

Çeşitli peynir örneklerinde aflatoksin M₁ varlığının HPLC ile analizi

Analysis of aflatoxin M₁ by HPLC in various cheese products

Aysun DİNÇEL^{1*}, Figen DEMLİ¹, Fügen DURLU-ÖZKAYA²,
Filiz ALATAN³, Ramazan UZUN³, Serdar Alp SUBAŞI¹

ÖZET

Amaç: Aflatoksinler; özellikle *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* mantarları tarafından üretilen karsinojenik, teratojenik, mutajenik ve toksijenik etkileri olan pek çok tarımsal üründe oluşabilen bir grup mikotoksindir. Süt veren hayvanlar aflatoksin B₁ ile kontamine olduğunda bu hayvanlardan alınan sütte aflatoksin M₁ bulunmaktadır, aflatoksin B₁'in biyotransformasyon sonucu birincil metaboliti olarak aflatoksin M₁ karaciğerde oluşturulur ve süt bezleri ile salgılanır. Bu çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanmış (Urfa, Civil, Mihalıç, Otlu peynir ve Kars kaşarı; n=100) peynirlerde aflatoksin M₁ HPLC ile analizi ve araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Peynirlerde aflatoksin M₁ konsantrasyonunun analizi ters faz HPLC-fluoresans sistemi ile Phenomenex, Nucleosil, 100 A, C₁₈ (4.6x250 mm, 5µm) analitik kolon ve bileşimi su:asetonitril (75:25 v/v) olan hareketli faz (1 ml/dk akış hızında, 40 °C'da) ile kullanılarak λ_{ex}=365 nm ve λ_{em}=435 nm'de yapılmıştır.

Bulgular: Civil, Mihalıç, Otlu peynirleri ve Kars kaşarında aflatoksin M₁ saptanamamıştır. Sadece Urfa

ABSTRACT

Objective: Aflatoxins are a group of mycotoxin with potent carcinogenic, teratogenic, mutagenic and toxigenic effects are produced by certain species of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* and may occur in various agricultural commodities. When aflatoxin B₁ contaminates the food of lactating animals, milk from these animals contains aflatoxin M₁, the principal metabolite arising from biotransformation of aflatoxin B₁ in liver and it is secreted into milk in the mammary gland. In this study we aimed to determination and investigation of aflatoxin M₁ concentrations in cheese samples by HPLC. Samples were obtained from various regions of Turkey (Urfa, Civil, Mihalıç, Otlu cheese and Kars cheddar; n=100).

Method: Aflatoxin M₁ concentrations in cheese samples determined by using HPLC-RP fluorescence system (λ_{ex}=365 nm and λ_{em}=435 nm) which were consisted of Phenomenex, Nucleosil, 100 A, C₁₈ (4.6x250 mm, 5µm) analytical column and mobile phase composition with water:acetonitrile (75:25 v/v) at 1 ml/min, 40 °C).

Results: Aflatoxin M₁ was determined only ten samples of Urfa cheese, which were under the

¹ Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Tüketici Güvenliği ve Sağlık Etkileri Araştırma Müdürlüğü, ANKARA

² Gazi Üniversitesi Ticaret ve Turizm Eğitim Fakültesi, Gölbaşı, ANKARA

³ Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Zehir Araştırmaları Müdürlüğü, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Dr. Aysun Dincel

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Tüketici Güvenliği ve Sağlık Etkileri Araştırma Müdürlüğü, ANKARA

Tel : +90 312 458 22 00

E-posta / E-mail : aysun.dincel@rshm.gov.tr

Geliş Tarihi / Received : 01.07.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 15.02.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.78942

Dinçel A, Demli F, Durlu-Özkaya F, Alatan F, Uzun R, Subaşı SA. Çeşitli peynir örneklerinde aflatoksin M₁ varlığının HPLC ile analizi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(2): 89-96.

peynirlerinin on tanesinde aflatoksin M₁ saptanmıştır. Peynirlerde saptanan aflatoksin M₁ konsantrasyonu kabul edilebilir sınır değerinin altındadır.

Sonuç: Bu çalışmada Ülkemizde üretilen çeşitli peynir örneklerinden yalnızca Urfa peynirlerinde aflatoksin M₁ saptanmıştır. Ancak saptanan değer kabul edilebilir değerlerin altında olup, insanların tüketimine uygundur. Ancak bu konudaki çalışmaların daha geniş kapsamlı örneklerle tekrarlanması yanısıra gerek üreticilerin gerekse tüketicilerin konu hakkında bilgilendirilmesi önerilir.

Anahtar Sözcükler: Aflatoksin M₁, peynir, HPLC

acceptable limits of dairy products. In the other groups of cheese samples (Civil, Mihaliç, Otlu cheese and Kars cheddar) Aflatoxin M₁ was not determined.

Conclusion: In this study, Aflatoxin M₁ was determined only ten samples of Urfa cheese which were under the acceptable limits of dairy products. All other samples from different part of the country were suitable for human consumption. Ancak bu konudaki çalışmaların daha geniş kapsamlı örneklerle tekrarlanması yanısıra gerek üreticilerin gerekse tüketicilerin konu hakkında bilgilendirilmesi önerilir.

Key Words: Aflatoxin M₁, cheese, HPLC

GİRİŞ

Çeşitli gıdalarda, tahıllarda, yemlerde ve her türlü kuru yiyeceklerde rutubetin artmasına ve ortam sıcaklığına bağlı olarak, küf türleri gıda ürünlerinin üzerinde pamuk görünümünde, bazen renkli oluşumlar yaparak hızla üremektedirler. İstenmeyen bu küflerin üremesi sonucu mikotoksin denilen sağlık açısından zararlı toksinler ortaya çıkar ki bunların en önemlilerinden birisi "Aflatoksin"dir. Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* veya *Aspergillus parasiticus* küflerinin ürettiği toksik metabolitler olarak adlandırılır. Aflatoksin, doza ve toksinin vücuda alınma sıklığına bağlı olarak akut ve kronik etkiler oluşturabilmektedir. Aflatoksinlerin insanlar ve hayvanlar için toksijenik, mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileri olduğu bilinmektedir. İnsanlar ve hayvanlar toksini aflatoksinle bulaşmış gıda ve yem maddelerini doğrudan tüketerek ya da aflatoksin bulaşmış yemle beslenen hayvanların, yumurta, peynir ve süt gibi ürünlerindeki toksinle alırlar (1-5).

Ülkemizde dünyaca bilinen ve tanınan peynirlerin yanı sıra yöreye özgü geleneksel tipte peynirler de

üretilmektedir. Bu peynir çeşitleri arasında yer alan Urfa, Civil, Mihaliç, Otlu peynirleri ve Kars kaşarı gerek yapım teknikleri gerekse görünüşleri itibarıyla birbirinden hayli farklılık gösteren peynir tipleridir.

Bu çalışmada Ülkemiz piyasasında satışa sunulan geleneksel peynir çeşitlerimizden olan Urfa, Civil, Otlu peynir, Mihaliç, ve Kars kaşarı gibi peynirlerden alınan numunelerde aflatoksin saptanmasına yönelik analizler yapılarak halk sağlığı açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kimyasal madde olarak metanol (Merck, HPLC Grade), asetonitril (Merck, HPLC Grade), KBr, (Merck), HNO₃ (%65 h/h, Merck), NaCl (yüksek saflıkta, Riedel), PBS tablet (Phosphate Buffered Saline), celite 545 (Merck), n-hegzan (Merck), immunoaffinite kolon (G1007 vicam), aflatoksin standardı çözeltisi; (Asetonitril içerisinde 10 µg/ml- Supelco) kullanılmıştır.

Numune Toplama

Ülkemiz piyasasında satışa sunulan Urfa (Urfa yöresi), Civil (Erzurum yöresi), Otlı (Van yöresi), Mihaliç (Balıkesir yöresi) peynirleri ile Kars kaşarından (Kars yöresi) numuneler alınmıştır. Her bir peynir adı geçen bölgeden, bölge koşullarında (satışa sunulan ortam sıcaklıklarında 5 ± 2 °C) ve yerinde yaklaşık olarak 500 g olacak şekilde toplanmıştır. Saydam poşet içerisindeki numuneler analize kadar -20 °C'de laboratuvar koşullarında (23 ± 2 °C) muhafaza edilmiştir. Numuneler 2008 yılının ilk altı aylık bölümü içerisinde toplanmış ve bu süreç içerisinde analizi yapılmıştır.

Aflatoksin analizinde numunelerin -20 °C'de analize kadar saklanması analiz doğruluğunu etkilemediği daha önceki çalışmalarda bildirmiştir. (5). Çalışmada her bir grupta 20 peynir numunesi olmak üzere toplam 100 numune toplanmıştır.

Numunelerin Hazırlanması

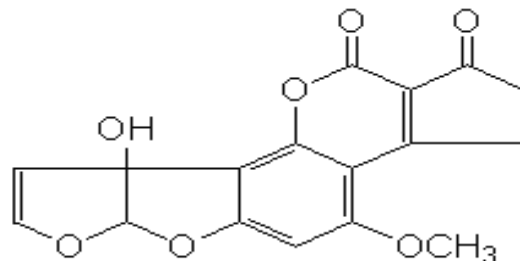
Her bir peynir numunesinden 40 gr alınarak cam behere konulmuş ve üzerine 10 g celite 545, 2 ml doymuş NaCl ve 150 ml kloroform ilave edilerek hızlıca 3 dk elde karıştırılmıştır. Adi süzgeç kağıdı ve cam yünüden süzülen karışımın tamamı bir balona aktarılmıştır. 50 °C'da vakum altındaki kurutma işleminden sonra kalıntı 2 ml metanol ile çözdürülerek üzerine 100 ml PBS eklenip karıştırılmıştır. Ayırma hunisine aktarılan karışım 75 ml n-hegzan ile çalkalanıp faz ayırımı beklenmiştir. Berrak olması gereken alt fazın tamamı İmmunoaffinity Kolondan bir sn'de bir damla olacak şekilde geçirilmiştir. Kolondaki aflatoksin M_1 'in elüsyonu için 10 ml saf su iki kez daha sonra da hava 10 sn olacak şekilde geçirilmiştir. Elüat 1.250 µl asetonitril: metanol (3:2 h/h) ile alınarak üzerine 1.750 µl saf su eklenmiş ve viala aktarılarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

HPLC Sistemi

Aflatoksin konsantrasyonlarının saptanması, HPLC pompası (LC-10AT VP), kontrol (SCL-10A VP) veri alma kiti (Class-VP 5.03) ve otosampler (SIL-10AD VP)'den oluşan Shimadzu HPLC sistemi ile yapılmıştır. Analitik kolon olarak Phenomenex, Nucleosil, 100 A, C_{18} (4,6x250 mm, 5 µm) analitik kolon kullanılmıştır. Kromatografik ayırımı; bileşimi su:asetonitril (75:25 h/h) olan hareketli faz (1 ml/dk akış hızında, 40 °C) ile floresans dedektör kullanılarak $\lambda_{ex}=365$ nm ve $\lambda_{em}=435$ nm'de yapılmıştır.

Kalibrasyon Eğrisi ve Validasyon

Aflatoksinin HPLC ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve kalibrasyon eğrisinin saptanması için 10, 25, 50, 100 ng/ml derişim değerlerindeki aflatoksin çözeltileri asetonitril içerisinde hazırlandıktan sonra numunelerin hazırlanması bölümünde anlatıldığı gibi peynir numunelerine eklenerek ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen numune ekstraktı HPLC sistemine enjekte edilmiştir.



Aflatoksin M_1

Şekil 1. Aflatoksin M_1 'in kimyasal yapısı

Kalibrasyon eğrisi, her bir derişim değeri için elde edilen aflatoksin M_1 pik alanının (A), aflatoksin M_1 derişimi değerine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Uygulanan HPLC yöntemi 10-100

ng/ml aflatoksin M₁ derişimi aralığında doğrusaldır. Aflatoksin M₁ analizi için uygulanan HPLC-fluoresans dedektör yönteminde doğrusal aralık eğri denklemi $y = 40960x - 14026$; $r^2 = 0.9991$ (n=4) olarak saptanmıştır (Şekil 2).

Aflatoksinin HPLC ile analizi yönteminin mutlak geri kazanımı aflatoksin içermeyen peynire eklenmiş ve ekstraksiyon işlemi uygulanan 100 ng/ml derişimlerdeki aflatoksine ait alan değeri ile asetonitrilde aynı derişimlerde hazırlanan çözeltilerdeki aflatoksin alan değerinin oranının karşılaştırılmasıyla hesaplanmıştır. Geri kazanım %85 (n=4) olarak saptanmıştır. LOD değeri S/N oranının 3 olduğu değer olarak 2 ng/ml ve LOQ değeri de 6 ng/ml olarak saptanmıştır.

BULGULAR

Yapılan çalışmada numuneler Urfa, Civil, Mihaliç, Otlu peynirleri ve Kars kaşarından yöresel bölgelerinde ve her bir grup için 20 farklı numune olacak şekilde toplanmıştır.

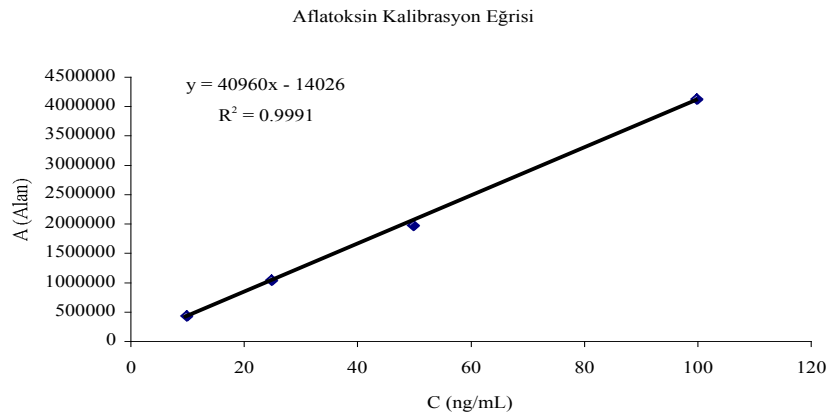
Çalışmamızda her numuneden yaklaşık 500 g olacak şekilde alınarak toplam 100 peynir numunesi incelenmiştir. Farklı yörelerden toplanan peynir

numunesi gruplarından sadece Urfa peynirlerinde gıda tebliğinde belirtilen konsantrasyon değerinin altında aflatoksin M₁ saptanmıştır (Tablo 1).

Aflatoksin M₁ standardı yanısıra Aflatoksin M₁ içeren ve içermeyen peynir numunelerine ait kromatogramlar Şekil 3-5'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Aflatoksin M₁ saptanan Urfa peynir numuneleri ve derişim değerleri

| Urfa Peynir Örnekleri No | Tespit Edilen Derişim (µg/kg) |
|--------------------------|-------------------------------|
| 1 | 0,0348 |
| 2 | 0,0303 |
| 3 | 0,0315 |
| 6 | 0,0396 |
| 10 | 0,0349 |
| 12 | 0,0304 |
| 14 | 0,0346 |
| 15 | 0,0348 |
| 17 | 0,0387 |
| 20 | 0,0493 |
| Ortalama | 0,036011 |

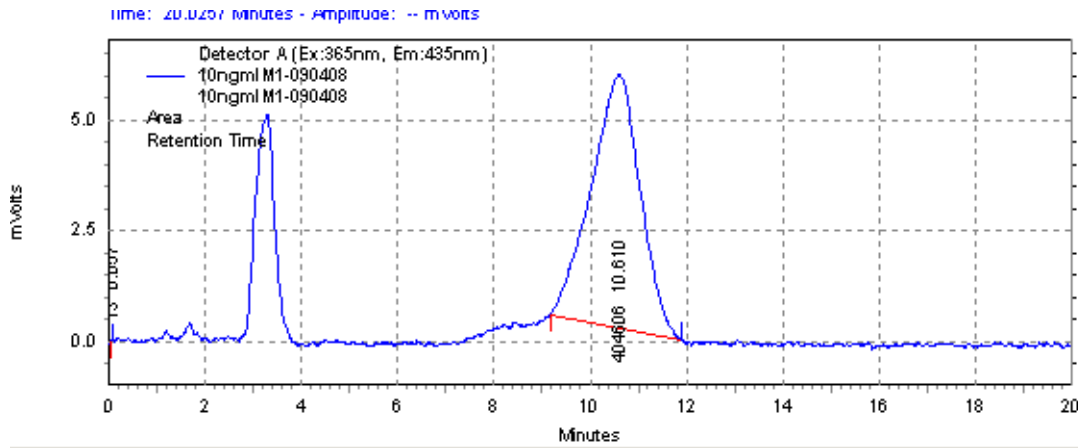


Şekil 2. Aflatoksin M₁ kalibrasyon eğrisi ve regresyon eşitliği

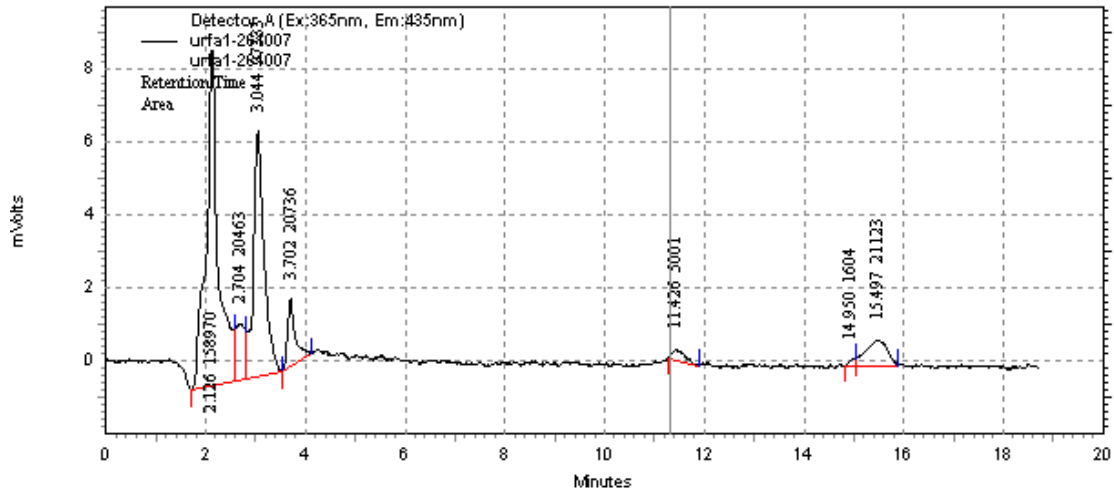
TARTIŞMA

Aflatoxin öncelikle *A. flavus*'un bazı suşları ve *A. parasiticus*'un tüm suşları tarafından üretilmektedir. Başlıca dört adet aflatoxin tipi vardır: B₁, B₂, G₁, G₂. B₁ ve B₂ aflatoxinleri UV ışığı altında mavi floresans vermelerinden, G₁ ve G₂ aflatoxinleri ise yine UV ışığı altında sarı-yeşil floresans vermelerinden dolayı, farklı yapılara sahiptir. Buna ek olarak, iki metabolik ürün olan aflatoxin M₁ ve M₂ de gıda ve yemlerin doğrudan

kontamine olduklarının göstergesidir. M₁ ve M₂ aflatoxinleri B₁ ve B₂ aflatoxinlerinin hidrosillenmesi sonucu oluşan metabolit ürünleridir. Aflatoxin M₁ ve M₂ küfle kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanların karaciğerinde oluşur ve süt salgısıyla birlikte salgılanır. Bu aflatoxinler ilk kez aflatoxinli yemlerle beslenen hayvanların sütlerinden izole edilmişlerdir ve bundan dolayı M olarak gösterilmişlerdir. Süt ineklerinde yem ile alınan aflatoxin B₁'in %1-3'ü kadar bir miktarın M₁ olarak süttten izole edilebileceği bildirilmiştir



Şekil 3. Aflatoxin M₁ (10 ng/ml) standardına ait kromatogram



Şekil 4. Aflatoxin M₁ saptanmış peynir numunesi kromatogramı (0.0348 µg/kg)

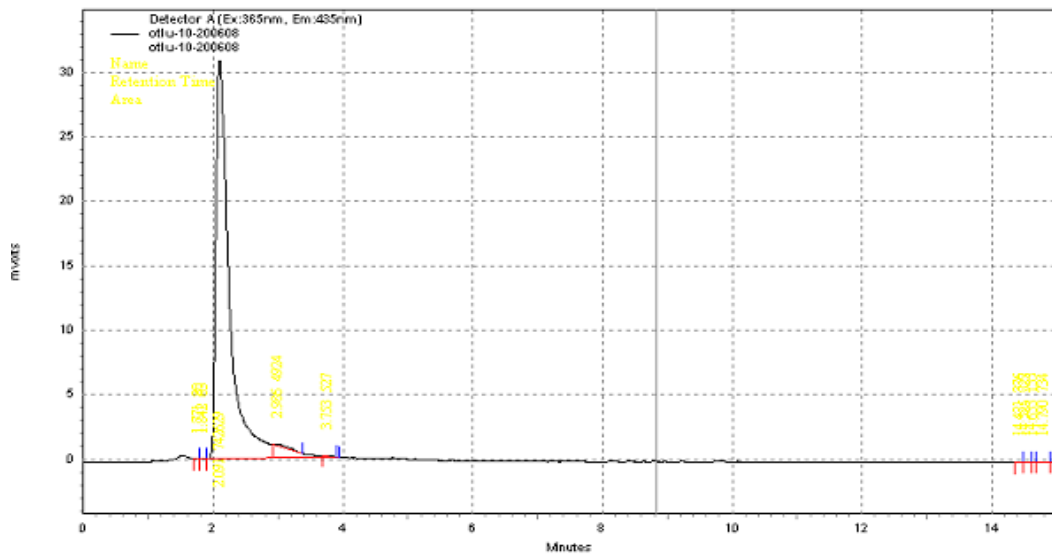
(Şekil 1). Hem kanser hem de gen yapısını değiştirebilen en etkili olan aflatoksin B₁'dir ve LD₅₀ değeri 0.3-9 mg/kg'dır (1-5).

Son derece kanserojen bir madde olan aflatoksin miktarının gıda maddelerinde kontrolü, izlenmesi ve korunması halk sağlığı açısından çok önemlidir. Aflatoksinin vücutta etkilediği organların başında karaciğer gelmekte ve bu yüzden toksin, hepatoksin olarak sınıflandırılmaktadır. Aflatoksin oluşturan küllere genelde 24-30 °C sıcaklıkta, nem miktarı %9-14 veya daha yüksek olan hemen her çeşit gıda maddesinde rastlanmaktadır. Aflatoksinler akut etkiler oluşturabildikleri gibi uzun süre küflü besinlerin tüketilmesi sonucu sinsi bir şekilde de ortaya çıkabilmektedirler. Aflatoksin oluşturan ürünlerden bazıları şunlardır: Bazı hayvansal ürünler (süt, peynir, yumurta, sakatat), yağlı tohumlar (pamuk tohumu), sert kabuklu yağlı-kuru meyveler (fındık, yer fıstığı, antep fıstığı), bazı kuru meyveler (kuru incir, kuru üzüm), baharatlar (kırmızı biber, karabiber, hindistan cevizi). (6-9).

Çalışmamızda numune çeşitliliği ve her gruptaki numune sayısı geniş tutularak tarama özelliği göstermesine dikkat edilmiştir. Peynir numuneleri gereç ve yöntem bölümünde bahsedilen ekstraksiyon yöntemi ile analize hazırlanmış olup, ekstraksiyonu yapılan numuneler AOAC'nin standart metodu ile ters faz sıvı kromatografisinde analiz edilmiştir (10).

Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt için aflatoksin M₁ üst sınır değeri 0,05 µg/kg olarak kabul edilmektedir (11).

Tablo 1'de aflatoksin saptanan Urfa peyniri grubunda bulunan 20 peynir numunesinden 10 tanesindeki aflatoksin M₁ derişim değerleri toplanan örnek numaralarına göre verilmiştir. Saptanan değerlerden hiçbiri Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ (11)'de verilen üst sınır değerini aşmamıştır. Bu anlamda çalışılmış olan peynir örneklerinin tamamındaki aflatoksin M₁ miktarı halk sağlığı açısından istenilen



Şekil 5. Aflatoksin M₁ içermeyen peynir numunesi kromatogramı

özelliğinde bulunmuştur. Kireççi ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada Türkiye'de incelenen toplam 80 süt ve peynir örneğinin 68 (%85)'inde aflatoksin M₁ saptanmış, 30 (%37,5) örnekte ise aflatoksin M₁ miktarının Türk Gıda Kodeksi'ne göre kabul edilebilir sınırların üzerinde olduğu belirlenmiştir (12). Bu çalışmada ise yalnızca Urfa Yöresi peynirlerinde aflatoksin bulunmuş, bulunan aflatoksin M₁ değerleri de kabul edilebilir sınır değerinin altında saptanmıştır. Bu farklılıklar toplanan peynirlerin

çeşidine, toplanma zamanına ve yöntemine göre değişiklik gösterebilir.

Sonuç olarak süt ve süt ürünlerinde aflatoksin değerlerinin izlenmesi ve bu konuda daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir. Üreticilerin üretim süreçlerinde aflatoksin oluşumunu nasıl engelleyebilecekleri, tüketicilerin ise tükettikleri gıdalarda aflatoksin bulunması halinde ne gibi zararlı etkilere maruz kalacakları hususunda bilgilendirilmeleri önerilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, BAB projesi olarak desteklenmiştir. Çalışma 4. Uluslararası Gıda ve Beslenme Kongresi ile 3. SAFE Consortium Uluslararası Gıda Güvenliği Kongresinde poster olarak sunulmuştur. Çalışmada adı geçenler Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'na çalışmaya verilen destek için sonsuz teşekkür etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Erdoğan A. The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. *Chemosphere*, 2004; 56(4): 321-5.
2. Fazekas B, Tarakovacs M. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Addit. Contam.*, 2005; 22(9): 856-63.
3. Sengun IY, Yaman DB, Gonul SA. Mycotoxins and mould contamination in cheese, *World Mycotoxin Journal*, 2008; 1(3): 291-8.
4. Rahmani A, Jinap S, Soleimany F. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins, *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 2009; 8: 202-51.
5. Karapınar M. Mikotoksinler, *EÜ Gıda Fak Derg.*, 1981; 2:157-70.
6. Mendonça C, Venâncio A. Fate of aflatoxin M₁ in cheese whey processing, *Journal of the science of food and agriculture*. 2005; 85(12): 2067-70.
7. Karapınar M. Gıdalarda küf bozulmaları, *EÜ Mühendislik Derg.*, Seri B Gıda Mühendisliği, 1984; Cilt 2, sayı 1, s. 81-94.
8. Şanlı Y, Kaya S, Piriñçi İ, Yavuz H, Baydan E, Demet Ö, Bilgili A. Veteriner Klinik Toksikoloji. Ankara: Medisan Yayınevi, 1995; 1-488.
9. Stroka J, Anklam E, Joerissen U, Gilbert J. Determination of aflatoxin B₁ in baby food (infant formula) by Immunoaffinity column cleanup liquid chromatography with postcolumn bromination: Collaborative study, *J. AOAC International*, 2001; 84(4): 1116-23.

10. AOAC Oficial Method 980.21. Aflatoxin M₁ in milk cheese, thin-layer chromatographic method. 17th ed. USA: AOAC International Gaithersburg, Maryland 20877-2417, 2000.
11. 2009/22 No'lu Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ-Ek 2. Ankara: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2009.
12. Kireççi E, Savaşçı M, Ayyıldız A. Sankamış'ta tüketilen süt ve peynir ürünlerinde aflatoksin M₁ varlığının belirlenmesi, İnfeksiyon Derg, 2007; 21(2): 93-6.