

TEKİRDAĞ'DA SATIŞA SUNULAN İHLAMUR (*TILIA SPP.*) VE KUŞBURNU (*ROSA CANINA*) ÖRNEKLERİNDE AFLATOKSİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Nuray Can, Serap Duraklı Velioglu*

Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ

Geliş / Received: 02.09.2016; Kabul / Accepted: 17.12.2016; Online baskı / Published online: 02.03.2017

Can, N., Duraklı Velioglu, S. (2017). Tekirdağ'da satışa sunulan ıhlamur (*Tilia spp.*) ve kuşburnu (*Rosa canina*) örneklerinde aflatoksin varlığının araştırılması. *GIDA* (2017) 42 (3): 287-296 doi: 10.15237/gida.GD16087

Öz

Bu çalışmada, Tekirdağ ili ve ilçelerindeki farklı satış noktalarından temin edilen 15 adet ıhlamur ve 15 adet kuşburnu örneğinde, aflatoksin B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) ve G₂ (AFG₂) varlığı HPLC yöntemi ile araştırılmıştır. Ayrıca, örneklerde nem, su aktivitesi (a_w) tayini, toplam mezofilik aerobik bakteri ve toplam maya küf sayısı da yapılmıştır. Aflatoksin analizi sonucunda, ıhlamur örneklerinden birinde 0.158 µg/kg AFG₁ ve 0.168 µg/kg AFG₂, bir diğerinde ise 0.162 µg/kg AFG₂ bulunmuş, örneklerdeki aflatoksin miktarlarının yasal limitlerin altında olduğu belirlenmiştir. Diğer ıhlamur ve kuşburnu örneklerinde ise, düzeyi tayin limitinin (AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ için sırasıyla 0.155, 0.168, 0.156, 0.162 µg/kg) altında olmakla birlikte, incelenen aflatoksinlerden en az biri tespit edilmiştir. Bu çalışmada incelenen örneklerde düşük düzeyde de olsa aflatoksinlerin tespit edilmesi, özellikle hassas tüketici grupları tarafından bitki çayı olarak tüketilebilen ıhlamur ve kuşburnu gibi ürünlerde aflatoksinlerin bulunabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Aflatoksinler, ıhlamur, kuşburnu, mikotoksin

DETERMINATION OF AFLATOXINS IN LINDEN (*TILIA SPP.*) and ROSEHIP (*ROSA CANINA*) SAMPLES SOLD IN TEKİRDAĞ PROVINCE

Abstract

Aflatoxin B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) and G₂ (AFG₂) contents of 15 linden and 15 rosehip provided from supermarkets, herbalists and bazaars in Tekirdağ province were investigated using HPLC method. Samples were also assayed for moisture, water activity (a_w), total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) and total yeast and mould counts. One of the linden samples was determined to contain AFG₁ and AFG₂ at levels of 0.158 µg/kg and 0.168 µg/kg, respectively. AFG₂ content of another linden sample was determined to be 0.162 µg/kg. Aflatoxin levels of these samples were lower than the maximum permissible levels. The rest of the samples were determined to be contaminated with at least one of the four aflatoxins with levels below LOQ (0.155; 0.168; 0.156; 0.162 µg/kg for AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, respectively). The existence of aflatoxins in the samples even in low levels shows that plant materials such as linden and rosehip consumed as herbal tea by sensitive consumer groups may contain aflatoxins.

Keywords: Aflatoxins, linden, rosehip, mycotoxin

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ svelioglu@nku.edu.tr, ☎ (+90) 282 250 2166,

☎ (+90) 282 250 9954

GİRİŞ

Çay bitkisi (*Camellia sinensis*) dışındaki herhangi bir tıbbi veya aromatik bitkiden hazırlanan çaylar olarak tanımlanabilen bitki çayları, günümüzde sağlık üzerine faydalı etkileri sebebiyle kullanılmalarının yanı sıra, siyah çaya alternatif bir sıcak içecek olarak da sıklıkla tüketilmektedir (1, 2). Çay yapımında kullanılan bitkilerin içerdiği antioksidan aktiviteye de sahip; A, C, E vitaminleri ve fenolik bileşikler gibi birçok maddenin, hastalıkları önleme ve tedavi etmedeki rollerinin anlaşılması ile bitki çaylarına olan ilgi son yıllarda önemli ölçüde artmıştır (3, 4). Ülkemizde, yetişkinler tarafından tercih edildiği gibi çocuklara da içirilen bitki çaylarının başında ıhlamur ve kuşburnu gelmektedir (5-7).

Henüz yetiştirilme aşamasında dahi toprak, hava, su gibi dış etmenlere bağlı olarak mikroorganizmaların kontaminasyonuna açık olmaları ve tüketime hazır hale gelmeden önce bunları elimine etmeye yönelik çok az işlemden geçmeleri nedeniyle, çay yapımında kullanılan bitkiler, mikrobiyolojik açıdan tehlikeli hale gelebilmektedir (8-10). Atmosferde yaygın olarak bulunmalarından dolayı küfler, bitki çaylarının da aralarında yer aldığı bitkisel materyalde en sık karşılaşılan kontaminantlar arasında yer almaktadır. Bu türden bitkiler, aralarında toksijenik türlerin de yer aldığı küfleri yüksek düzeyde barındırabilmektedir (8, 11-14). Toksik türlerin varlığı mikotoksin oluşumu riskini de beraberinde getirmektedir (15).

Aflatoksinler, *Aspergillus* cinsine ait farklı türler tarafından oluşturulan ve üzerinde en çok araştırma yapılan mikotoksin grubudur. Bir kumarin halkaya bağlı dihidrofurane veya tetrahidrofurane yapıdadır (16). Günümüzde tanımlanan aflatoksin türevleri sayısının 20'nin üzerinde olduğu bilinmekle birlikte, aflatoksin B₁ (AFB₁), aflatoksin B₂ (AFB₂), aflatoksin G₁ (AFG₁) ve aflatoksin G₂ (AFG₂) bu grubun en önemli toksinleri olarak görülmektedir (16-18). Gıdalarda en sık karşılaşılan aflatoksin üreticisi iki ana türden biri olan *Aspergillus flavus*, AFB₁ ve AFB₂, *Aspergillus parasiticus* ise AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ üretebilmektedir (19, 20). Bu iki küf dünya genelinde gıdalarda bulunan aflatoksinlerden büyük oranda sorumlu tutulmaktadır (21).

Aflatoksinler, karsinojenik, teratojenik, mutajenik ve hepatotoksik etkileri nedeniyle, insan ve hayvan sağlığına yönelik ciddi tehlike oluşturmaktadır (22). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından aflatoksinler "Grup I: İnsanlar için karsinojen" olarak sınıflandırılmıştır (21). Aflatoksinlerin, kuru yemişler, kurutulmuş meyveler, tahıllar, baharatlar, yumurta, süt, peynir, yoğurt gibi ürünlerde bulunabildiği bilinmektedir (20, 23, 24). Bununla birlikte, sıklıkla tıbbi amaçlarla kullanılan ıhlamur ve kuşburnunun da aralarında yer aldığı bitki çaylarında aflatoksinler ve diğer mikotoksinlerin varlığını tespit etme amacıyla yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur (25-28). Bu nedenle bu çalışmada, insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinen aflatoksinlerin, çayı yapılarak yaygın şekilde tüketilen ıhlamur ve kuşburnundaki varlığının HPLC gibi hassas bir yöntemle belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Tekirdağ ve ilçelerinde bulunan ve tesadüfi örnekleme yöntemiyle seçilen aktar, market ve semt pazarlarından oluşan 30 farklı satış noktasından, 2015 yılı Şubat ve Mart aylarında ambalajsız olarak temin edilen 15 adet ıhlamur ve 15 adet kuşburnu örneği kullanılmıştır.

Nem tayini, su aktivitesinin belirlenmesi ve mikrobiyolojik analizler

ıhlamur ve kuşburnu örneklerinin nem değerleri etüv (Drying Oven DHG-9055A) kullanılarak 105 °C'de belirlenmiştir (29). Su aktivitesi tespiti için su aktivitesi tayin cihazı (Decagon Device, Pullman WA, ABD) kullanılmıştır (30). Her bir örnekten hazırlanan dilüsyonlardan, TMAB sayımı için Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve 48 saat süre ile 28-30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (31). Maya ve küflerin sayımı amacıyla Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) besiyeri kullanılmış ve yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapıp, 25 °C'de 5 günlük inkübasyon gerçekleştirilmiştir (12). İnkübasyonun ardından gelişen koloniler sayılmış ve sonuçlar "koloni oluşturan birim/gram" (kob/g) olarak ifade edilmiştir.

Aflatoksin analizi

Aflatoksin analizine ait ekstraksiyon ve saflaştırma aşamaları, R-Biopharm Firması tarafından önerilen yöntemde kısmen değişiklik yapılarak gerçekleştirilmiştir (32-34). Ihlamur ve kuşburnu örnekleri öncelikle blenderda (Waring Commercial Laboratory Blender, ABD) öğütülmüş ve homojenize edilmiştir. Hassas terazide (Precisa, XB 220A, Precisa Gravimetrics AG, İsviçre) 50 g örnek tartılmış, üzerine 300 mL asetonitril/metanol (1:1, v:v) karışımı ve 4 g NaCl eklenerek aflatoksinler ekstrakte edilmiştir. Karışım Whatman no:4 filtre kağıdından süzölmüştür. Süzöntünün 3 mL'si pipet yardımıyla bir behere alınarak, üzerine 12 mL fosfat tamponu (PBS) eklenerek, süzöntü seyreltilmiştir. Saflaştırma aşamasında kullanılacak immunoaffinite kolon (EASI-EXTRACT® AFLATOXIN, R-Biopharm AG, Darmstadt, Almanya) öncelikle vakum manifoldu (Supelco Visiprep 57030-U, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya) ve vakum pompası (Isolab GM-0.5, Interlab, Türkiye) kullanılarak 5 mL/dak. hızla 10 mL PBS geçirilerek şartlandırılmıştır. Daha sonra seyreltilmiş filtrat (0.5 g örneğe tekabül eden) 3 mL/dak. hızla, antikorlarla toksinlerin birbirine bağlanacağı EASI-EXTRACT® AFLATOXIN kolondan geçirilmiştir. Ardından 20 mL PBS, 5 mL/dak. hızla geçirilerek kolon yıkanmıştır. Aflatoksinler, kolondan saniyede 1 damla geçecek şekilde 1 mL metanol ile elue edilmiştir. Ayrıca kolondan 1 mL saf su geçirilerek aynı vialde toplanmış, elde edilen 2 mL'lik örnek, 0.45 µm 25 mm çapında PTFE Syringe filtre kullanılarak süzöldükten sonra amber renkli cam vialde alınarak HPLC'de analiz edilmiştir. Örnekler analiz edilinceye kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

HPLC ile Aflatoksin analizi, izokratik koşullarda ayrıntısı aşağıda açıklanan yöntem (33, 35) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Shimadzu HPLC sisteminde (LC-20 AT, Shimadzu, Japonya), RF-20A model floresans dedektör (Shimadzu, Japonya) 360 nm eksitasyon ve 433 nm emisyon dalga boylarına ayarlanmıştır. Çalışmada Inertsil (GL Sciences, Inc., CA, ABD) ODS-3 C18 paslanmaz çelik kolon (150 x 4.6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Su/asetonitril/metanol (6:2:3, v:v:v)'den oluşan mobil faz, litrede 350 µL, 4 M nitrik asit (HNO₃), 120 mg potasyum bromür (KBr) içerecek şekilde hazırlanmış, filtre edilmiş ve ultrasonik banyoda (Wise Clean, Wisd Lab. Inst.) 10 dak. bekletilerek

gazı giderilmiştir. Akış hızı 1.0 mL/dak. olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon işleminden önce sisteme bağlı olan ve 30 dak. süreyle şartlandırılmış olan Kobra Cell (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, İskoçya) ile aflatoksinlerin türevlendirilmesi sağlanmıştır. 100 µL ekstrakt HPLC sistemine enjekte (SIL-20A oto enjeksiyon sistemi) edilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki aflatoksin konsantrasyonları, aflatoksin kalibrasyon grafikleri kullanılarak LC Solutions paket programı ile hesaplanmıştır.

Örneklerin analizi öncesinde, aflatoksin standardı (R-Biopharm AG, Darmstadt, Almanya) kullanılarak hazırlanan stok çözelti ile farklı konsantrasyonda aflatoksin standart çözeltileri hazırlanmıştır. Aflatoksin konsantrasyonuna karşılık, HPLC kromatogramında elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek aflatoksin kalibrasyon grafiği, LC Solutions paket programı kullanılarak oluşturulmuştur. Tespit limiti (Limit of Detection; LOD) ve tayin limiti (Limit of Quantification; LOQ), metodun standart sapma değerine dayanan hesaplama yöntemi ile hesaplanmıştır (36). Ihlamur ve kuşburnu için geri alma oranlarını belirlemek amacıyla, toplam 4 µg/kg aflatoksin içerecek şekilde çalışma çözeltisi ile kontamine edilmiş örnekler, ayrıntısı yukarıda açıklanan ekstraksiyon ve saflaştırma aşamalarından geçirilmiştir. Elde edilen süzöntüler, cam viallere alınarak HPLC'de analiz edilmiş ve geri alma oranları hesaplanmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Ihlamur ve kuşburnu örneklerinin nem ve su aktivitesi değerleri

Ihlamur örnekleri nem miktarları ortalaması %10.97 olarak bulunmuş ve nem değerlerinin %8.69-%15.17 arasında değiştiği belirlenmiştir. Kuşburnu örneklerinin nem miktarları %7.89-%24.23 aralığında bulunmuş ve ortalama nem miktarı %14.58 olarak tespit edilmiştir. Türkben ve ark. (37) kurutulmuş kuşburnu meyvelerinde nem miktarını %20.77 olarak bulmuştur. Vidovic ve ark. (38) kuşburnu meyvelerinde nem miktarını %7.54-8.31 olarak bildirmiştir. Aradaki farklılığın, çevresel etmenler, yetiştirme koşulları, meyvelerin olgunluk düzeyi, kurutma ve depolama şartları (37) gibi faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ihlamur örneklerine ait su aktivitesi değerleri 0.57-0.61 aralığında bulunmuş

olup, ortalaması 0.58 olarak belirlenmiştir. Kuşburnu örnekleri incelendiğinde, su aktivitesi değerlerinin 0.53-0.76 aralığında olduğu tespit edilmiş ve ortalama su aktivitesi değeri 0.62 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin Dağdelen ve ark. (39) tarafından ham bitki çayı numunelerinde elde edilen sonuçlar ile Özay ve ark. (40) ve Kolb (41) tarafından ortaya konulan sonuçlara yakın olduğu anlaşılmaktadır.

İhlamur ve kuşburnu örneklerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları

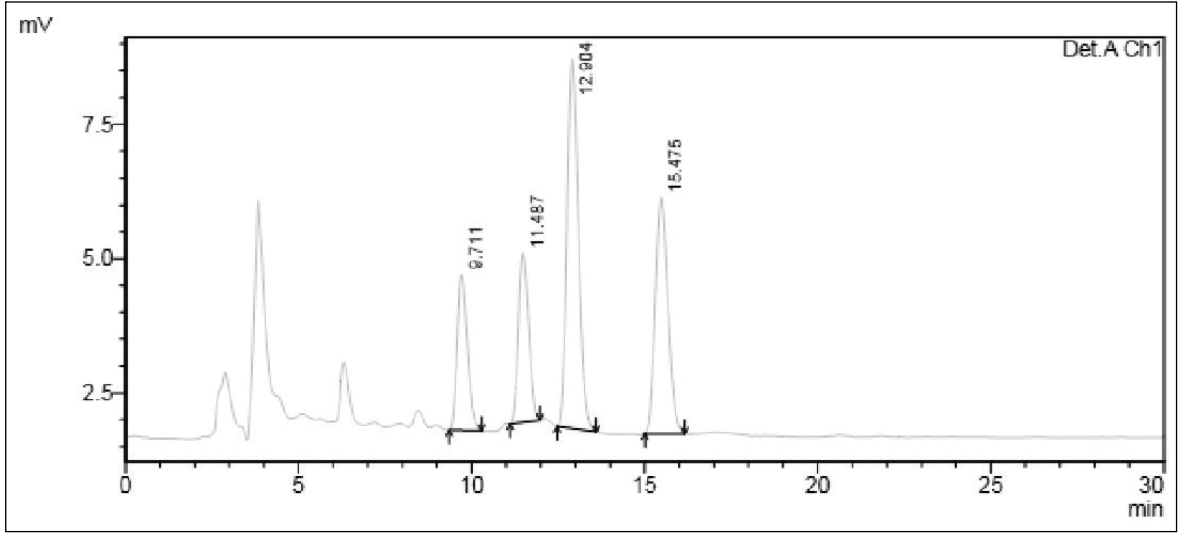
Mikrobiyolojik analizi yapılan ihlamur örneklerinde maya küf kontaminasyonunun 6 örnekte $<1.0 \times 10^3$ kob/g, diğer örneklerde ise 3.0×10^3 - 1.2×10^5 kob/g aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, önceki çalışmalarda ihlamurda 10^2 - 10^5 kob/g maya küf tespit eden araştırmacıların ortaya koyduğu sonuçlar ile örtüşmektedir (26, 28, 41). Kuşburnu örnekleri incelendiğinde maya küf düzeyleri $<1.0 \times 10^3$ - 3.6×10^5 kob/g olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kuşburnu örneklerinde tespit edilen maya küf düzeyi, Kaya (42) ($<1.0 \times 10^2$ kob/g) ve Arslan (28) ($<1.0 \times 10^1$ - 2.1×10^1 kob/g) tarafından bildirilen sonuçlardan daha yüksektir. Bu durumun, bahsi geçen çalışmalarda incelenen örneklerin ambalajlı olarak temin edilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İncelenen ihlamur örneklerinde TMAB sayısının 2 örnekte 1.0×10^3 kob/g'dan az olduğu, geriye kalan 13 örnekte ise 3.9×10^4 - 4.3×10^6 kob/g arasında olduğu saptanmıştır. Bu değerler, Kolb (41) ve Kaya (42) tarafından yapılan çalışmalarda ihlamurda belirlenen TMAB bulgularına (9.8×10^6 kob/g ve $<10^3$ - 10^9 kob/g düzeyinde) yakınlık göstermektedir. Ancak çalışmada tespit edilen bu değerlerin, Scolari ve ark. (31) tarafından ortaya konulan ortalama 4.0×10^3 kob/g sonucundan ise yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Kuşburnu örneklerinde TMAB düzeyinin, 7 örnekte 1.0×10^3 kob/g'dan az olduğu, diğer örneklerde ise 6.4×10^4 kob/g'a ulaştığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, kuşburnunda 2.7×10^3 kob/g TMAB tespit eden Kaya (42) tarafından ortaya konulan bulgular ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışma sonucu, ihlamur ve kuşburnu örneklerinde belirlenen maya küf ve TMAB düzeyinin, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne ve THIE (Tea and Herbal Infusions Europe) tarafından yapılan düzenlemelere uygun olduğu anlaşılmaktadır (43, 44).

İhlamur ve kuşburnu örneklerinin Aflatoksinler açısından değerlendirilmesi

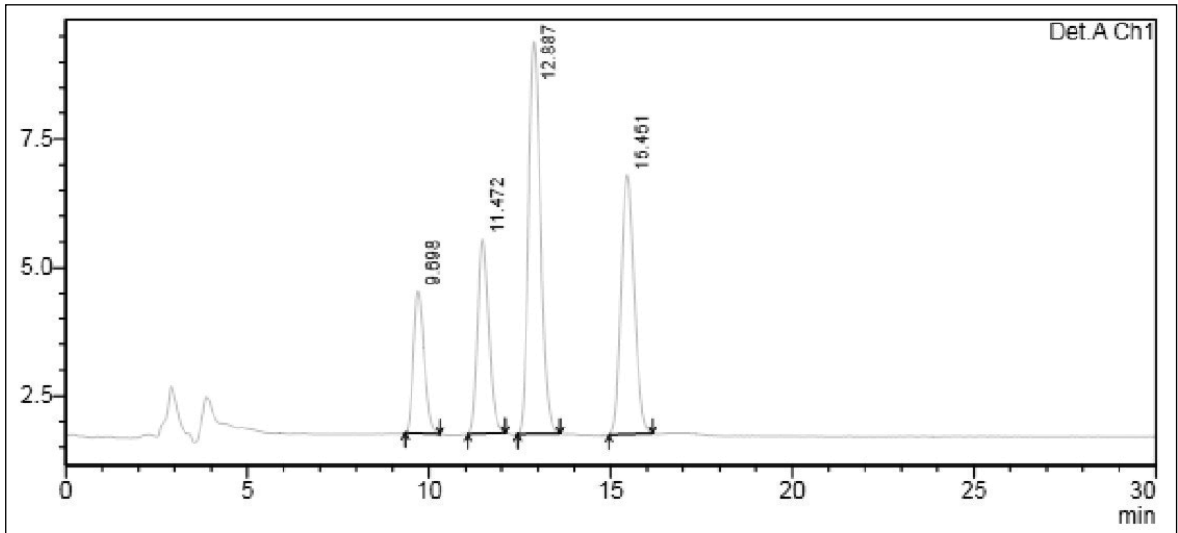
Örneklerdeki aflatoksin konsantrasyonlarına ilişkin hesaplamalar, aflatoksin kalibrasyon grafikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂'nin kalibrasyon grafiklerine ait R² değerleri sırasıyla 0.998, 0.997, 0.998 ve 0.997 olarak tespit edilmiştir. Alıkonma zamanları, AFB₁ için 15.5, AFB₂ için 12.9, AFG₁ için 11.5 ve AFG₂ için 9.7 dakika olarak belirlenmiştir. AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ için hesaplanan LOD değerleri sırasıyla 0.046, 0.050, 0.047 ve 0.049, LOQ değerleri ise sırasıyla 0.155, 0.168, 0.156 ve 0.162 olarak bulunmuştur. AFG₂, AFG₁, AFB₂ ve AFB₁ için belirlenen geri alma oranları ise ihlamurda, sırasıyla %71.6, %90.0, %101.2, %100.6 ve kuşburnunda sırasıyla %81.2, %98.2, %108.8, %109.6 olarak hesaplanmıştır. Türk Gıda Kodeksi 2011/32 no'lu "Gıdalardaki Mikotoksin Limitlerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği"nde, aflatoksin analizlerinde 1-10 µg/kg konsantrasyon aralığı için geri alma oranlarının %70-110 olması gerektiği bildirilmektedir (45). Bu çalışmada elde edilen geri alma oranlarının söz konusu tebliğe uygun olduğu görülmektedir. İhlamur ve kuşburnuna ait geri alma çalışması örnek kromatogramları Şekil 1'de verilmiştir.

İhlamur ve kuşburnu örneklerinde HPLC ile yapılan aflatoksin analizi sonuçları Çizelge 1'de gösterilmektedir.

Örneklerin tamamında, incelenen aflatoksinlerden en az biri tespit edilmiştir. Çalışmada incelenen ihlamur örneklerinin %47'sinde yalnızca AFG₂ ve kuşburnu örneklerinin %87'sinde yalnızca AFG₁ veya AFG₂ tespit edilmiştir. Bu durum, Hiscocks (46)'un bildirdiği gibi bazı *Aspergillus* türlerinin yalnızca G grubu aflatoksinleri üretmesi ile ilişkili olabilir. Yalnızca iki adet ihlamur örneğinin, LOQ değerlerinin üzerinde aflatoksin içerdiği belirlenmiştir. Bunlardan birinde 0.158 µg/kg AFG₁ ve 0.168 µg/kg AFG₂, diğerinde ise 0.162 µg/kg AFG₂ bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde bitki çaylarına ilişkin bir düzenleme bulunmamaktadır. Bununla birlikte, çalışmada elde edilen değerlerin, aynı yönetmelikte yer alan kurutulmuş meyveler (aflatoksin B₁ için 8 µg/kg, toplam aflatoksin (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) için 10 µg/kg) ve baharatlarda (aflatoksin B₁



(a)



(b)

Şekil 1. Aflatoksinlerin geri alım çalışmasında elde edilen kromatogramlar; (a) ıhlamur, (b) kuşburnu
Figure 1. Chromatograms obtained from the study of recovery of aflatoxins; (a) linden, (b) rosehip

için 5 µg/kg, toplam aflatoksin için 10 µg/kg) bulunabilecek maksimum aflatoksin limitlerinin altında olduğu ifade edilebilir (47). Bu çalışmanın aksine, literatürde ıhlamur ve kuşburnunda aflatoksinlerin yüksek miktarlarda belirlendiğini bildiren çalışmalar da vardır. Ülkemizde organik bitkisel ürünlerin incelendiği bir çalışmada, ELISA yöntemi kullanılarak analiz edilen 5 ıhlamur örneğinin 2'sinde AFB₁ tespit edilmemiş, diğer 3 örnekte ise 0.051, 1.329 ve 40.647 µg/kg düzeylerinde AFB₁ belirlendiği bildirilmiştir (28).

Arslan (28) tarafından yapılan bu çalışmada, incelenen 6 adet kuşburnu örneğinin 4 tanesinde AFB₁ saptandığı ve miktarların 20.695-52.500 µg/kg aralığında olduğu bildirilmiştir. Ayrıca incelenen 4 adet kuşburnu ve 1 adet ıhlamur örneğinde saptanan AFB₁ miktarının yasal limitleri aştığı bildirilmiştir. Rizzo ve ark. (48) tarafından yapılan çalışmada da, incelenen ıhlamur örneklerinde AFB₁ ve AFB₂ tespit edildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte ıhlamur ve kuşburnunda aflatoksin tespit edilmediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur

Çizelge 1. İhlamur ve kuşburnu örneklerine ait AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ değerleri
 Table 1. AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ values in linden and rosehip samples

Örnek No Sample Number	Örnek Türü Sample Type	Örneğin Alındığı Yer Place of Sampling	AFB ₁ (µg/kg) ^a	AFB ₂ (µg/kg) ^a	AFG ₁ (µg/kg) ^a	AFG ₂ (µg/kg) ^a
1	İhlamur	Aktar	TE	TE	TE	>LOD ^e
2	İhlamur	Market	>LOD ^b	>LOD ^c	TE	>LOD ^e
3	İhlamur	Aktar	>LOD ^b	TE	>LOD ^d	>LOD ^e
4	İhlamur	Aktar	TE	TE	TE	>LOD ^e
5	İhlamur	Aktar	>LOD ^b	>LOD ^c	0.158	0.168
6	İhlamur	Aktar	TE	TE	TE	>LOD ^e
7	İhlamur	Pazar	TE	TE	TE	>LOD ^e
8	İhlamur	Pazar	TE	TE	TE	>LOD ^e
9	İhlamur	Market	TE	TE	TE	>LOD ^e
10	İhlamur	Pazar	TE	TE	>LOD ^d	>LOD ^e
11	İhlamur	Market	TE	>LOD ^c	>LOD ^d	>LOD ^e
12	İhlamur	Pazar	TE	TE	>LOD ^d	>LOD ^e
13	İhlamur	Aktar	>LOD ^b	TE	TE	0.162
14	İhlamur	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	>LOD ^e
15	İhlamur	Aktar	TE	TE	TE	>LOD ^e
1	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	TE	>LOD ^e
2	Kuşburnu	Market	TE	TE	>LOD ^d	TE
3	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	TE
4	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	TE
5	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	TE
6	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	TE
7	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	TE
8	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	TE
9	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	TE
10	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	TE
11	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	TE
12	Kuşburnu	Pazar	TE	TE	>LOD ^d	TE
13	Kuşburnu	Aktar	TE	>LOD ^c	>LOD ^d	TE
14	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD ^d	TE
15	Kuşburnu	Aktar	TE	>LOD ^c	>LOD ^d	TE

TE, tespit edilemedi; miktar LOD değerinden küçük

^a Sonuçlar, iki paralel analiz sonucunun ortalamasını ifade etmektedir.

^b Miktar LOD (0.046) değerinden büyük, LOQ (0.155) değerinden küçük

^c Miktar LOD (0.050) değerinden büyük, LOQ (0.168) değerinden küçük

^d Miktar LOD (0.047) değerinden büyük, LOQ (0.156) değerinden küçük

^e Miktar LOD (0.049) değerinden büyük, LOQ (0.162) değerinden küçük

TE, not detected; quantity less than LOD

^a The results indicate the average of two parallel analysis results.

^b Quantity greater than LOD (0.046) and less than LOQ (0.155)

^c Quantity greater than LOD (0.050) and less than LOQ (0.168)

^d Quantity greater than LOD (0.047) and less than LOQ (0.156)

^e Quantity greater than LOD (0.049) and less than LOQ (0.162)

(25, 33, 39, 49). Halt (25), bitki çaylarında mikotoksijenik küf ve mikotoksin varlığını incelemek üzere gerçekleştirdiği çalışmasında, TLC ile analiz ettiği 2 adet ihlamur örneğinde AFB₁ tespit etmediğini rapor etmiştir. Mısır'da, ihlamurun da aralarında bulunduğu bazı tıbbi bitkilerde yapılan bir çalışmada (49), 2'si ambalajlı olmak üzere 4 adet ihlamur örneğinde aflatoksin bulunmadığı bildirilmiştir. Romagnoli ve ark.

(33), kuşburnunun da aralarında yer aldığı tıbbi bitki ve bitki çayları ile bazı baharatların aflatoksin düzeylerini HPLC ile incelemiş ve kuşburnu örneklerinde AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ tespit etmediklerini bildirmiştir. Ülkemizde Dağdelen ve ark. (39) tarafından yapılan bir çalışmada da ihlamur ve kuşburnu örneklerinde AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ varlığı araştırılmış, raf ömürleri boyunca belirli aralıklarla HPLC ile analiz edilen örneklerde aflatoksin saptanmadığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada incelenen örneklerde düşük düzeyde de olsa aflatoksin tespit edilmesinin nedeni, bu örneklerde gelişen toksijenik küflerin bir miktar toksin üretmiş olması, fakat kurutma ile toksin üretimi için gerekli koşulların ortadan kaldırılması ile toksin üretiminin durması olabilir. İhlamur örneklerinde 0.57-0.61 aralığında, kuşburnu örneklerinde ise 0.53-0.76 aralığında olduğu tespit edilen a_w değerlerinin, *Aspergillus* cinsine ait küflerin gelişimi ve mikotoksin üretimi için gerekli minimum a_w değerlerinin altında olması da bu durumu açıklamaktadır. Çünkü *Aspergillus flavus*'un gelişebileceği minimum a_w değerinin 0.78-0.82, *A. parasiticus*'un ise 0.78-0.84 aralığında olduğu bildirilmektedir. Aflatoksin üretimi için gerekli minimum a_w değerleri (*Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* için sırasıyla 0.83-0.87 ve 0.87) ise biraz daha yüksektir (50, 51). Ayrıca, çalışmada incelenen ihlamur ve kuşburnu örneklerinin depolanmaları sırasında da toksin üretimine elverişli koşulların oluşmamış olduğu düşünülebilir. Diğer taraftan ihlamur ve kuşburnunun çeşitli kısımlarının, bazı mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyel etkisi bulunduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalarda çoğunlukla bazı bakteriler üzerine yoğunlaşmış olup, bakteriler üzerindeki etkinin funguslar üzerindeki etkiden daha güçlü olduğu ortaya konmuştur (52-57). Bununla birlikte, bu bitkilerin aflatoksijenik küflerin gelişmesi veya toksin oluşturması üzerinde benzer etkileri olup olmadığına ilişkin yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Dünya çapında artan kullanımları ve büyüyen küresel tıbbi bitkiler pazarındaki yerleri dikkate alındığında, bitki çaylarının güvenilirliğinin ne kadar önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Bitki çaylarının, toksijenik küfler ile kontamine olabileceği ve küflerin, uygun şartlarda gelişerek insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri bulunan mikotoksinleri oluşturabileceği bilinmelidir. Isıya dayanıklı olmaları nedeniyle aflatoksinlerin, bitki çaylarının hazırlanması sırasında kullanılan kaynatma ve/veya demleme gibi işlemler ile parçalanmaması ve dolayısıyla kontamine bitki çaylarının tüketilmesi sonucu organizmaya alınabilmesi de söz konusu olabilir. Bebek, çocuk ve yaşlıların yanı sıra hastalar tarafından da sıklıkla tüketilen, çoğu zaman da sağlığı korumak ve çeşitli rahatsızlıkları gidermek amacıyla tercih edilen bitki çaylarının, mikotoksinlerle, özellikle

de aflatoksinler ile bulaşabilme olasılığı, halk sağlığı açısından önemlidir. Bu tehlikeyi ortadan kaldırmaya yönelik olarak öncelikle yapılması gereken, bitki çaylarında üretimin her aşamasını kontrol altında tutmak ve iyi üretim uygulamaları ile iyi hijyen uygulamalarına bağlı kalmaktır. Bitki çaylarında toksijenik küflerin gelişiminin ve aflatoksin üretiminin önlenmesinde, özellikle kurutma ve depolama koşullarının önemi yadsınamayacağından, bu aşamalara gereken hassasiyetin gösterilmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Birinci yazarın yüksek lisans tezi olan bu çalışmayı, NKUBAP.00.24.YL.14.18 numaralı proje ile destekleyen NKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Sezik E. 2011. Bitkilerin Dünyası: Dostlar. Klinik Toksikoloji Derneği 16. Kongresi, 18-21 Mayıs, Kayseri, Türkiye, 28.
2. Zegarac JP, Samec D, Piljac A. 2013. Herbal Teas: A Focus on Antioxidant Properties. In: *Tea in Health and Disease Prevention*, Preedy VR. (ed), Academic Press, UK, pp. 129-140.
3. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. 2005. Polyphenols and Antioxidant Capacity of Bulgarian Medicinal Plants. *J Ethnopharmacol*, 96: 145-150.
4. Tschiggerl C, Bucar F. 2012. The Volatile Fraction of Herbal Teas. *Phytochem Rev*, 11: 245-254.
5. Polat R, Selvi S, Çakılcıoğlu U, Açar M. 2012. Bingöl Semt Pazarlarında Satılan Yabancı Bitkilerin Etnobotanik Açısından İncelenmesi. *Bio Divers Conserv*, 5 (3): 155-161.
6. Fidan MS, Öz A, Adanur H, Turan B. 2013. Gümüşhane Yöresinde Yetişen Bazı Önemli Odun Dışı Orman Ürünleri ve Kullanım Miktarları. *Gümüşhane Univ J Sci Tech Inst*, 3 (2): 40-48.
7. Ulusoy A, Şeker M. 2013. Türkiye'de Değişen Çay Tüketim Alışkanlıkları Projesi. Trabzon Ticaret Borsası, Türkiye, 64 s.
8. Martins HM, Martins ML, Dias MI, Bernardo F. 2001. Evaluation of Microbiological Quality of Medicinal Plants Used in Natural Infusions. *Int J Food Microbiol*, 68: 149-153.

9. Vitullo M, Ripabelli G, Fanelli I, Tamburro M, Delfine S, Sammarco ML. 2011. Microbiological and Toxicological Quality of Dried Herbs. *Lett Appl Microbiol*, 52: 573-580.
10. Araújo MGF, Bauab TM. 2012. Microbial Quality of Medicinal Plant Materials. *Latest Research into Quality Control*, Akyar I (ed), InTech, pp. 67-81.
11. Özyaral O, Tarkan Ö, Çevikbaş A, Johansson CB. 1994. Farmasötik Önemi Olan Bazı Droglarda Mikolojik Analizler. *Mikrobiyol Bul*, 28: 359-365.
12. Tournas VH, Katsoudas EJ. 2008. Microbiological Quality of Various Medicinal Herbal Teas and Coffee Substitutes. *Microbiol Insights*, 1: 47-55.
13. Stevic T, Pavlovic S, Stankovic S, Savikin S. 2012. Pathogenic Microorganisms of Medicinal Herbal Drugs. *Arch Biol Sci*, 64 (1): 49-58.
14. Omogbai BA, Ikenebomeh M. 2013. Microbiological Characteristics and Phytochemical Screening of Some Herbal Teas in Nigeria. *Eur Sci J*, 9 (18): 149-160.
15. Kosalec I, Cvek J, Tomic S. 2009. Contaminants of Medicinal Herbs and Herbal Products. *Arch Ind Hyg Toxicol*, 60: 485-501.
16. Hussein HS, Brasel JM. 2001. Toxicity, Metabolism, and Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. *Toxicology*, 167: 101-134.
17. Oruç HH. 2005. Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 24 (1-2-3-4): 105-110.
18. Yentür G, Er B. 2012. Gıdalarda Aflatoksin Varlığının Değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 69 (1): 41-52.
19. Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M. 1999. Toxic Effects of Mycotoxins in Humans. *Bulletin*, 77 (9): 754-766.
20. Heperkan D. 2006. Detecting and Controlling Mycotoxin Contamination of Herbs and Spices. *Handbook of Herb and Spices*, Peter KV (ed), Volume 3, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 3-40.
21. IARC. 2002. Aflatoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82-7A.pdf> (Accessed 10 January 2016).
22. Daradimos E, Marcaki P, Michael K. 2000. Evaluation and Validation of Two Fluorometric HPLC Methods for the Determination of Aflatoxin B1 in Olive Oil. *Food Addit Contam*, 17 (1): 65-73.
23. Wilson DM, Mubatanhema W, Jurjevic Z. 2002. Biology and Ecology of Mycotoxigenic Aspergillus Species as Related to Economic and Health Concerns. *Mycotoxins and Food Safety*, DeVries JV, Trucksess MW, Jackson LS (ed), Volume 504, Springer Science, New York, USA, pp. 3-17.
24. Ashiq S, Hussain M, Ahmad B. 2014. Natural Occurrence of Mycotoxins in Medicinal Plants: A review. *Fungal Genet Biol*, 66: 1-10.
25. Halt M. 1998. Moulds and Mycotoxins in Herb Tea and Medicinal Plants. *Eur J Epidemiol*, 14: 269-274.
26. Martins ML, Martins HM, Bernardo F. 2001. Fumonisin B₁ and B₂ in Black Tea and Medicinal Plants. *J Food Prot*, 64: 1268-1270.
27. Santos L, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. 2009. Screening of Mycotoxin Multicontamination in Medicinal and Aromatic Herbs Sampled in Spain. *J Sci Food Agric*, 89: 1802-1807.
28. Arslan R. 2013. Türkiye’de Üretilen Bazı Organik Baharat ve Bitkisel Çayların Aflatoksin B₁ Düzeyleri ve Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması. Celal Bayar Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Manisa, Türkiye, 126 s.
29. Cemeroglu B (ed). 2010. *Gıda Analizleri*, Genişletilmiş 2. Baskı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:34, Ankara, Türkiye, 657 s.
30. AOAC. 2000. Official Method 987.18, 42:1, Washington DC, USA.
31. Scolari G, Zacconi C, Vescovo M. 2001. Microbial Contamination of Tea and Aromatic Herb-Tea Products. *Ital J Food Sci*, 4 (13): 429-433.
32. Anon 2016. Mycotoxin Technical Manual. R- Biopharm Rhone. www.r-biopharm.com (Accessed 03 April 2016).
33. Romagnoli B, Menna V, Gruppioni N, Bergamini C. 2007. Aflatoxins in Spices, Aromatic Herbs, Herb-Teas and Medicinal Plants Marketed in Italy. *Food Control*, 18: 697-701.

34. Tekiner N, Türkyılmaz K. 2011. Türk Çaylarında Aflatoksin Varlığı ve Muhtemel Bulaşma Kaynakları. Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü Atatürk Çay ve Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Rize, Türkiye.
35. Stroka J, Anklam E, Jörissen U, Gilbert J. 2000. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder: Collaborative Study. *J AOAC Int*, 2: 320-340.
36. Vial J, Jardy A. 1999. Experimental Comparison of the Different Approaches to Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method. *Anal Chem*, 71: 2672-2677.
37. Türkben C, Uylaşer V, İncedayı B, Çelikkol I. 2010. Effects of Different Maturity Periods and Processes on Nutritional Components of Rosehip (*Rosa canina* L.). *J Food Agric Environ*, 8 (1): 26-30.
38. Vidovic S, Cvetkovic D, Ramic M, Dunjic M, Malbasa R, Tepic A, Sumic Z, Velicanski A, Jokic S. 2013. Screening of Changes in Content of Health Benefit Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Status of Medicinal Plants during the Production of Herbal Filter Tea. *Ind Crop Prod*, 50: 338-345.
39. Dağdelen AF, Aşyemez AÜ, Tokat İE, Cumbul D, Dağdelen A. 2014. Mikrobiyolojik ve Aflatoksin Yönünden Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ve Çaylarının İncelenmesi. II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, 23-25 Eylül, Yalova, Türkiye, 191-196.
40. Özay G, Pala M, Saygı B. 1993. Bazı Gıdaların Su Aktivitesi (a_w) Yönünden İncelenmesi. *GIDA*, 18 (6): 377-383.
41. Kolb N. 1999. Microbiological Status of Untreated Herbal Materials. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 95 (7): 263-268.
42. Kaya DB. 2006. Piyasada Satışa Sunulan Bazı Bitkisel Çayların Mikrobiyolojik Kalitesi. Ankara Üni. Fen Bil. Enst. Gıda Müh. ABD. Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 43 s.
43. Anon 2011a. Türk Gıda Kodeksi. Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete (3. Mükerrer), Ankara.
44. THIE. 2015. THIE's Recommended Microbiological Specification for Trade in Herbal Infusions Raw Materials (Dry). http://www.thie-online.eu/fileadmin/inhalte/Publications/HFI/4_2015-06-30_THIE_Recommended_microbiological_specifications.pdf (Accessed 03 April 2016)
45. Anon 2011b. Türk Gıda Kodeksi. Gıdalardaki Mikotoksin Limitlerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği (2011/32). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 15 Ağustos 2011 tarih ve 28026 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
46. Hiscocks ES. 1965. The Importance of Molds in the Deterioration of Tropical Foods and Feedstuffs. In: *Mycotoxins in Foodstuffs*, Wogan GN (ed). MIT Press, Cambridge, MA, pp.15-26.
47. Anon 2011c. Türk Gıda Kodeksi. Bulaşanlar Yönetmeliği, Gıdalardaki Bulaşanların Maksimum Limitleri. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete (3. Mükerrer), Ankara.
48. Rizzo I, Varsavsky E, Vedoya G, Haidukowski M, Frade H, Chiale C. 1998. Fungal and Aflatoxin Contamination of Medicinal Herbs. *Mycotoxin Res*, 14: 46-53.
49. Abou-Arab AAK, Kawther MS, El Tantawy ME, Badeaa RI, Khayria N. 1999. Quantity Estimation of Some Contaminants in Commonly Used Medicinal Plants in the Egyptian Market. *Food Chem*, 67: 357-363.
50. Sweeney MJ, Dobson ADW. 1998. Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species. *Int J Food Microbiol* 43: 141-158.
51. Tunail N. 2000. Funguslar ve Mikotoksinler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2. baskı; Ankara Üniversitesi. Ziraat Fak. Gıda Müh. Böl. Yayını, Ankara, 3. bölüm, 13. kısım.
52. Omar S, Lemonnier B, Jones N, Ficker C, Smith ML, Neema C, Towers GHN, Goel K, Arnason JT. 2000. Antimicrobial Activity of Extracts of Eastern North American Hardwood Trees and Relation to Traditional Medicine. *J Ethnopharmacol*, 73: 161-170.
53. Fitsiou I, Tzakou O. 2007. Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller Oils. *J Essent Oil Res*, 19: 183-185.

54. Olech M, Nowak R, Los R, Rzymowska J, Malm A, Chrusciel K. 2012. Biological Activity and Composition of Teas and Tinctures Prepared from *Rosa rugosa* Thunb. *Cent Eur J Biol*, 7 (1): 172-182.
55. Özbucak TB, Akçin ÖE, Ertürk Ö. 2013. The Change in Ecological, Anatomical and Antimicrobiological Properties of the Medicinal Plant *Tilia Rubra* Dc. Subsp. *Caucasica* (Rupr.) V. Engler Along an Elevational Gradient. *Pak J Bot*, 45 (5): 1735-1742.
56. Kacániová M, Petrová J, Kántor A, Terentjeva M, Kluz M. 2015. *In vitro* Antimicrobial Activity of Four Slovak Medicinal Plants against Different Strains of Bacteria. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol*, 48 (1): 137-142.
57. Rovná K, Petrová J, Terentjeva M, Cerná J, Kacániová M. 2015. Antimicrobial Activity of *Rosa canina* Flowers Against Selected Microorganisms. *J Microbiol Biotech Food Sci*, 4 (1): 62-64.