrumların alınmasında Foss marka NIRSystem XDS near-infrared Rapid Content Analyser cihazı ve "ISI scan" programı kullanılmıştır. Spektrumlar alınmadan önce numuneler herhangi bir ön işleme tabi tutulmamıştır. Kalibrasyon eşitliğinin üretilmesi "WinISI III V1.61" programında gerçekleştirilmiştir. Kırmızı pul biber numunelerinin 400-2500 nm dalga boyları arasındaki spektrumları her 2 nm'de bir olmak üzere alınmıştır. Alınan spektrumlardan kalibrasyon eşitliğinin üretilmesinde kısmi en az kareler (PLS) metodu

kullanılmıştır [12]. HPLC referans yöntemiyle analizi yapılarak elde edilen veriler NIRS sonuçlarıyla ilişkilendirilmiş ve farklı matematiksel modeller denenerek en uygun sonucu veren kalibrasyon modeli belirlenmiştir. Bu çalışmada tahminin standart hatası (SEP), bias, eğim ve NIRS ile referans değerlerden elde edilen korelasyon katsayısı ($RSQ=R^2$) parametreleri kalibrasyon modelinin geliştirilmesi ve doğrulamanın hassasiyetinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırmada kırmızı pul biber örneklerinde referans yöntemle (HPLC metodu) ve NIRS yardımıyla belirlenen aflatoksin B1 oranlarının kalibrasyon ve doğrulama istatistikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kırmızı pul biber numunelerinde aflatoksin B1 oranlarına ait kalibrasyon ve doğrulama istatistikleri

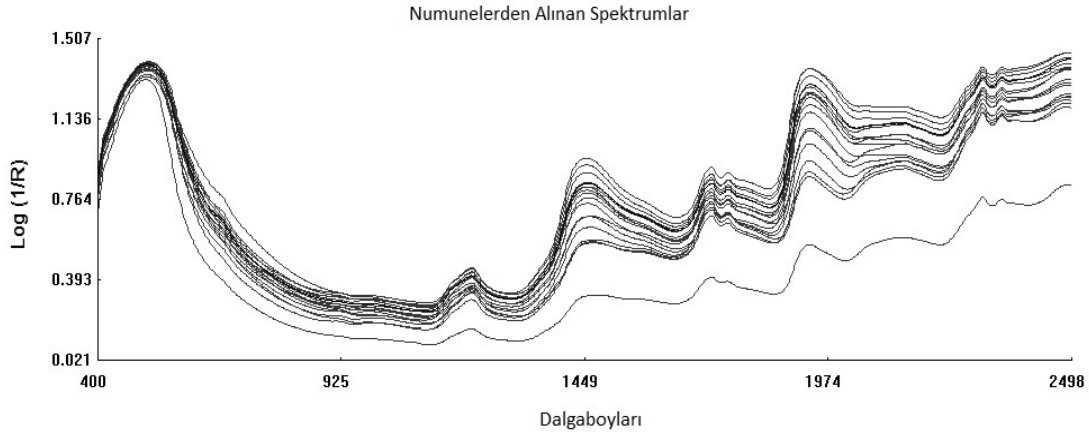
Özellikler	Ortalama±SS	Min (%)	Maks. (%)	RSQ (R^2)	SEP	Bias	Eğim
Aflatoksin B1 (ppb)	0.83±0.34	0.29	1.59	0.861	0.127	0.00	1.00

SS: Standart Sapma, RSQ (Coefficient of determination of Calibration): Kalibrasyon Belirleme Katsayısı, SEP (Standart Error of Prediction): Tahminin Standart Hatası

Kırmızı pul biber numunelerinden elde edilen verilerin spektrumları da Şekil 1'de verilmiştir. Spektrumları alınan örneklerin 1400 nm'den önceki ve 2000 nm'den sonraki dalga boylarında spektrumlarının birbirine yakın olduğu gözlenirken diğer dalga boylarında ise numunelere ait spektrumların genişlediği görülmektedir.

Aflatoksin B1 oranlarına ilişkin referans değerler ile NIRS değerlerinin karşılaştırılmasına ait elde edilen

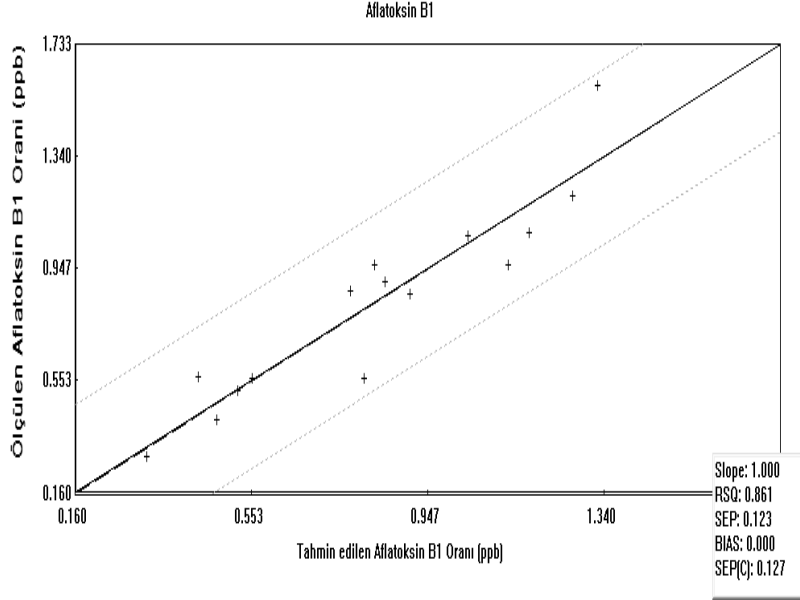
bulgularda Şekil 2'de görülmektedir. Değerlerin koordinat düzlemi üzerinde oluşturduğu noktaların eğimleri ve kalibrasyon belirleme katsayıları Şekil 2 üzerinde verilmiştir. Aflatoksin B1 oranında kalibrasyon belirleme katsayısının yüksek olması doğrulama 1'e yakın olmasına neden olmuştur. Bu durum gerçek değerler ile tahmin edilen değerlerin birbirleriyle oldukça yakın bir ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir.



Şekil 1. Kırmızı pul biber numunelerine ait Foss NIRSystem XDS ile belirlenen spektrumlar

Tablo 1'in incelenmesiyle görülebileceği gibi, referans yöntemle yapılan analizler sonucunda kırmızı pul biber numunelerinde aflatoksin B1 oranının ortalama 0.83 ppb olduğu ve aflatoksin B1 oranlarının 0.29 ppb ile 1.59 ppb arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 1). Kalibrasyon belirleme katsayısı (RSQ) aflatoksin B1 için 0.861 olarak saptanmıştır. İncelenen özelliklerden Tahminin Standart Hatası (SEP) 0.127 olarak belirlenmiştir. Bias referans klasik analizlerin ortalaması ile NIRS analizlerinin ortalaması arasındaki farka bağlı olarak belirlenen bir değer olup, sifıra yakın olması istenirken; kalibrasyon

modeline ait uyum çizgisinin eğiminin 1 olması durumunda, uyum çizgisi referans değerlerle NIRS değerlerine eşit mesafede bir doğru çizmektedir. Tahminin Standart Hatası'nın sifıra, Kalibrasyon Belirleme Katsayısı'nın 1'e yakın olması kalibrasyon modelinin daha iyi olduğunu ifade etmektedir [13]. Araştırmada kırmızı pul biberlerde belirlenen bias değerinin 0.00 ve eğim değerinin de 1.00 olması, klasik yöntemle elde edilen bulgular ile NIRS analiz sonuçlarının uyumlu olduğunu göstermektedir.



Şekil 2. Aflatoksin B1 için referans klasik analizle NIRS tahminlerinin karşılaştırılması

Kırmızıbiber ile yapılan benzer bir çalışmada [14], 50 adet kırmızı biberde doğal bulaşmış mikotoksinlerin NIRS ile analiz potansiyelini araştırmışlar ve aflatoksin B1 oranını HPLC referans yöntemiyle test ederek NIRS'da bir kalibrasyon eşitliği üretmişlerdir. Bunun sonucunda, referans yöntem ile ölçülen aflatoksin B1 oranları ile NIRS'da tahmin edilen aflatoksin B1 oranları karşılaştırıldığında da RSQ değerinin 0.962, SEP değerinin ise 0.2 olduğunu saptamışlardır. Araştırmamızda elde edilen RSQ değerlerinin Hernandez-Hierro ve ark.'nın [14] bulgularına göre düşük olduğu, buna karşın SEP değerlerinin daha iyi olduğu belirlenmiştir.

Tripathi ve Mishra, [15], kırmızı toz biberde aflatoksin B1'in Fourier Transform Yakın Kızılötesi Spektroskopisi (FT-NIRS) yöntemi ile belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, 65 adet kırmızı toz biber numunesine 15-500 ppb arasında değişen oranlarda aflatoksin B1 bulaştırarak HPLC ve TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) referans yöntemleri ile analizlerini yapmışlardır. Referans yöntemler ve FT-NIRS'da okunan değerler karşılaştırıldığında her iki referans yöntemde de RSQ değerini 0.99 olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmamızda elde edilen RSQ değerinin bu çalışmada [15] tespit edilen değerden daha düşük olduğu görülmüştür.

Mısır ve arpada aflatoksin B1'in NIRS ile belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada [16], 28'i pozitif olan 66 adet mısır numunesini, 24'ü pozitif olan 76 adet te arpa numunesini eliza referans analiz yöntemini kullanarak test etmişler ve NIRS'da bir kalibrasyon eşitliği üretmişlerdir. Ürettikleri kalibrasyon eşitliklerinde RSQ değerini mısırdaki 0.89, arpada ise 0.85 olarak bulmuşlardır. Araştırmamızda kırmızı bul biberde elde edilen aflatoksin B1 oranına ait RSQ değerinin mısır için belirlenen RSQ değerinden daha düşük, arpaya göre ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Qiang ve ark., [17] tarafından çeltikte aflatoksin B1'in NIRS ile belirlenmesi amacıyla yapılan araştırmada doğal bulaşık 80 adet çeltik numunesi eliza referans analiz yöntemi ile çalışılmıştır. Çeltik numunelerinde referans yöntemle 7.05 ppb ile 54.82 ppb arasında olduğu belirlenen aflatoksin B1 düzeyleri NIRS'da tahmin edilen değerler ile karşılaştırıldığında da RSQ değerinin 0.852 olduğu saptanmıştır. Bu araştırmada elde edilen RSQ değerinin bu değer üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

SONUÇ

Sonuç olarak, kırmızı pul biberde aflatoksin B1 oranlarının tahmin edilmesinde NIRS yönteminin referans yöntemlere göre hızlı ve etkili bir yöntem olduğu ve klasik kimyasal analiz yöntemlerine göre daha az numune ile daha kısa sürede gerçekleştirilebildiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra, aflatoksin B1 oranının belirlenmesinde klasik kimyasal analiz yöntemleri ve enstrümantal analiz yöntemlerinde farklı birçok kimyasal kullanılırken, NIRS analiz yönteminde herhangi bir kimyasal kullanılmaması bakımından çevreci bir yöntemdir. Elde edilen bulgular kalibrasyon ve doğrulama sonuçlarının NIRS'in kırmızı pul biberde aflatoksin B1 oranlarının tahmininde kullanılabileceğini, önceki çalışmalardan farklı olarak çok daha düşük aflatoksin B1 düzeylerinin bu yöntemle de belirlenebileceğini göstermektedir. Ayrıca hızlı ve etkili sonuçlar veren NIRS yönteminin kırmızı pul biber üretimi, ticareti ve pazarlanmasında kullanımının önemli avantajlar sağlayacağı düşünülmektedir. Kırmızı pul biber dışında da birçok üründe aflatoksin B1 oranının NIRS analiz yöntemi ile kolaylıkla saptanabileceği görülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Arslanğray, Y., 2015. Şanlıurfa'da Geleneksel Olarak Üretilen Pul Biberlerde Aflatoksin Oluşum Aşamalarının Belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- [2] Akgül, A., 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi. *Gıda Teknolojisi Derneği* No: 15, Ankara, 451s.
- [3] Özbey, F., Kabak, B., 2012. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control* 28: 354-361.
- [4] Anonim, 2016. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Erişim:14.06.2016.
- [5] Jay, J.M., 1992. Modern Food Microbiology, (4th ed.) Chapman and Hall, London. 675p.
- [6] Smith, J.E., 2001. Mycotoxins, Edited by David H. Watson, Food Chemical Safety. CRC Press ISBN 0-8493-1210-8, p: 234-255.
- [7] Yıldırım, T., Tanrıseven, A., Özkaya, Ş., 1997. Bursa ve Sakarya kırmızı biberlerinde aflatoksin çalışması. *Gıda Teknolojisi* 6: 60-64.
- [8] Cen, H. and He, Y., 2007. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science and Technology* 18(2): 72-83.
- [9] Davies, A.M.C., Granth, A., 1987. Near-infrared analyses of foods. *International Journal of Food Science and Technology* 22: 191-207.
- [10] Williams, P.C. and Norris, K.H., 1987. Near-infrared technology in the agricultural and food industries, *American Association of cereal Chemists, Inc.*, St. Paul, MN.
- [11] AOAC, 2008. Aflatoxin B1 and Total Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste, and Paprika Powder, 49.2.29. *AOAC Official Method* 999.07.
- [12] Blanco, M., Villarroya, I., 2002. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends in Analytical Chemistry* 21(4): 240-250.
- [13] Başlar, M. 2008. Ekmeklik Buğday Unlarının Bazı Kalite Özelliklerinin Yakın Kızılötesi Spektroskopisi (NIRS) Kullanılarak Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum.
- [14] Hernandez-Hierro, J.M., Garcia-Villanova, R.J. Gonzalez-Martın, I., 2008. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Analytica Chimica Acta* 622: 189-194.
- [15] Tripathi, S., Mishra, H.M., 2009. A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Food Control* 20: 840-846.
- [16] Fernández-Ibañez, V., Soldado, A., Martínez-Fernández, A., Roza-Delgado, B., 2009. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment. *Food Chemistry* 113: 629-634.
- [17] Qiang, Z., Fuguo, J., Chenghai, L., Jingkun, S., Xianzhe, Z., 2014. Rapid detection of aflatoxin B1 in paddy rice as analytical quality assessment by near infrared spectroscopy. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 7(4): 127-133.