

KIRMIZIBİBER VE SUMAK BAHARATLARINDA AFLATOKSİN TAYİNİ VE LABORATUVAR İÇİ METOT VALIDASYONU

Determination of Aflatoxin in Spices of Chilli and Sumac and in-Laboratory Method Validation

Yılmaz UĞUR¹ 

¹İnönü Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Malatya

Geliş Tarihi / Received: 29.04.2022

Kabul Tarihi / Accepted: 20.05.2022

ÖZ

Mevcut çalışmada kırmızıbiber ve sumak örneklerinde aflatoksin varlığı incelenmiş ve uygulanan metodun laboratuvar içi validasyonu gerçekleştirilmiştir. Baharat örnekleri Malatya ilinde baharat ticareti yapan firmalardan temin edilmiştir. Association of Official Analytical Chemists'nin (AOAC) 999.07 nolu metodu ile floresans dedektörlü ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC-FD) sisteminde analizler gerçekleştirilmiştir. Kırmızıbiber örneklerinde Aflatoxin B₁ 0.20 – 79.37 µg/kg ve toplam aflatoksin 0.22 – 93.05 µg/kg aralıklarında ölçülmüştür. Sumak örneklerinin üç tanesinde aflatoksin tespit edilmezken bir örnekte Aflatoxin B₁ 8.03 µg/kg ve toplam aflatoksin 8.68 µg/kg olarak ölçülmüştür. İncelenen baharat örneklerinin 15 tanesinin Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Tebliğine göre yasal limitleri aşan düzeyde aflatoksin içerdiği tespit edilmiştir. Analitik çalışmalar sonucunda aflatoksin standardının UFLC-FD sisteminde lineer ölçüm aralığı 1.25- 2.5 µg/kg, aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ için LOD değerleri sırasıyla 0.036, 0.030, 0.021 ve 0.024 µg/kg, LOQ değerleri ise 0.120, 0.100, 0.070, ve 0.080 µg/kg olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Aflatoxin, Kırmızıbiber, Metot validasyonu, Sumak, Ultra hızlı sıvı kromatografisi.

ABSTRACT

In the present study, the presence of aflatoxin in the chilli and sumac samples was investigated, and in-laboratory validation of the applied method was performed. Spice samples were provided from spice shops in Malatya province. Analyzes were carried out in the ultra-fast liquid chromatography (UFLC-FD) system with fluorescence detector using method no. 999.07 of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). In chilli samples, Aflatoxin B₁ and Total Aflatoxin ranged from 0.20 to 79.37 µg/kg and 0.22 to 93.05 µg/kg, respectively. In three sumac samples, aflatoxin wasn't detected, while Aflatoxin B₁ and Total Aflatoxin were measured as 8.03 and 8.68 µg/kg in one sumac sample, respectively. It was determined that 15 of the examined spice samples contain aflatoxin at a level exceeding the legal limits according to the Turkish Food Codex Communiqué on contaminants. As a result of the analytical studies, the linear measurement range of the aflatoxin standard in the UFLC-FD system was determined as 1.25 – 2.5 µg/kg, the LOD values for Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ were 0.036, 0.030, 0.021, and 0.024 µg/kg, and the LOQ values were 0.120, 0.100, 0.070, and 0.080 µg/kg, respectively.

Keywords: Aflatoxin, Chilli, Method validation, Sumac, Ultra-fast liquid chromatography.

GİRİŞ

Aflatoksinler genellikle *Aspergillus* cinsi içerisinde yer alan *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* türü küfler tarafından üretilen ve insan sağlığını tehdit eden toksik etkili bileşiklerdir. Tarımsal ürünlerde hasat, nakliye, depolama ve işleme süreçlerinde küf kontaminasyonu ya da uygun olmayan muhafaza koşullarına bağlı olarak aflatoksinler gelişebilmektedir. Aflatoksinler toksik, kanserojenik, mutajenik, teratojenik ve bağışıklık sistemini baskılayıcı etkileriyle karaciğer, bağırsak ve böbrek gibi organları hedef almakta, düşük miktarları bile hem insan hem de hayvan sağlığını etkilemektedirler (Açu ve Ocak, 2019; Hepsağ, 2020).

Aflatoksinler sağlık üzerindeki risklerinin yanı sıra ekonomik kayıplara da yol açmakta, aflatoksin içeren gıdaların iç pazarda tüketime sunulması ve dış pazarlara ihracatı mümkün olmamaktadır. Yasal limitlerin üzerinde aflatoksin içeren gıdalar doğrudan imha edilmektedir. Kontrol mekanizmalarının zayıf işlediği ülkelerde ise bu ürünler iç piyasada tüketime sunulurken insan sağlığı tehlikeye atılmaktadır (Karapınar, 2013). Birçok ülke, gıdalarda bulunabilecek mikotoksin düzeyleri için limitler belirlemiş ve bunu sıkı bir şekilde kontrol etmektedirler. Bu bağlamda ülkemizde tüketime sunulan kırmızıbiber, karabiber, zencefil ve zerdeçal gibi baharatlarda maksimum düzeyde bulunabilecek aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin miktarı sırasıyla 5 ve 10 µg/kg olarak belirlenmiştir (Türk Gıda Kodeksi ..., 2011).

Baharatlar genellikle lezzeti arttırıcı, iştah acıcı ve görünümü iyileştirici olarak yiyeceklerde kullanılmaktadır (Coşkun, 2010). Kırmızıbiber, başta Güneydoğu Anadolu Bölgesi olmak üzere Türkiye'nin tüm bölgelerinde yaygın olarak tüketilen ekonomik öneme sahip bir üründür. Tam olgunlaşmış *Capsicum annum* türü biberlerin kurutulup öğütülmesiyle elde edilir. Farklı işleme tekniklerine bağlı olarak "pul biber", "isot" ve "toz biber" adlarıyla tüketime sunulmaktadır (Demircioğlu ve Filazi, 2010). Sumak ise *Rhus coriaria* bitkisine ait meyvelerin kurutulması, öğütülmesi ve belli oranda yemeklik tuzun karıştırılmasıyla elde edilen ekşi tada sahip bir bahattır. Türkiye'de Güney Anadolu'da sumak ekşisi ve baharat olarak yaygın bir şekilde tüketilmekle birlikte diğer bölgelerde daha çok baharat olarak tüketilmektedir (Ünver ve Özcan, 2006).

Baharat olarak değerlendirilen bitkisel ürünlerin kurutulması aşamasında yeterli hijyenin sağlanmadığı durumlarda aflatoksin kontaminasyonu kaçınılmazdır. Üretim şartları, uzun kurutma süreleri, sıcak ve nemli koşullar başta aflatoksin oluşumu olmak üzere kalite problemlerine yol açmaktadır. Ürünün depolama sürecinde muhafaza koşullarının elverişsiz

olması durumunda da aflatoksin oluşumu söz konusudur (Özakça, 2014). Bu durum baharatlarda gıda güvenliği açısından önemli riskler oluşturmaktadır.

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).

En yaygın bilinen aflatoksin türleri B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂'dir. Gıdalarda en sık bulunan ve sağlık açısından en riskli olanı aflatoksin B₁'dir. Gıda örneklerinde aflatoksin analizi sonuçları çoğunlukla Aflatoksin B₁ 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).

Bu çalışmada pul biber, isot, toz biber ve sumak baharatlarında Aflatoksin B₁ ile Toplam Aflatoksin (B₁+B₂+G₁+G₂)'in kantitatif tayini için UFLC-FD sistemi kullanılarak AOAC'nin 999.07 nolu metodunun laboratuvar içi validasyon çalışması yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın materyali 4 farklı firmaya ait pulbiber, isot, toz biber ve sumak örneklerinden oluşmuştur. Numuneler Malatya ilinde baharat ticareti yapan iş yerlerinden temin edilmiştir. Analizler yapılana kadar örnekler 4°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada aflatoksin standardı (Aflatoxin mix 4 solution, Supelco, Sigma Aldrich, USA), asetonitril (Merck, Almanya), metanol (Merck, Almanya), KBr (Merck, Almanya), NaCl, HNO₃, ultra saf su (Millipore Direct-Q 3 UV-R, Fransa) ve PBS (phosphate-buffered saline) (Sigma Aldrich) reaktif ve kimyasalları kullanılmıştır.

Numunenin Hazırlanması

50 g homojenize edilmiş örnek üzerine 5 g NaCl ve 300 mL metanol:su (8:2, v/v) ilave edilerek 30 dakika süreyle yüksek hızda karıştırılmıştır. Süzme işlemi yapılarak süzüntüden alınan 10 mL karışım, 60 mL PBS çözeltisi ile seyreltilmiştir. Ekstraktın ön deriştirme ve temizlik işlemleri için IAK (Aflatest, Vicam) kolondan seyreltilmiş süzüntü 3 mL/dak hızla geçirilmiştir. Yıkamayı takiben 1.25 mL metanol ile aflatoksinler elüe edilerek vialle alınmış ve üzerine 1.75 mL ultra saf su ilave edilmiştir. 100 µL'si 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, USA) 5µm gözenek çaplı kolonda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, su: metanol:asetonitril (6:3:2, v/v/v) karışımına 119 mg KBr/L ve 100 µL HNO₃/L eklenerek hazırlanmıştır. Aflatoksin türevlendirme işlemi için kolon ve dedektör arasına 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 ve enjeksiyon hacmi 100 µL olarak ayarlanmıştır.

Metot Validasyonu

Bu kapsamda tayin limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ) ve lineer ölçüm aralığı belirlenmiştir. Ayrıca aflatoksin içermeyen pul biberi örneğine son derişimi 0.6 µg/L olacak şekilde standart ekleme yapılarak kesinlik parametrelerinden tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik, doğruluk parametrelerinden de %hata ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

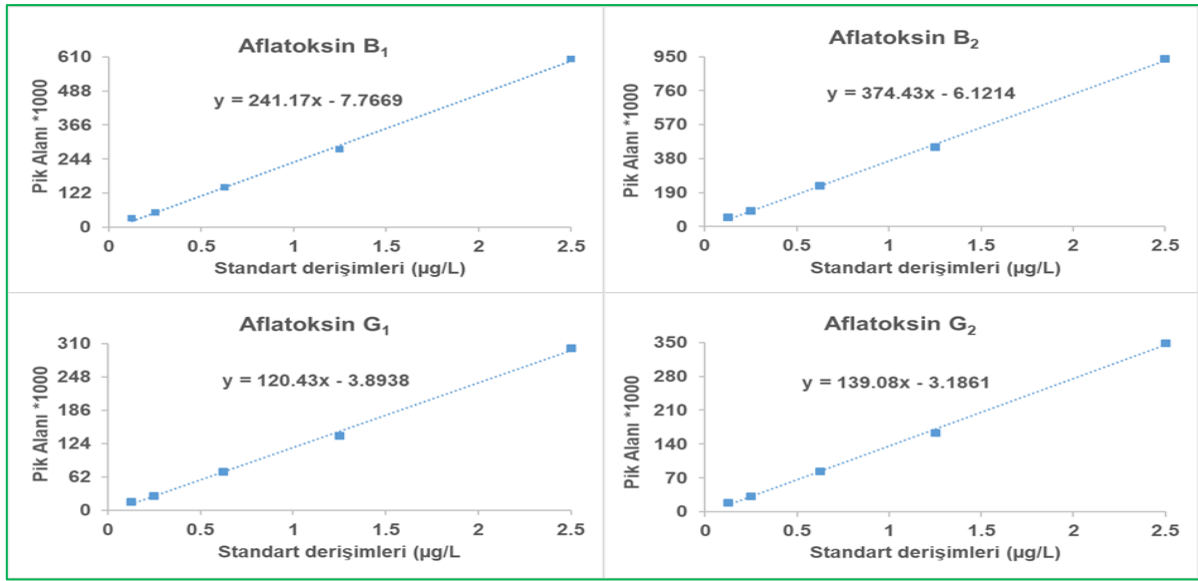
BULGULAR VE TARTIŞMA

Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) çalışması için cihazda okunabilen en düşük konsantrasyonların en az 3 katı konsantrasyonda (0.1 µg/L) çalışma standardı hazırlanarak 8 kez UFLC cihazına enjekte edilmiştir. $LOD=3 \times \text{standart sapma (ss)}$ ve $LOQ=10 \times \text{ss}$ formüllerine göre hesaplamalar yapılarak sonuçlar Tablo 1'de sunulmuştur. Lineer ölçüm aralığını belirlemek için 0.125-2.5 µg/L derişim aralığında 5 farklı konsantrasyonda standartlar hazırlanarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 1). Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ için oluşturulan kalibrasyon eğrilerinde korelasyon katsayısı (R²) değerleri sırasıyla 0.9983, 0.9990, 0.9981 ve 0.9986 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.

Tablo 1. Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ için Bazı Analitik Karakteristikler

Aflatoksin	Alıkonma Zamanı (dk)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Lineer Ölçüm Aralığı (µg/L)	R ²
B ₁	8.443	0.036	0.120	0.125-2.5	0.9983
B ₂	10.233	0.030	0.100	0.125-2.5	0.9990
G ₁	12.320	0.021	0.070	0.125-2.5	0.9981
G ₂	14.718	0.024	0.080	0.125-2.5	0.9986



Şekil 1. Aflatoksin (B₁, B₂, G₁, G₂) 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 ≤ 0.20 olması beklenir. Mevcut çalışmada kesinlik parametrelerinden tekrarlanabilirlik için 0.6 µg/L derişiminde 8 adet geri alma çalışması yapılmış ve sonuçlar [ortalama (ORT), SD ve RSD] Tablo 2'de verilmiştir. Tekrarlanabilirlik limiti (r) ise, Eşitlik 1'den yararlanılarak hesaplanmıştır (Tablo 2).

$$r = 2.8 \times SD \quad (1)$$

Tablo 2. Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ ve TA* için Tekrarlanabilirlik Verileri

	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	TA*
ORT	0.523	0.539	0.546	0.559	2.168
SD	0.011	0.015	0.024	0.011	0.040
RSD	0.022	0.029	0.0445	0.020	0.019
Horwitz	49.350	49.120	49.030	48.860	39.870
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	0.032	0.043	0.068	0.032	0.113

* Toplam aflatoksin = B₁+B₂+G₁+G₂

Tekrar üretilebilirlik çalışmasında 0.6 µg/L derişiminde 8 adet geri alma çalışması yapılmış ve sonuçlar (ORT, SD, RSD, SD_{birleşik} ve RSD_{birleşik}) Tablo 3'te verilmiştir. Tekrar üretilebilirlik limiti (R), Eşitlik 2'ye göre her bir aflatoksin için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Tablo 3).

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında yapılan ölçümlerden hesaplanan RSD değerleri kabul edilebilir en yüksek limit olan 0.20 değerinden küçüktür (Tablo 2, 3).

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

Tablo 3. Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ ve TA İçin Tekrar Üretilebilirlik Verileri

	B ₁		B ₂		G ₁		G ₂		TA	
	1.Gün	2.Gün	1.Gün	2.Gün	1.Gün	2.Gün	1.Gün	2.Gün	1.Gün	2.Gün
ORT	0.493	0.499	0.511	0.520	0.512	0.521	0.553	0.547	2.070	2.088
SD	0.014	0.021	0.020	0.028	0.017	0.040	0.015	0.027	0.061	0.113
RSD	0.029	0.042	0.039	0.054	0.034	0.076	0.028	0.049	0.029	0.054
Horwitz	49.79	49.70	49.52	49.39	49.50	49.37	48.94	49.01	40.15	40.09
SD _{birleşik}	0.018		0.024		0.031		0.022		0.091	
RSD _{birleşik}	0.036		0.047		0.059		0.040		0.043	
Tekrar üretilebilirlik limiti	0.050		0.067		0.087		0.062		0.255	

Doğruluk için gerçeklik (bias) çalışması, geri alma ile yapılmıştır. Geri alma için 0.6 µg/L derişiminde 8 adet geri alma çalışması yapılmıştır. Eşitlik 3'e göre hesaplanan %Hata sonuçları Tablo 4'te verilmiştir.

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

X_D: Teorik değer, X_T: Deneysel değer

Tablo 4. Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ ve TA için %Hata Verileri

	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	TA
X _{T(ORT)}	0.512	0.531	0.520	0.551	2.114
X _D	0.6	0.6	0.6	0.6	2.4
%Hata	17.102	13.088	15.426	8.930	13.552

Geri alma çalışmasında 1 µg/L standart eklenmiş örnekler ile 8 adet geri kazanım çalışması yapılmış ve sonuçların ortalaması (ORT) ile standart sapmaları (SD) Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ ve TA için Geri Alma Verileri

	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	TA
ORT	83.400	86.213	88.350	90.175	87.063
SD	4.547	4.261	5.349	5.224	4.770

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 Tablo 6’da verilen geri alma çalışmasına ait sonuçların ortalama ve standart sapma değerleri dikkate alınarak t değeri hesaplanmıştır. t değeri, aflatoksin B₁ için 12.99 ve Toplam aflatoksin için 9.31 olarak bulunmuştur. Bulunan bu değerler, t’nin %95 güven aralığında, t- Dağılımı tablosunda 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 B₁ için 0.083, Toplam aflatoksin için 0.069 olarak hesaplanmıştır. Kesinlikten gelen belirsizlik için tekrar üretilebilirlik çalışmalarından elde edilen birleşik RSD değerleri (Tablo 3) referans alınmış ve bu değerler aflatoksin B₁ için 0.036, Toplam aflatoksin için ise 0.043’tür. Belirsizlik sonuçları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 6. Aflatoksin B₁ ve Toplam Aflatoksin için Ölçüm Belirsizliği için Geri Alma Çalışması

Analiz No	Aflatoksin B ₁			Toplam Aflatoksin				
	Deneysel Değer*	Teorik Değer*	%Geri Alma	Geri Alma	Deneysel Değer*	Teorik Değer*	%Geri Alma	Geri Alma
1	0.785	1.00	78.5	0.785	3.266	4.00	81.7	0.817
2	0.803	1.00	80.3	0.803	3.346	4.00	83.7	0.837
3	0.883	1.00	88.3	0.883	3.684	4.00	92.1	0.921
4	0.817	1.00	81.7	0.817	3.383	4.00	84.6	0.846
5	0.87	1.00	87	0.87	3.648	4.00	91.2	0.912
6	0.823	1.00	82.3	0.823	3.318	4.00	83.0	0.83
7	0.823	1.00	82.3	0.823	3.421	4.00	85.5	0.855
8	0.872	1.00	87.2	0.872	3.606	4.00	90.2	0.902
ORT				0.835				0.865
SD				0.036				0.041

*µg/L

Tablo 7. Aflatoksin B₁ ve Toplam Aflatoksin için Belirsizlik Sonuç Tablosu

Belirsizlik Bileşenleri	Aflatoksin B ₁	Toplam Aflatoksin
Doğruluk	0.083	0.069
Keskinlik	0.036	0.043
Birleştirilmiş Belirsizlik	0.090	0.081
Genişletilmiş Belirsizlik (%95 güvenle, k=2)	0.181	0.163

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

Tablo 8. Aflatoksin için Performans Kriterleri

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

Mevcut çalışmada incelenen 16 pul biber örneğinin 1 tanesi hariç diğerlerinde Aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin tespit edilmiştir.

Örneklerin Aflatoksin B₁ içerikleri 1.23 – 79.37 µg/kg arasında değişirken Toplam aflatoksin içeriklerinin ise 3.02 – 93.05 µg/kg arasında değiştiği gözlenmiştir. 4 toz biber örneğinde 1 örnek aflatoksin içermezken diğerlerinin 20.04 – 29.92 µg/kg arasında Aflatoksin B₁, 22.21 – 33.24 µg/kg arasında Toplam aflatoksin içerdiği belirlenmiştir. İstot örneklerinin tamamında aflatoksin tespit edilirken, örneklerde Aflatoksin B₁'in 0.20-3.74 µg/kg aralığında, Toplam aflatoksinin ise 0.22 – 15.73 µg/kg aralığında değiştiği tespit edilmiştir.

İncelenen sumak örneklerinin sadece 1 tanesinde aflatoksin tespit edilmiş ve Aflatoksin B₁'in 8.03 µg/kg, Toplam aflatoksinin ise 8.68 µg/kg olduğu gözlenmiştir. İncelenen örneklerin aflatoksin sonuçları Tablo 9'da, standart ve bazı örneklere ait UFLC-FD kromatogramları Şekil 2'de verilmiştir.

Tablo 9. Örneklere Ait Aflatoksin Sonuçları (µg/kg)

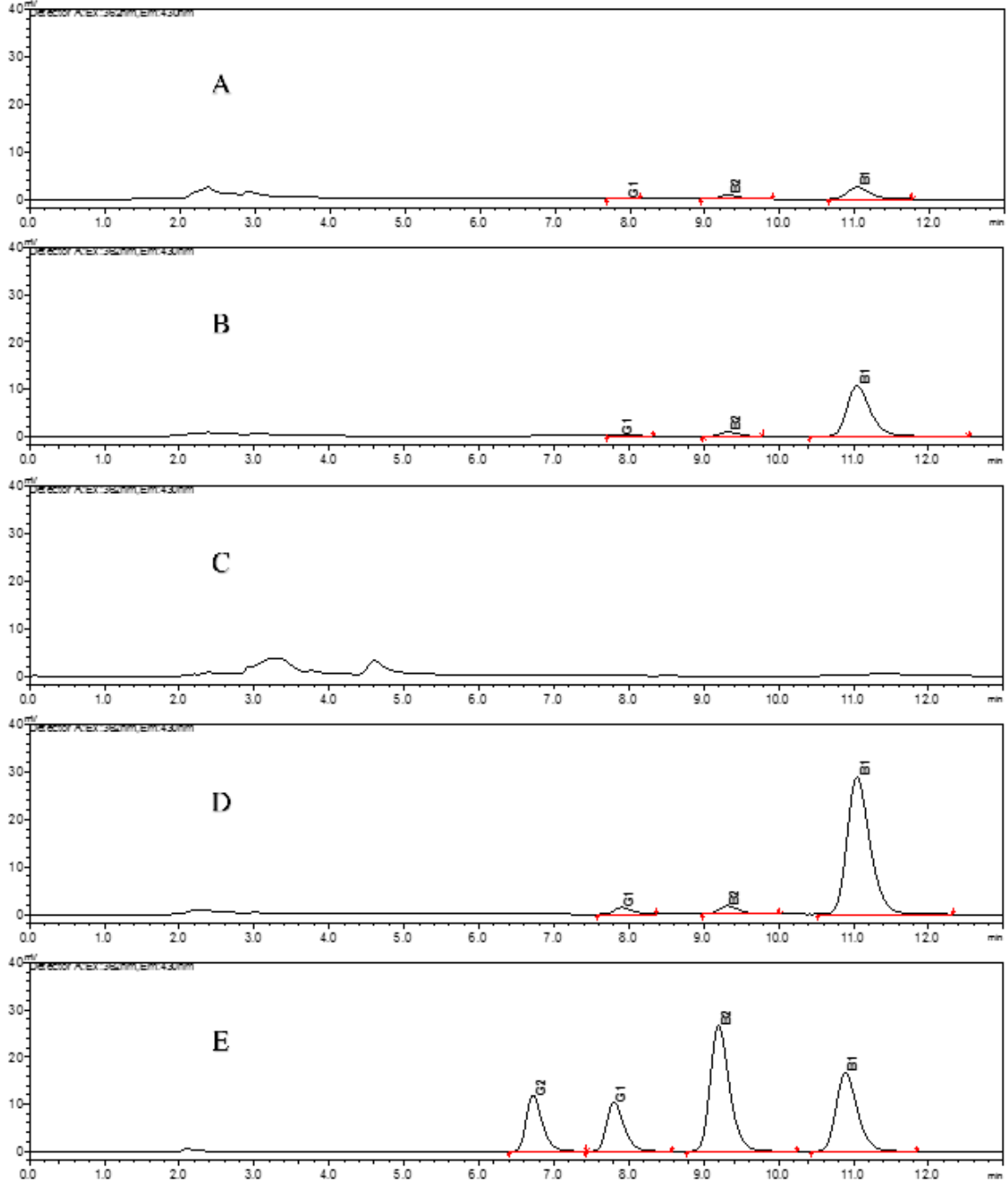
Örnek No	B ₁	B ₂	Pul Biber		TA*
			G ₁	G ₂	
1	74.35	2.58	0.08	0.17	77.17
2	7.77	0.36	0.48	< LOQ	8.61
3	13.54	0.64	0.16	2.03	16.36
4	5.72	0.23	0.24	< LOQ	6.18
5	38.91	2.36	0.88	0.64	42.79
6	20.28	1.23	1.37	< LOQ	22.88
7	1.79	0.74	1.28	< LOQ	3.80
8	1.40	0.83	0.99	< LOQ	3.21

9	1.25	0.85	1.23	< LOQ	3.33
10	18.96	0.49	0.34	< LOQ	19.79
11	9.80	2.01	0.10	0.50	12.41
12	79.37	3.94	8.85	0.89	93.05
13	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
14	28.99	2.47	0.37	0.40	32.23
15	17.78	1.39	0.86	0.29	20.31
16	1.23	0.83	0.96	< LOQ	3.02
Toz Biber					
1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
2	29.92	2.64	0.28	0.40	33.24
3	20.04	0.70	1.47	< LOQ	22.21
4	25.18	2.29	0.70	0.15	28.31
İsot					
1	1.17	0.34	0.04	< LOQ	1.55
2	3.74	0.50	4.54	6.95	15.73
3	1.67	0.31	0.01	< LOQ	2.00
4	0.20	0.03	< LOQ	< LOQ	0.22
Sumak					
1	8.03	0.61	0.04	< LOQ	8.68
2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

*Toplam Aflatoksin = B₁+B₂+G₁+G₂

Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar (2011) ve Avrupa Birliği Komisyon Yönetmelikleri'ne (2010) göre baharat türlerinden kırmızıbiberin kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri için maksimum Aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin limitleri 5 ve 10 µg/kg olarak belirlenmiştir.

İncelenen 11 pul biberi, 3 toz biber, 1 isot ve 1 sumak örneğinin Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Komisyon Yönetmelikleri'nin maksimum limitlerin üzerinde aflatoksin içerdiği ve bu örneklerin yönetmeliğe uygun olmadığı belirlenmiştir. 5 pul biberi, 1 toz biber, 3 isot ve 3 sumak örneğinin ya aflatoksin içermediği ya da maksimum limitlerin altında aflatoksin içerdiği ve bu örneklerin Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Komisyon Yönetmelikleri'ne uygun olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2. Standart ve Örneklere Ait Kromatogramlar: İtot (A), Pul biber (B), Sumak (C), Toz biber (D) ve 1.25 µg/L Aflatoksin (G₂, G₁, B₂, B₁) Standardı (E)

Tokat ilinde yürütülen bir çalışmada (Coşkun ve Ünsal, 2020) 4 pul biber ve 4 isot örneğinde Aflatoksin B₁ içeriği sırasıyla 0 – 8.11 µg/kg ve 0 – 9.42 µg/kg, Toplam aflatoksin ise sırasıyla 0- 10.98 µg/kg ve 0 – 12.42 µg/kg aralığında ölçülmüştür. Adana ve Osmaniye illerinde 182 kırmızıbiber örneğinin aflatoksin varlığı açısından incelendiği diğer bir çalışmada 150 örnekte aflatoksin varlığı tespit edilmiş, 50 örneğin Aflatoksin B₁ ve 35 örneğin toplam aflatoksin bakımından yasal limitleri aştığı ifade edilmiştir (Golge, Hepsağ ve Kabak, 2013). Demircioğlu ve Filazi (2010), Türkiye'nin farklı şehirlerinden temin ettikleri

49 kırmızıbiber örneğinin 11 tanesinde Türk Gıda Kodeksi'nin belirlediği yasal limitlerin üzerinde Aflatoksin B₁ (9- 80 µg/kg) bulunduğunu, diğer örneklerin ise yasal limitlerin altında aflatoksin B₁ (3.5-4.5 µg/kg) içerdiğini tespit etmişlerdir. Atasoy, Hayoğlu, Korkmaz, Kara ve Yıldırım (2017) 20 adet ev yapımı isot örneklerinde aflatoksin varlığını incelemiş ve örneklerden 2 tanesinin yasal limitlerin üzerinde aflatoksin içerdiklerini belirlemişlerdir. Farklı tarihlerde yürütülen çalışmalarda 75 kırmızıbiber örneğinden 11 (Ardic, Karakaya, Atasever ve Durmaz, 2008), 40 örnekten 23 (Ağaoğlu, 1999) ve 70 örnekten 13 tanesinin (Shundo vd., 2009) Aflatoksin B₁ yönüyle, 13 örnekten 8 (Paeterson, 2007) ve 30 örnekten 19 (Bircan, 2005) tanesinin toplam aflatoksin yönüyle, Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği limitlerini aştığı belirtilmiştir. Kayseri ilinde 50 kırmızıbiber örneğinin araştırıldığı bir çalışmada bütün örneklerde aflatoksin B₁ varlığı tespit edilmiş ve sonuçların 1.48 – 70.05 µg/kg aralığında değiştiği rapor edilmiştir. Çalışmada sadece 3 örneğin yasal limitlerin üzerinde Aflatoksin B₁ içerdiği belirtilmiştir (Kanbur, Liman, Eraslan ve Altınordulu, 2006). Kırmızı toz biberlerde aflatoksinin araştırıldığı diğer bir çalışmada 30 örnekten 13 tanesinin aflatoksin B₁'i 5 – 25 µg/kg düzeylerinde içerdiği vurgulanmıştır (Dokuzlu, 2001). Literatür verilerinden görüldüğü gibi aflatoksinle kontaminasyon oranları bölgelere göre farklılık arz etmektedir. İklimsel farklılıklar (nem ve sıcaklık), hasat, kurutma, ambalajlama ve muhafaza yöntemleri bu farklılıkların oluşmasında etken faktörler olabilmektedir. Kırmızıbiber, yetiştirilme aşamasından kurutma, öğütme ve depolama aşamalarına kadar aflatoksinle kontamine olabilmektedir. Özellikle açık alanda yapılan kurutma sürecinin uzun olması, aflatoksin kontaminasyon riskini arttırmaktadır. Nemli ve sıcak bölgelerde bu risk daha da artmaktadır.

İran'da bazı baharat türlerinde aflatoksin varlığının araştırıldığı bir çalışmada, 20 sumak örneğinden 19 örneğin aflatoksin içerdiği, toplam aflatoksin içeriklerinin 0.6 – 20.6 µg/kg aralığında değiştiği bildirilmiştir (Zareshahrabadi vd., 2021). Farklı ülkelerden alınan baharat örneklerinde yürütülen diğer bir çalışmada, Türkiye'den alınan bir sumak örneğinde aflatoksin B₁'in tespit limitinin altında olduğu rapor edilmiştir (Koutsias, Kollia, Makri, Markaki ve Proestos, 2021). Qasim ve Al-Maayaly (2020), Irak ve Türkiye'de inceledikleri 4 sumak örneğinin birinde 93.49 mg/kg düzeyinde Aflatoksin G₂, diğer bir örnekte ise 1.35 mg/kg düzeyinde Aflatoksin G₁ bulunduğunu tespit etmişlerdir. Diğer örneklerde ise aflatoksin bulunmadığı belirtilmiştir. Bu verilerden görüleceği üzere sumak örneklerindeki aflatoksin kontaminasyonu kırmızıbiber örneklerinde olduğu gibi bölgelere bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Fungusların gelişiminde çevresel faktörler etkili olabildiği gibi ürünün işleme teknikleri de baharatlarda aflatoksin oluşumunda etkili olabilmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada kırmızıbiber ve sumak baharatlarında aflatoksin varlığını incelemek amacıyla uygulanan AOAC'nin 999.07 nolu metodu, başarılı bir şekilde geçerli kılınmıştır. İncelenen pul biber örneklerin %68.75'inin Aflatoksin B₁, %56.25'inin ise Toplam aflatoksin yönüyle yasal limitleri aştığı gözlenmiştir. Toz biber örneklerinin %75'inin hem Aflatoksin B₁ hem de toplam aflatoksin, isot örneklerinin ise %25'inin toplam aflatoksin ve sumak örneklerinin de %25'inin aflatoksin B₁ yönüyle yasal limitleri aştığı tespit edilmiştir. Risk açısından toz biberlerin pul biberlerden daha büyük bir risk taşıdığı görülmektedir. İnsan sağlığının riske atılmaması ve ekonomik kayıpların önlenmesi için bütün tarımsal ürünlerde hasat döneminden ürünün pazara sunulması aşamasına kadar her aşamada gerekli tedbirlerin alınması elzemdir. Hasat döneminde hastalıklı, hasarlı ürünlerin ayıklanması, mekanik kurutma tekniklerinin kullanılması ve uygun muhafaza koşullarının sağlanması bu risklerin azaltılmasında katkı sağlayacaktır. Ayrıca mevcut riskin ortaya çıkarılması ve gıda güvenliği açısından yasal kontrol mekanizmalarının rutin izleme yapması büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Açu, M. ve Ocak, Ö. Ö. (2019). Gıdalarda aflatoksin düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan analiz yöntemleri. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4(2), 168-181. doi.org/10.33484/sinopfd.537820
- Ağaoğlu, S. (1999). Van ilinde açıkta satılan kırmızı pul biberlerde aflatoksin B₁ varlığının araştırılması. *Van Tıp Dergisi*, 6(4), 28-30.
- Ardic, M., Karakaya, Y., Atasever, M. ve Durmaz, H. (2008). Determination of aflatoxin B₁ levels in deepred ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with ELISA. *Food Chem Toxicol*, 46, 1596-1599.
- Atasoy, A. F., Hayoğlu, İ., Korkmaz, A., Kara, E. ve Yıldırım, A. (2017). Geleneksel ev isot baharatının aflatoksin içeriğinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21 (1), 35-40.
- Avrupa Birliği Komisyon Yönetmeliği (2010, Şubat 26). 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.
- Bayraç, C. ve 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. (2005). The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. *Int J Food Sci Technol*, 40, 929-934.
- Coşkun, A. L. ve Ünsal, F. (2020). Ticari olarak satışı yapılan baharatlar ve kuru meyvelerin bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 9(3), 99-111.
- Coşkun, F. (2010). Gıdalarda kullanılan bazı baharat ve baharat özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi. *Akademik Gıda*, 8(4), 41-46.

- Demircioğlu, S. ve Filazi, A. (2010). Türkiye’de üretilen kırmızıbiberlerde aflatoksin kalıntılarının araştırılması. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 81(2), 63-66.
- Dokuzlu, C. (2001). Kırmızı toz biberlerde aflatoksin. *J. Fac. Vet. Med*, 20, 19-23.
- Golge, O., Hepsağ, F. ve Kabak, B. (2013). Incidence and level of aflatoxin contamination in chilli commercialised in Turkey. *Food Control*, 33(2), 514-520.
- 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
- Kanbur, M., Liman, B. C., Eraslan, G. ve Altınordulu, Ş. (2006). Kayseri’de tüketime sunulan kırmızı biberlerde aflatoksin B₁’in enzim immunoassay (EIA) ile kantitatif analizi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 3(1), 21-24.
- Karapınar, H. S. (2013). *Bazı gıdaların aflatoksin içeriğinin Hplc metodu ile tayini*. (Yayınlanmamış yüksek lisans tezi). Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi, Konya.
- Koutsias, I., Kollia, E., Makri, K., Markaki, P. ve Proestos, C. (2021). Occurrence and risk assessment of Aflatoxin B₁ in spices marketed in Greece, *Analytical Letters*, 54(12), 1995-2008.
- Oruç, H. H. (2005). Mikotoksinler ve tanı yöntemleri. *J Res Vet Med*, 24(1-2-3-4), 105-110.
- Özakça, S. (2014). *Kırmızı pul biberlerde aflatoksin ve okratoksin A varlığının incelenmesi*. (Yayınlanmamış yüksek lisans tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Paeterson, M. R. R. (2007). Aflatoxin contamination in Chilli samples from Pakistan. *Food Control*, 18, 817-820.
- Qasim, A. S. ve Al-Maayaly, I. K. (2020). Detection of the contamination of aflatoxin by using hplc and several concentrations of heavy metals by using atomic absorption spectrophotometers (AAS) in both bared and packed spices (Iraq and Turkey). *Plant Archives*, 20(1), 443-448.
- Shundo, L., Almeida, P. D., Alaburda, J., Lamardo, L. C. A., Navas, S. A., Ruvieri, V. ve Sabino, M. (2009). Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. *Food Control*, 20, 1099-1102.
- Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. (2011). *T.C. Resmi Gazete* (28157, 29 Aralık 2011, 3. Mükerrer).
- Ünver, A. ve Özcan, M. M. (2006). Türkiye’de yabani olarak yetişen bazı sumak (*Rhus coriaria* L.) meyvelerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(40), 111-116.
- Zareshahrabadi, Z., Karimirad, M., Pakshir, K., Bahmyari, R., Motamedi, M., Nouraei, H. ve Zomorodian, K. (2021). Survey of aflatoxins and ochratoxin A contamination in spices by HPLC-based method in Shiraz, Southern of Iran. *Environ Sci Pollut Res*, 28(30), 40992–40999.