

**Atıf İçin:** Uğur Y, Yaman R, 2022. UFLC-FD Metodu ile Kayısı Çekirdeğinde Aflatoksin Tayini ve Laboratuvar İçi Metot Validasyonu. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(3): 1734 - 1742.

**To Cite:** Uğur Y, Yaman R, 2022. Determination of Aflatoxin in Apricot Kernel with UFLC-FD Method and In-Laboratory Method Validation. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(3): 1734 - 1742.

## UFLC-FD Metodu ile Kayısı Çekirdeğinde Aflatoksin Tayini ve Laboratuvar İçi Metot Validasyonu

Yılmaz UĞUR<sup>1\*</sup>, Rukiye YAMAN<sup>2</sup>

**ÖZET:** Mevcut çalışmada kayısı çekirdeği ve yer fıstığı örneklerinde aflatoksin varlığı incelenmiş ve uygulanan metodun laboratuvar içi validasyonu iki analist tarafından gerçekleştirilmiştir. Kayısı çekirdeği örnekleri Malatya ilinde kayısı ticareti yapılan Şire Pazarı'ndan, yer fıstığı örnekleri ise yine aynı ildeki bazı kuruyemişçilerden temin edilmiştir. Association of Official Analytical Chemists (AOAC)'nin 991.31 nolu metodu ile floresans dedektörlü ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC-FD) sisteminde analizler gerçekleştirilmiştir. Kayısı çekirdeği örneklerinden bir tanesinde aflatoksin B<sub>1</sub> 1.250±0.081 µg kg<sup>-1</sup> ve toplam aflatoksin 1.401±0.097 µg kg<sup>-1</sup> olarak ölçülürken diğer kayısı çekirdeği ve yer fıstığı örneklerinde aflatoksin tespit edilememiştir. Analitik çalışmalar sonucunda aflatoksin standardının UFLC-FD sisteminde lineer ölçüm aralığı 0.08 – 2.5 µg kg<sup>-1</sup>, aflatoksin B<sub>1</sub> ve toplam aflatoksin için LOD değerleri sırasıyla 0.036 ve 0.120 µg kg<sup>-1</sup>, LOQ değerleri ise 0.084 ve 0.280 µg kg<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Aflatoksin, kayısı çekirdeği, metot validasyonu, yer fıstığı, ultra hızlı sıvı kromatografisi

### Determination of Aflatoxin in Apricot Kernel with UFLC-FD Method and In-Laboratory Method Validation

**ABSTRACT:** In the present study, the presence of aflatoxin in the apricot kernel and peanut samples was investigated, and in-laboratory validation of the applied method was performed by two analysts. Apricot kernel samples were procured from Şire Pazarı, where apricots were traded in Malatya province, and peanut samples were provided from dried nut shops in the same province. Analyzes were carried out in the ultra-fast liquid chromatography (UFLC-FD) system with fluorescence detector using method no. 991.31 of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). In one of the apricot kernel samples, aflatoxin B<sub>1</sub> and total aflatoxin were measured as 1.250±0.081 and 1.401±0.097 µg kg<sup>-1</sup>, respectively, while aflatoxin wasn't detected in the other apricot kernel and peanut samples. As a result of the analytical studies, the linear measurement range of the aflatoxin standard in the UFLC-FD system was determined as 0.08 – 2.5 µg kg<sup>-1</sup>, the LOD values for aflatoxin B<sub>1</sub> and total aflatoxin were 0.036 and 0.120 µg kg<sup>-1</sup>, and the LOQ values were 0.084 and 0.280 µg kg<sup>-1</sup>, respectively.

**Keywords:** Aflatoxin, apricot kernel, method validation, peanut, ultra-fast liquid chromatography

<sup>1</sup> Yılmaz UĞUR ([Orcid ID: 0000-0002-9040-4249](https://orcid.org/0000-0002-9040-4249)), İnönü Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, Malatya, Türkiye

<sup>2</sup> Rukiye YAMAN ([Orcid ID: 0000-0002-2996-4386](https://orcid.org/0000-0002-2996-4386)), Kayısı Araştırma Enstitüsü, Malatya, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yılmaz UĞUR, e-mail: yilmaz.ugur@inonu.edu.tr

## GİRİŞ

Aflatoksinler genellikle *Aspergillus* cinsi içerisinde yer alan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* türü küfler tarafından üretilen ve insan sağlığını tehdit eden farklı fraksiyonları olan bir mikotoksin gurubudur. Birçok tarımsal veya hayvansal üründe hasat, nakliye, depolama ve işleme süreçlerinde küf kontaminasyonu ya da uygun olmayan muhafaza koşullarına bağlı olarak aflatoksinlere rastlanabilmektedir. Kanserojen ve teratojen özelliklerinin yanısıra immün sistemi baskılaması, karaciğer, bağırsak ve böbreklerde bazı hastalıklara yol açması, bu toksin üzerine araştırmacıların yoğunlaşmasına ve ülkelerin bazı yasal düzenlemeler yapmasına neden olmuştur (Açı ve Ocak, 2019; Hepsağ, 2020). Aflatoksinlerin sağlık üzerinde oluşturduğu risklere ilaveten ekonomik kayıplara da neden olduğu bilinmektedir. Çünkü aflatoksin içeren gıdaların hem iç pazarda tüketimi hem de dış pazarlara ihracatı mümkün olmamaktadır. Limitlerin üzerinde aflatoksin içeren gıdalar doğrudan imha edilmektedir. Kontrol mekanizmalarının zayıf işlediği ülkelerde ise bu ürünler iç piyasada tüketime sunularak insan sağlığı tehlikeye atılmaktadır (Karapınar, 2013). Birçok ülke, gıdalarda bulunabilecek mikotoksin düzeyleri için limitler belirlemiş ve bunu sıkı bir şekilde kontrol etmektedir. Bu bağlamda ülkemizde doğrudan tüketime sunulmayan sert kabuklu meyvelerde maksimum düzeyde bulunabilecek toplam aflatoksin miktarı  $15 \mu\text{g kg}^{-1}$  olarak belirlenmiş olmakla beraber; doğrudan tüketime sunulan kayısı çekirdeği, antepfıstığı, badem ve fındık gibi gıdalarda toplam aflatoksin limiti  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ 'dir (Anonim, 2011).

Kayısı; sert kabuklu çekirdeği ile meyvesi taze ve kuru olarak tüketilen bir bitkidir. Meyve çekirdek içi çeşide bağlı olarak acı veya tatlı olabilmektedir. Malatya'da şehrin ekonomisine önemli katkıları olan ve yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan Hacıhaliloğlu çeşidinin meyvelerine ait tohumlar tatlıdır ve çerez olarak tüketilmektedir (Uğur ve Erdoğan, 2021). Literatürde fındık (Şimşek ve ark., 2002; Aluç ve Aluç, 2003; Özçakmak ve Dervişoğlu, 2007), fıstık (Bircan ve ark., 2008; Okello ve ark., 2010; Sedefoğlu, 2013; Lavkor ve Biçici, 2015), badem (Bruce ve ark., 2003; Gürses ve Erdoğan, 2004; Gürses, 2007) ve ceviz (Bruce ve ark., 2003; Gürses, 2007; Cüce, 2019) gibi çerez olarak tüketilen kabuklu tohumlarda aflatoksin varlığını araştıran birçok çalışma mevcut iken kayısı çekirdeği ile ilgili çalışmalar sınırlıdır.

En yaygın bilinen aflatoksin türleri  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $M_1$  ve  $M_2$ 'dir. Gıdalarda en sık bulunan ve sağlık açısından en riskli olanı aflatoksin  $B_1$ 'dir. Gıda örneklerinde aflatoksin analizi sonuçları çoğunlukla aflatoksin  $B_1$  ve toplam aflatoksin olarak verilmektedir. Aflatoksin analizinde; Elisa, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gaz kromatografisi ve sıvı/gaz kromatografisi kütle spektrometresi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Gıdalar aflatoksini eser düzeyde içerdiklerinden immüno affinite kolonlar (IAK) kullanılarak ön deriştirme yapılmakta ve sonra tayin gerçekleştirilmektedir (Oruç, 2005).

Tüketici sağlığını korumayı amaçlayan gıda güvenliği; gıdalarda olası risk ve tehlikelerin giderilmesini ve/veya azaltılmasını kapsar. Gıda kontrolü ve laboratuvar hizmetleri bu kapsamın önemli parçalarıdır. Gıda analizlerinde sonuçların güvenilirliği, uygulanan metodun geçerli kılınmasıyla yani metot validasyonu ile yakından ilişkilidir. Metot validasyonu; bir analiz metodunun doğru olarak uygulanabilmesini sağlamak, doğru olarak kullanıldığını belgelemek ve ölçüm sonuçlarının doğruluk ve kesinlik değerlerini ortaya koymak amacıyla yapılmaktadır. Bir metodun bir laboratuvarında ilk defa uygulanması ve kullanılan metodun revizyonu ya da farklı cihaz veya kişiler tarafından uygulanması gibi durumlarda yapılmaktadır. Bu amaçla kantitatif analizlerde lineer ölçüm aralığı, kesinlik, doğruluk, geri alma, ölçüm ve tayin limitleri gibi parametreler test edilmektedir (Bayraç ve Camızcı, 2020; Hepsağ, 2020).

Bu çalışmada kayısı çekirdeği içi ve yer fıstığında aflatoksin B<sub>1</sub> ile toplam aflatoksin (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>)'in kantitatif tayini için iki analist tarafından UFLC-FD sistemi kullanılarak AOAC'nin 991.31 nolu metodunun laboratuvar içi validasyon çalışması yapılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmanın materyalini oluşturan kayısı çekirdeği içi ve yer fıstığı numuneleri Malatya ilinde kuruyemiş ticareti yapan firmalardan temin edilmiştir. Numuneler blender yardımıyla homojenize edildikten sonra analize tabi tutulmuştur. Çalışmada aflatoksin standardı (Aflatoxin mix 4 solution, Supelco, Sigma Aldrich), metanol (Merck), KBr (Merck), NaCl, HNO<sub>3</sub>, ultra saf su (Millipore Direct-Q 3 UV-R) ve PBS (phosphate-buffered saline) (Sigma Aldrich) reaktif ve kimyasalları kullanılmıştır.

### Numunenin Hazırlanması

50 g homojenize edilmiş örnek, 4 g NaCl ve 100 mL ultra saf su karışımı blenderde 1 dk süreyle karıştırıldıktan sonra ortama 150 mL metanol ilave edilerek 2 dak süreyle yüksek hızda tekrar karıştırılmıştır. Süzme işlemi yapılarak süzüntüden alınan 5 mL karışım, 15 mL PBS çözeltisi ile seyreltilmiştir. Ekstraktın ön deriştirme ve temizlik işlemleri için IAK (Aflatest, Vicam) kolon 10 mL PBS çözeltisi ile şartlandırılmış, ardından seyreltilmiş süzüntü 3 mL dk<sup>-1</sup> hızla kolondan geçirilmiştir. Yıkama ve kurutmayı takiben sırasıyla 1 mL metanol ve 1 mL ultra saf su ile aflatoksinler elüe edilerek viale alınmış ve UFLC-FD sistemine enjekte edilmiştir.

### UFLC-FD koşulları

Analizlerde DGU-20A vakum degazörü, 20 ADXR solvent pompası, RF-20A floresans dedektörü ve kolon fırını kombinasyonundan oluşan Shimadzu (Shimadzu Technologies, Kyoto, Japan) marka UFLC-FD sistemi kullanılmıştır. Ayırma işlemi ODS-3 (250x4.6 mm, Inertsil) 5µm gözenek çaplı kolonda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, ultra saf su ve metanol (50/50 v/v) karışımına 119 mg KBr L<sup>-1</sup> ve 100 µL HNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> eklenerek hazırlanmıştır. Aflatoksin türevlendirme işlemi için kolon ve dedektör arasında türevlendirme ünitesi (KOBRA CELL, r-biopharm) monte edilmiştir. Dedektör eksitasyon dalga boyu 360 nm, emisyon dalga boyu 430 nm, kolon sıcaklığı 30°C, pompa akış hızı 1 mL dak<sup>-1</sup> ve enjeksiyon hacmi 100 µL olarak ayarlanmıştır.

### Metot validasyonu

Bu kapsamda tayin limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ) ve lineer ölçüm aralığı belirlenmiştir. Ayrıca iki analist tarafından aflatoksin içermeyen kayısı çekirdeği içi ve yer fıstığı örneklerine son derişimi 0.6 ve 1.5 µg L<sup>-1</sup> olacak şekilde standart ekleme yapılarak kesinlik parametrelerinden tekrarlanabilirlik, tekrarlanabilirlik limiti, tekrar üretilebilirlik, tekrar üretilebilirlik limiti; doğruluk parametrelerinden % hata ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

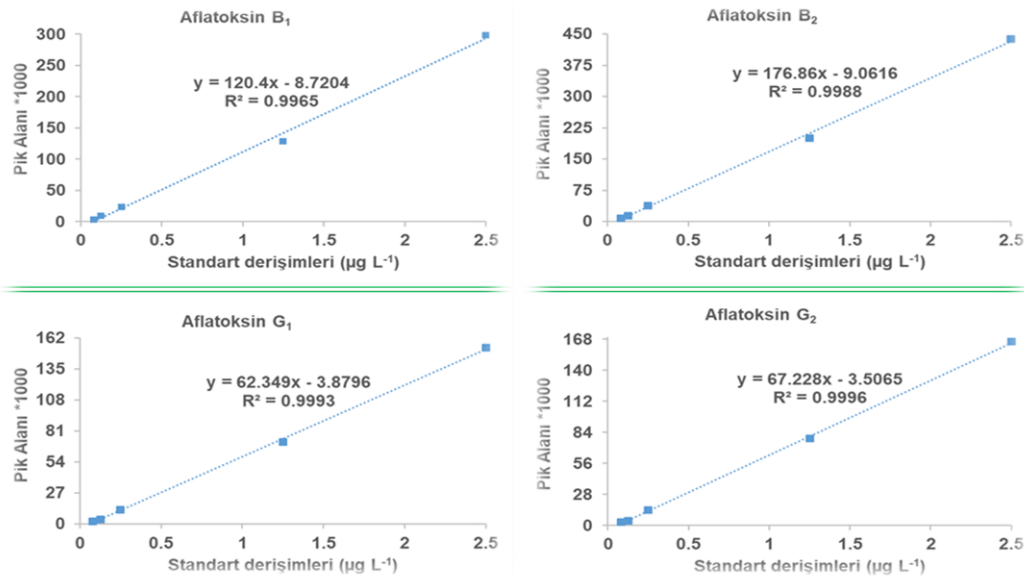
Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) çalışması için cihazda okunabilen en düşük konsantrasyonların en az 3 katı konsantrasyonda (0.1 ppb) çalışma standardı hazırlanarak 8 kez UFLC cihazına enjekte edilmiştir. LOD=3x standart sapma (ss) ve LOQ=10xstandart sapma formüllerine göre hesaplamalar yapılarak sonuçlar çizelge 1'de sunulmuştur. Lineer ölçüm aralığını belirlemek için 0.08-2.5 µg L<sup>-1</sup> derişim aralığında 6 farklı konsantrasyonda standartlar hazırlanarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 1). Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> için oluşturulan kalibrasyon eğrilerinde korelasyon katsayısı (R<sup>2</sup>) değerleri sırasıyla 0.9965, 0.9988, 0.9993 ve 0.9996 olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin lineer olması yani analit miktarı ile cihaz yanıtının orantılı

olması ve  $R^2$  değerinin 0.99'dan büyük olması istenir. Mevcut çalışmada seçilen derişim aralıkları ile oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin  $R^2$  değerleri 0.99'dan büyüktür.

Çizelge 1. Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ve TA için LOD ve LOQ değerleri ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )

AnalizNo	Aflatoksin B <sub>1</sub>	Aflatoksin B <sub>2</sub>	Aflatoksin G <sub>1</sub>	Aflatoksin G <sub>2</sub>	TA*
1	0.119	0.115	0.128	0.084	0.446
2	0.124	0.117	0.133	0.122	0.496
3	0.114	0.114	0.116	0.117	0.461
4	0.109	0.115	0.123	0.12	0.467
5	0.107	0.107	0.111	0.106	0.431
6	0.104	0.107	0.116	0.115	0.442
7	0.105	0.1	0.106	0.101	0.412
8	0.104	0.102	0.103	0.108	0.417
ORT	0.109	0.117	0.110	0.111	0.447
SD	0.012	0.010	0.007	0.008	0.028
LOD	0.036	0.030	0.021	0.024	0.084
LOQ	0.120	0.100	0.070	0.080	0.280

\*Toplam aflatoksin (TA): B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>



Şekil 1. Aflatoksin (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) kalibrasyon grafikleri

Kesinlik, aynı şartlarda birden fazla ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığının ifadesidir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik bileşenlerini içeren kesinlik parametresi için yapılan ölçümlerin standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (RSD) değerleri hesaplanır. Genel olarak RSD değerinin  $\leq 0.20$  olması beklenir (18). Mevcut çalışmada kesinlik parametrelerinden tekrarlanabilirlik için iki analist tarafından iki ayrı örnekte 0.6 ve 1.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  derişimlerinde her biri 8 adet olmak üzere toplam 64 adet geri alma çalışması yapılmış ve sonuçlar [ortalama (ORT), SD ve RSD] Çizelge 2'de verilmiştir. Tekrarlanabilirlik limiti (r) ise, Eşitlik 1'den yararlanılarak her iki analist için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Çizelge 2).

$$r = 2.8 \times \text{SD} \quad (1)$$

Tekrar üretilebilirlik çalışmasında iki analist tarafından iki ayrı örnekte 0.6 ve 1.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  derişimlerinde her biri 8 adet olmak üzere toplam 64 adet geri alma çalışması yapılmış ve sonuçlar (ORT, SD, RSD, SDbirleşik ve RSDbirleşik) Çizelge 3'de verilmiştir. Tekrar üretilebilirlik limiti (R), Eşitlik 2'ye göre her bir aflatoksin için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Çizelge 3).

İki farklı derişimde ve iki ayrı analist tarafından yapılan tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında yapılan ölçümlerden hesaplanan RSD değerleri kabul edilebilir en yüksek limit olan 0.20 değerinden küçüktür (Çizelge 2, 3).

$$R = 2.8 \times \text{SDbirleşik} \quad (2)$$

Çizelge 2. Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ve TA için tekrarlanabilirlik verileri

1. Analist										
Kayısı Çekirdeği										
	0.6					1.5				
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	TA	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	TA
ORT	0.548	0.581	0.554	0.553	2.235	1.399	1.487	1.399	1.325	5.610
SD	0.033	0.036	0.036	0.029	0.121	0.097	0.096	0.104	0.094	0.360
RSD	0.060	0.061	0.064	0.053	0.054	0.069	0.064	0.074	0.071	0.064
Horwitz	49.00	48.57	48.92	48.94	39.69	42.58	42.19	42.58	42.92	34.57
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	0.092	0.100	0.099	0.082	0.338	0.271	0.268	0.292	0.264	1.008
Yerfıstığı										
ORT	0.401	0.463	0.422	0.420	1.706	0.929	1.303	1.142	1.238	4.613
SD	0.044	0.048	0.047	0.055	0.180	0.060	0.091	0.088	0.092	0.305
RSD	0.111	0.103	0.112	0.131	0.105	0.064	0.070	0.077	0.074	0.066
Horwitz	51.35	50.26	50.96	50.99	41.33	45.27	43.03	43.89	43.41	35.60
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	0.124	0.134	0.133	0.154	0.503	0.167	0.254	0.246	0.257	0.853
2. Analist										
Kayısı Çekirdeği										
ORT	0.456	0.523	0.499	0.521	1.999	1.360	1.462	1.383	1.278	5.483
SD	0.033	0.031	0.032	0.025	0.109	0.103	0.083	0.095	0.084	0.335
RSD	0.073	0.059	0.065	0.048	0.055	0.076	0.057	0.068	0.066	0.061
Horwitz	50.37	49.35	49.69	49.37	40.36	42.76	42.29	42.65	43.16	34.69
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	0.093	0.086	0.091	0.071	0.305	0.290	0.233	0.265	0.236	0.938
Yerfıstığı										
ORT	0.443	0.507	0.476	0.493	1.919	1.074	1.142	1.117	1.056	4.255
SD	0.046	0.052	0.051	0.055	0.190	0.033	0.059	0.057	0.053	0.476
RSD	0.104	0.102	0.107	0.112	0.099	0.031	0.051	0.051	0.051	0.112
Horwitz	50.59	49.58	50.05	49.79	40.60	44.30	43.89	44.04	44.41	36.03
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	0.129	0.145	0.142	0.155	0.531	0.092	0.164	0.158	0.149	1.332

Çizelge 3. Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ve TA için tekrar üretilebilirlik verileri

	B <sub>1</sub>				B <sub>2</sub>				
	Kayısı Çekirdeği		Yer Fıstığı		Kayısı Çekirdeği		Yer Fıstığı		
	0.6	1.5	0.6	1.5	0.6	1.5	0.6	1.5	
ORT	0.573	1.287	0.613	1.288	0.556	1.270	0.591	1.288	
SD	0.100	0.216	0.090	0.126	0.093	0.187	0.102	0.149	
RSD	0.174	0.168	0.147	0.098	0.167	0.147	0.173	0.115	
Horwitz	48.68	43.11	48.18	43.11	48.90	43.20	48.45	43.11	
SD <sub>birleşik</sub>		0.142					0.138		
RSD <sub>birleşik</sub>		0.150					0.152		
Tekrar üretilebilirlik limiti		0.398					0.386		
	G <sub>1</sub>				G <sub>2</sub>				
	ORT	0.578	1.291	0.602	1.295	0.510	1.185	0.566	1.217
	SD	0.087	0.208	0.104	0.151	0.074	0.173	0.086	0.149
RSD	0.150	0.161	0.172	0.117	0.146	0.146	0.151	0.123	
Horwitz	48.61	43.09	48.32	43.07	49.53	43.65	48.76	43.47	
SD <sub>birleşik</sub>		0.145					0.127		
RSD <sub>birleşik</sub>		0.152					0.142		
Tekrar üretilebilirlik limiti		0.407					0.357		
	TA								
	ORT	2.218	5.033	2.372	5.089				
	SD	0.350	0.768	0.371	0.546				
RSD	0.158	0.153	0.157	0.107					
Horwitz	39.73	35.14	39.33	35.08					
SD <sub>birleşik</sub>		0.536							
RSD <sub>birleşik</sub>		0.145							
Tekrar üretilebilirlik limiti		1.500							

Doğruluk için gerçeklik (bias) çalışması, geri alma ile yapılmıştır. Geri alma için iki analist tarafından, iki ayrı örnekte, her biri 8 adet olmak üzere 0.6 ve 1.5 µg L<sup>-1</sup> derişimlerinde toplam 64 adet geri alma çalışması yapılmıştır. Eşitlik 3'e göre hesaplanan % Hata sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir.

$$\% \text{ Hata (Bias)} = [(X_D - X_T) / X_T] \times 100 \quad (3)$$

X<sub>D</sub>: Teorik değer, X<sub>T</sub>: Deneysel değer

Çizelge 4. Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ve TA için % Hata verileri

	0.6					1.5				
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	TA	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	TA
X <sub>T(ORT)</sub>	0.553	0.569	0.527	0.530	2.179	1.389	1.392	1.307	1.2605	5.349
X <sub>D</sub>	0.6	0.6	0.6	0.6	2.4	1.5	1.5	1.5	1.5	6.0
% Hata	8.530	5.464	13.805	13.132	10.126	7.96	7.744	14.790	19.003	12.175

Geri alma çalışmasında iki analist tarafından standart eklenmiş örnekler ile iki ayrı derişimde toplam 32 adet geri kazanım çalışması yapılmış ve sonuçların ortalaması (ORT) ile standart sapmaları (SD) Çizelge 5’da verilmiştir.

Çizelge 5. Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ve TA için geri alma verileri

	1.Analist									
	1.25					1.5				
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	TA	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	TA
ORT	93.354	93.245	94.294	82.754	90.912	103.696	103.125	104.963	96.796	102.145
SD	7.752	7.545	9.218	7.963	8.060	6.994	7.464	8.831	7.107	7.509
	2.Analist									
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	TA	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	TA
ORT	92.709	92.313	88.804	79.110	88.234	98.408	99.309	100.517	88.347	96.645
SD	3.193	2.175	3.324	1.572	2.344	9.613	9.333	8.918	6.404	8.547

Yöntemin ölçüm belirsizliğini saptamak amacıyla doğruluktan gelen belirsizlikler Eşitlik 4 ile geri almadan gelen belirsizlikler ise Eşitlik 5 ile hesaplanmıştır.

$$t = \frac{|1-\bar{R}|}{u(\bar{R})} \quad (4)$$

$\bar{R}$  : Geri alma oranlarının ortalaması

$u(\bar{R})$  : Geri alma oranlarının ortalamalarının standart sapması

$$u(Ra) = \sqrt{\left(\frac{1-\bar{R}}{k}\right)^2 + u(\bar{R})^2} \quad (5)$$

$u(Ra)$  : Geri almadan gelen artırılmış belirsizlik

$\bar{R}$  : Geri alma oranlarının ortalaması

$k$  : Genişletilmiş belirsizlik hesabında kullanılan kapsama faktörü

$u(\bar{R})$  : Geri alma oranlarının ortalamalarının standart sapması

Doğruluktan gelen belirsizliğin hesaplanmasında Çizelge 6’de verilen geri alma çalışmasına ait sonuçların ortalama ve standart sapma değerleri dikkate alınarak t değeri hesaplanmıştır. t değeri, aflatoksin B<sub>1</sub> için 4.820 ve toplam aflatoksin için 4.158 olarak bulunmuştur. Bulunan bu değerler, t’nin %95 güven aralığında, t- Dağılımı Tablosu’ndan bulunan kritik değeri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen t değerleri tablo değerinden (2.069) büyük olduğu için “1’den farkı önemlidir” yorumu yapılmıştır. Geri almadan gelen belirsizlikte artırılmış belirsizlik, u (Ra) değeri, Aflatoksin B<sub>1</sub> için 0.066, toplam aflatoksin için 0.054 olarak hesaplanmıştır. Kesinlikten gelen belirsizlik için tekrar üretilebilirlik çalışmalarından elde edilen birleşik RSD değerleri (Çizelge 3) referans alınmış ve bu değerler aflatoksin B<sub>1</sub> için 0.150, toplam aflatoksin için ise 0.145’tir. Belirsizlik sonuçları Çizelge 7’de verilmiştir.



Çizelge 6. Aflatoksin B<sub>1</sub> ve toplam aflatoksin için ölçüm belirsizliği için geri alma çalışması

Analiz No	Aflatoksin B <sub>1</sub>			Toplam Aflatoksin				
	Deneysel Değer*	Teorik Değer*	% Geri Alma	Geri Alma	Deneysel Değer*	Teorik Değer*	% Geri Alma	Geri Alma
1	0.989	1.00	98.873	0.989	4.160	4.00	104.006	1.040
2	0.904	1.00	90.356	0.904	3.693	4.00	92.315	0.923
3	0.959	1.00	95.859	0.959	3.954	4.00	98.838	0.988
4	0.742	1.00	74.228	0.742	3.198	4.00	79.936	0.799
5	0.950	1.00	94.983	0.950	3.947	4.00	98.685	0.987
6	0.923	1.00	92.289	0.923	3.840	4.00	96.001	0.960
7	0.710	1.00	71.005	0.710	3.050	4.00	76.249	0.763
8	0.878	1.00	87.793	0.878	3.642	4.00	91.059	0.911
9	0.849	1.00	84.931	0.849	3.554	4.00	88.844	0.888
10	0.930	1.00	92.951	0.930	3.841	4.00	96.035	0.960
11	0.938	1.00	93.835	0.938	3.807	4.00	95.172	0.952
12	0.858	1.00	85.770	0.858	3.418	4.00	85.447	0.855
13	0.687	1.00	68.657	0.687	2.977	4.00	74.414	0.744
14	1.048	1.00	104.759	1.048	4.079	4.00	101.964	1.020
15	0.892	1.00	89.179	0.892	3.519	4.00	87.973	0.880
16	0.779	1.00	77.939	0.779	3.108	4.00	77.687	0.777
ORT				<b>0.877</b>				<b>0.903</b>
SD				<b>0.102</b>				<b>0.093</b>

\*µg L<sup>-1</sup>Çizelge 7. Aflatoksin B<sub>1</sub> ve toplam aflatoksin için Belirsizlik sonuç tablosu

Belirsizlik Bileşenleri	Aflatoksin B <sub>1</sub>	Toplam Aflatoksin
Doğruluk	0.066	0.054
Kesinlik	0.150	0.145
Birleştirilmiş Belirsizlik	0.164	0.155
Genişletilmiş Belirsizlik (%95 güvenle, k=2)	0.327	0.309

Validasyon çalışmaları kapsamında geri alma ve tekrar üretilebilirlik relatif standart sapma oranlarının “Türk Gıda Kodeksi Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği”nin (Tebliğ No: 2018/10) “Aflatoksin İçin Performans Kriterleri”ne (Çizelge 8) uygun olduğu saptanmıştır.

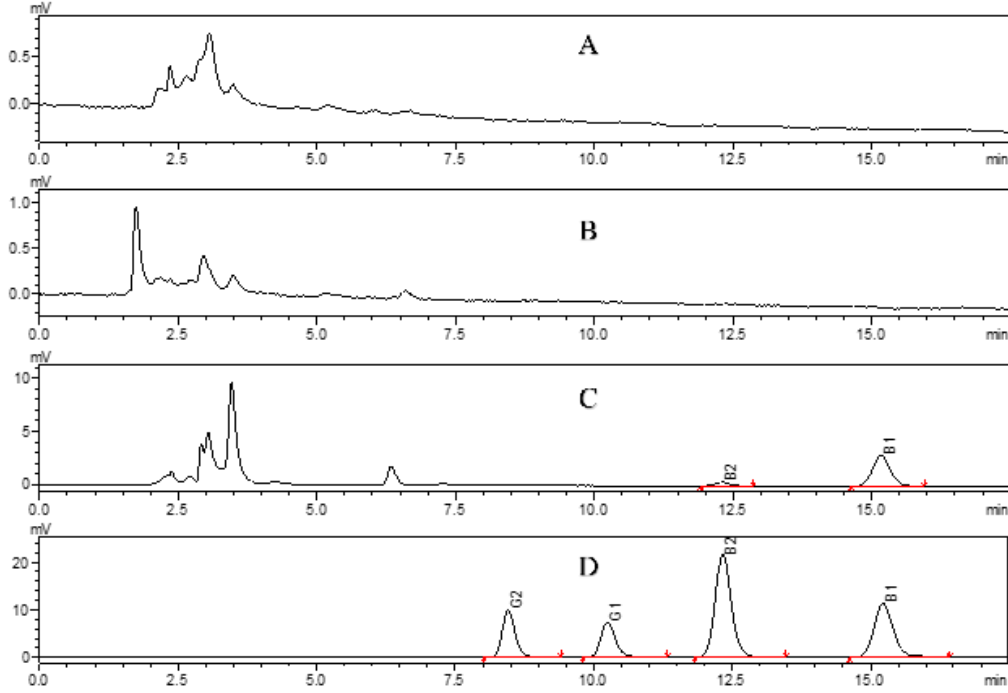
Çizelge 8. Aflatoksin için performans kriterleri

Kriter	Konsantrasyon Aralığı	Tavsiye edilen değer (%)
Kör	Hepsi	Önemsiz
Geri Alma	< 1.0	50 – 120
(Aflatoksin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> )	1 – 10	70 – 110
	> 10	80 – 110
Tekrar Üretilebilirlik RSD <sub>R</sub>	Hepsi	Horwitz eşitliğinden elde edilen değer

Mevcut çalışmada incelenen 5 kayısı çekirdeği örneğinden 1 tanesinde aflatoksin tespit edilirken diğer 4 tanesinde aflatoksin tespit edilememiştir. Aflatoksin tespit edilen örnekte Aflatoksin B<sub>1</sub>, 1.250 ± 0.081 µg kg<sup>-1</sup>, Toplam aflatoksin ise 1.401 ± 0.097 µg kg<sup>-1</sup> olarak ölçülmüştür. Çalışmanın diğer materyali olan 5 adet yer fıstığı örneğinde ise aflatoksin tespit edilememiştir. İncelenen kayısı çekirdeği içi, yer fıstığı örnekleri ile 2,5 µg L<sup>-1</sup>'lik aflatoksin standardına ait UFLC-FD kromatogramları Şekil 2’de verilmiştir.

Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği’ne (Anonim, 2011) göre kayısı çekirdeği’nin maksimum aflatoksin B<sub>1</sub> ve toplam aflatoksin limitleri 5 ve 10 µg kg<sup>-1</sup>, Avrupa Birliği Yönetmeliği’ne (Anonim, 2010) göre ise 8 ve 10 µg kg<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Tespit edilen aflatoksin miktarı maksimum limitlerin altında olduğundan incelenen kayısı çekirdeği örnekleri Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Yönetmeliklerine uygundur. Lutfullah ve Hussain (2011) Pakistan’da kabuklu yemişlerde yaptıkları bir survey çalışmasında kayısı çekirdeği örneklerinin 0.7-5.6 µg kg<sup>-1</sup> arasında toplam aflatoksin içerdiğini rapor etmişlerdir. Kayısı çekirdeği için meyveden ve kabuktan çıkarılmadan önce aflatoksin kontaminasyonu söz konusu değildir. Fakat meyveden çıkarılıp kurutma

işlemine tabi tutulduktan ve özellikle de kabuktan çıkarıldıktan sonra kurutma ortamı, muhafaza koşulları ve nem içeriği gibi faktörler kontaminasyonda önemli faktörlerdir.



Şekil 2. Standart ve örneklere ait kromatogramlar: Aflatoksin içermeyen yer fıstığı (A), Aflatoksin içermeyen kayısı çekirdeği içi (B), Aflatoksin içeren kayısı çekirdeği içi (C), 2.5 µg L<sup>-1</sup> aflatoksin (G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>) standardı (D)

Osmaniye ilinde yer fıstığı örneklerinde aflatoksin kontaminasyonunu inceleyen bir çalışmada (Lavkor ve Biçici, 2015), bez üzerinde kurutulan örneklerde aflatoksin tespit edilemezken, toprak zemin üzerinde kurutulan örneklerde ise 0.1-9.0 µg kg<sup>-1</sup> aralığında değişen miktarlarda aflatoksin tespit edilmiştir. Osmaniye ilinde yürütülen diğer bir çalışmada 3 yıl boyunca izlenen ham yer fıstığı örneklerinde 0.04-8.18 µg kg<sup>-1</sup> aralığında aflatoksin ölçülmüştür (Seyhan, 2015). Kenya’da yapılan bir survey çalışmasında incelenen yer fıstığı örneklerinde (678 adet) 0-7525 µg kg<sup>-1</sup> aralığında aflatoksin varlığı belirlenmiştir (Mutegi, 2009). Çin’de yapılan bir çalışmada yer fıstığı örneklerinde 0.01 ile 720 µg kg<sup>-1</sup> arasında değişen miktarlarda aflatoksin kontaminasyonu tespit edilmiştir (Ding ve ark., 2012).

## SONUÇ

Bu çalışmada kayısı çekirdeği ve yer fıstığında aflatoksin varlığını incelemek amacıyla uygulanan AOAC’nin 991.31 nolu metodu, başarılı bir şekilde valide edilmiştir. İncelenen her iki örnekten elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, kayısı çekirdeği ve yer fıstığı örneklerinin hem Türk Gıda Kodeksine hemde Avrupa Birliği’nin ilgili yönetmeliğine uygun olduğu görülmüştür. İncelenen örnekler insan sağlığı açısından risk oluşturmamakla birlikte her örnek için muhafaza süresi ve bu örneklerden üretilen işlenmiş ürünleri kapsayan geniş çaplı bir sörvey çalışmasının yapılması ve risk durumunun ortaya çıkarılması önerilmektedir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makale yazımı başlıca yazar (YU) tarafından gerçekleştirilmiştir. İkinci yazar (RY), 2. analist olarak analiz çalışmalarında görev almıştır.



**KAYNAKLAR**

- Açu M, Ocak, ÖÖ, 2019. Gıdalarda Aflatoksin Düzeylerin in Belirlenmesinde Kullanılan Analiz Yöntemleri. Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 4 (2): 168-181. doi.org/10.33484/sinopfd.537820
- Aluç M, Aluç S, 2003. Akçakoca Ordu ve Giresun ilçelerinde Yetiştirilen Fındıklarda Aflatoksin Düzeylerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Çalışma. I. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003, İstanbul.
- Anonim, 2010. Commission Regulation (EU) No. 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Official Journal of the European Union. L 50/8.
- Anonim, 2011. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete (3. Mükerrer).
- Bayraç C, Camızcı G, 2020. Hplc Metodu ile Patulin Tayininde Tek Laboratuvar Metot Validasyon Çalışması. Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 9 (1): 285-296.
- Bircan C, Barringer SA, Ulken Ü, Pehlivan R, 2008. Aflatoxin Levels in Dried Figs, Nuts and Paprika for Export From Turkey. International Journal of Food Science & Technology, 43 (8): 1492-1498.
- Bruce CC, Russell JM, Thomas FS, 2003. Current Research on Reducing Pre- and Post-harvest Aflatoxin Contamination of U.S. Almond, Pistachio, and Walnut. Journal of Toxicology: Toxin Reviews, 22 (2-3): 225-266. DOI: 10.1081/TXR-120024093
- Cüce M. 2019. Determination of Aflatoxin Contents of Sebinkarahisar Walnut Variety By Elisa Method. Gıda, 44 (4): 672-680. DOI: 10.15237/gida.GD19042
- Ding X, Li P, Bai Y, Zhou H, 2012. Aflatoxin B1 in post-harvest peanuts and dietary risk in China. Food Control, 23: 143-148.
- Gürses M, 2007. Mycoflora and Aflatoxin Content of Hazelnuts, Walnuts, Peanuts, Almonds and Roasted Chickpeas (leblebi) Sold in Turkey. International Journal of Food Properties, 9 (3): 395-399.
- Gürses M, Erdoğan A, 2004. Erzurum Piyasasında Satılan Yerfıstığı, Antepfıstığı ve Bademlerin Aflatoksin B1 Kontaminasyonu Bakımından İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fak Dergisi, 35 (1-2): 75-8.
- Hepsağ F, 2020. Buğday ve Çeltikte Okratoksin A'nın Kantitatif Olarak Tespiti ve Validasyon Çalışması. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi, 6 (2): 336-346. DOI: 10.24180/ijaws.688743
- Karapınar HS, 2013. Bazı Gıdaların Aflatoksin İçeriğinin HPLC Metodu ile Tayini, Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Lavkor İ, Biçici M, 2015. Osmaniye'de Yetiştirilen Yerfıstıklarında Hasat, Hasat Sonrası, Kurutma ve Depo Öncesi Dönemlerinde Aflatoksin Oluşumu. Journal of Agricultural Sciences, 21 (3): 394-405. DOI: 10.15832/ankutbd.25224
- Lutfullah G, Hussain A, 2011. Studies on Contamination Level of Aflatoxins in Some Dried Fruits and Nuts of Pakistan. Food Control, 22: 426-429.
- Mutegi CK, Ngugi HK, Hendriks SL, Jones RB, 2009. Prevalence and factors associated with aflatoxin contamination of peanuts from Western Kenya. International Journal of Food Microbiology, 130: 27-34.
- Okello DK, Kaaya AN, Bisikwa J, Were M, Oloka HK, 2010. Management of Aflatoxins in Groundnuts: A manual for Farmers, Processors, Traders and Consumers in Uganda. National Agricultural Research Organisation, Entebbe.
- Oruç HH, 2005. Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 24 (1-2-3-4): 105-110.
- Özçakmak S, Dervişoğlu M, 2007. Fındıkta Aflatoksin Oluşumuna Etkili Faktörler, Avrupa Birliğinin Limit Değerlerle İlgili Düzenlemeleri ve Türk Fındığı İhracatına Etkileri. Gıda, 32 (1): 33-40.
- Sedefoğlu C, 2013. Antep Fıstıklarında Okratoksin A ve Aflatoksin Varlığının İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Yüksek Lisans Tezi.
- Seyhan F, 2015. Osmaniye Yer Fıstığının Raf Ömrünün Belirlenmesi ve Kalitesinin İyileştirilmesine Yönelik Araştırmalar Projesi Sonuç Raporu. Tübitak MAM, Ankara.
- Simşek O, Arici M, Demir C, 2002. Mycoflora of Hazelnut (*Corylus avellana* L.) and Aflatoxin Content in Hazelnut Kernels Artificially Infected with *Aspergillus parasiticus*. Die Nahrung, 46 (3): 194-196.
- Uğur Y, Erdoğan S, 2021. The Effect of Hydrogen Peroxide Used in Desulfurization of Dried Apricot on the Antioxidant Capacity and Phenolic Compound Content of the Fruit. Journal of Food Measurement and Characterization, 15: 3708-3719. https://doi.org/10.1007/s11694-021-00942-6