



doi: 10.33188/vetheder.1037994

Araştırma Makalesi / Research Article

## Denizli ilinde üretilen kekiklerde (*Origanum onites*) pirolizidin alkaloidlerinin LC-MS Q-TOF yöntemi ile belirlenmesi

Seda Dicle KORKMAZ<sup>1,a\*</sup>, Özlem KÜPLÜLÜ<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Giresun Üniversitesi, Espiye Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Giresun, Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Ankara, Türkiye

ORCID: 0000-0002-4272-300x<sup>a</sup>; 0000-0002-9724-7450<sup>b</sup>

### MAKALEBİLGİSİ /

#### ARTICLE INFORMATION:

##### Geliş / Received:

17 Aralık 21

17 December 21

##### Revizyon/Revised:

31 Mart 22

31 March 22

##### Kabul / Accepted:

18 Nisan 22

18 April 22

##### Anahtar Sözcükler:

Denizli

Kekik

LC-MS Q-TOF

Pirolizidin alkaloidleri

##### Keywords:

Denizli

LC-MS Q-TOF

Oregano

Pirolizidine alkaloids

### ÖZET:

Belirli bitki türlerinde bulunan Pirolizidin alkaloidleri (PA), özellikle üretim alanlarında kontaminasyon oluşturarak gıdaların tüketimiyle halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. PA'lar, intoksikasyonlara duyarlılıklarından dolayı başta bebek ve çocuklar olmak üzere tüm yaş gruplarında hepatotoksik, pnömotoksik, genotoksik, mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkilidir. Çalışmada, Türkiye'nin kekik ihracaatında önemli payı olan Denizli'de yetiştirilen kekiklerde (*Origanum onites*) PA ve N-oksit (PANO) bileşiklerinin varlığının ve düzeyinin LC-MS Q-TOF ile araştırılarak potansiyel halk sağlığı risklerinin belirlenmesi amaçlandı. Denizli'de kekik üretimi yapan farklı işletmelerden alınan işlenmiş, paketlenmiş 3 kekik örneği ile Denizli ilinin farklı bölgelerine ait işlenmemiş 8 kekik örneği olmak üzere toplam 11 örnek materyal olarak kullanıldı. Örneklerde PA ve PANO bileşiklerinin tanımlanması ve miktarlandırılması LC-MS Q-TOF ile yapıldı. Analize alınan örneklerden işlenmiş bir örnekte, europine ve europine N-oksit toplam 280 ±22 µg/kg tayin edildi. Analiz sonuçlarına göre; kekik örneklerindeki PA değeri, 2020/2040/AB sayılı regülasyonda belirtilen PA limit değerin (1000 µg/kg) altında saptandı. Örneklerin, PA yönüyle halk sağlığı açısından risk oluşturmadığı belirlendi. Ancak europin saptanan işlenmiş ve paketlenmiş örnek ile aynı bölgeden alınan bütünlüğü bozulmamış kekik örneklerinde PA'ya rastlanmamış olması kekiğin işlenme aşamasında iz miktarda da olsa yabancı ot ve tohum parçalarından kaynaklanan kontaminasyonunu işaret etmektedir. Çalışma, alkaloid kontaminasyonunu önlemek amacıyla kekik üretiminde işlenme sürecinin önemini ve ürünün yabancı otlardan arındırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Bitki kaynaklı gıdalar için PA sınır değerlerinin 2020/2040/AB sayılı Komisyon Tüzüğü'nde belirtildiği, 2022 yılında yapılacak düzenlemelerle kekik için bu değerin 1000µg/kg olacağı bildirilmektedir. Çalışmanın Türk Gıda Kodeksi kapsamında PA düzenlemelerine zemin oluşturacağı öngörülmektedir.

### Determination of pyrrolizidine alkaloids in oregano (*Origanum onites*) produced in Denizli by LC-MS Q-TOF method

#### ABSTRACT:

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in certain plant species create contamination, especially in production areas, and pose a risk to public health with the consumption of foods. Due to their sensitivity to intoxications, it has hepatotoxic, pneumotoxic, genotoxic, mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects in all age groups, especially in infants and children. In this study, the presence and level of PAs and N-oxide compounds in oregano grown in Denizli, which has an important share in Turkey's oregano export, were investigated by LC-MS Q-TOF to determine potential public health risks. In the study, a total of 3 processed and packaged oregano samples taken from different enterprises producing oregano in Denizli and 8 unprocessed (stem) oregano samples from different regions of Denizli (11 samples) were used as material. Identification and quantification of PAs and PANOs compounds in the samples were done by LC-MS Q-TOF. A total of 280 ±22 µg/kg of europine and europine N-oxide were determined in a processed packaged sample from the analyzed samples. According to the analysis results; PA value in oregano samples was determined below the PA limit value (<1000 µg/kg) specified in the regulation no 2020/2040/EU. It was determined that the samples did not pose a risk to public health in terms of PAs. However, the fact that no PAs was found in the processed and packaged sample in which europin was detected and in the intact oregano samples taken from the same region indicates PAs contamination caused by weed and seed pieces, albeit in trace amounts, during the processing of oregano. It is reported that the PAs limit value for plant-derived foods are specified in the Commission Regulation No 2020/2040/EU, and this value going to be 1000 µg/kg for oregano with the regulations to be made in 2022. It is thought that this study will lay the ground work for PAs regulations within the scope of the Turkish Food Codex.

**How to cite this article:** Korkmaz SD, Küplülü Ö. Denizli ilinde üretilen kekiklerde (*Origanum onites*) pirolizidin alkaloidlerinin LC-MS Q-TOF yöntemi ile belirlenmesi. Vet Hekim Der Derg 2022;93(2): 115-123 DOI: 10.33188/vetheder.1037994

## 1.Giriş

Pirolizidin alkaloidleri (PA) ve N-oksitleri (PANO) dünyada 6000'den fazla bitki türünde bulunan en yaygın toksik ikincil bitki metabolitleridir. Bitki orijinli komponentlerin en hepatotoksik gruplarından biri olarak hepatotoksik PA olarak tanımlanmaktadır. PA/PANO içeren bitkiler, gıda ve yemlerle onlarca yıldır kaydedilen insan ve hayvan intoksikasyonuna nedendir (1,2). Dünyada çiçekli bitkilerin % 3'ünde bulunan PA ve PANO'lar, sıklıkla *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Fabaceae* ve *Orchidaceae* familyalarından tanımlanmaktadır (3). Belirli bitki türlerinde bulunan PA'lar, özellikle üretim alanlarında kontaminasyon oluşturarak gıdaların tüketimiyle halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Başta bitkisel kaynaklı gıdalar olmak üzere tahıllar, bitki çayları, bal, polen ve diğer arı ürünleri, süt, yumurta vb. gibi bir çok gıdada bulunabilmektedir (4,5).

PA, biyogenetik ve biyokimyasal olarak senekionin, monokrotalin, lycopsamin, triangularin, phalaenopsin olmak üzere beş farklı yapısal tipte sınıflandırılıp PA'ların çoğunluğu senecionin ve lycopsamin yapısına sahiptir. Bu yapısal tipteki PA'ların ortak özelliği, necine tabanının 1,2-doymamış retronecine tarafından oluşturulması ve bitkilerde ilgili N-oksit formunda bulunmasıdır. *Asteraceae*, *Boraginaceae* ve *Fabaceae* familyalarında bulunan PA'lar için en başta sentezlenen alkaloidlerin çoğunlukla ilgili N-oksitlerine dönüştüğü bildirilmektedir (2,6,7). PA metabolizmasında, öncelikle pirolizidin ester oluşumu ardından sırasıyla esterlerin hidrolizi ve N-oksit oluşumu gerçekleşmektedir. Dihidropirolizidin ester metabolitleri üretildikleri yerlerde; karaciğer sinüzoidlerinde endotelial hücrelerde, akciğerlere taşınarak arter ve alveolar kapıllarda hasar oluşturmaktadır. Karaciğer ve akciğerde damar duvar kalınlaşmaları, tıkanıklıklara bağlı olarak kan akışının etkilendiği, karaciğer sirozu ve pulmoner arteriyel hipertansiyonlu sağ kalp yetmezliğinin de bunun bir sonucu olduğu bildirilmektedir (3,8). Dehidropirolizidin alkaloidlerinin hepatositlerdeki N-oksidasyonu suda çözünen N-oksitleri oluştururken, oral yolla alınan N-oksitler bağırsaklarda toksik serbest baz formuna indirgenmektedir. Bu yüzden kontamine gıdaların risk oluşturduğu belirtilmektedir (9,10). Deney hayvanları ve invitro sistemlerle yapılan çalışmalarla, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından lasiokarpin, monokrotalin ve ridellin insanlar için katagori 2B kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır (11). Tanımlanan 660 PA ve PANO'nun yarısı kadarının hepatotoksik, mutojenik, karsinojenik, teratojenik nadiren de pnömotoksik olduğu belirtilmektedir (12,13). PA'nin karaciğerde metabolik aktivasyonu sonucu oluşan dehidro-pirolizidin esterlerinin, protein ve DNA ile yan ürünleri oluşturması karsinojenik etkilere ana neden olarak bildirilmektedir. Bir çok PA metabolik oksidasyonu ile memeli hücrelerinde güçlü genotoksik etkili bileşikler oluşturmaktadır (14,15,16).

PA'lar, intoksikasyonlara duyarlılıklarından dolayı başta bebek ve çocuklar olmak üzere tüm yaş gruplarında hepatotoksik, pnömotoksik, genotoksik, mutojenik, teratojenik ve karsinojenik etkilidir. PA intoksikasyonu, maruz kalınan süre ve miktara bağlı olarak akut, sub-akut ve kronik olarak üç şekilde gerçekleşmektedir. Kontamine tahıl ürünleri, geleneksel tıpta kullanılan bitkiler yüksek mortalite ile seyreden akut zehirlenmelere neden olabilmektedir (13,17). PA, primer olarak karaciğer, akciğer ve kan damarlarında; sekonder olarak ise böbrek, gastrointestinal sistem, pankreas ve kemik iliğinde hasar oluşturmaktadır (18,19). Sub-akut zehirlenmelerde endotelial proliferasyon ile hepatic venlerin tıkanması sonucu hepatic sinüzoidal obstrüksiyon sendromu (VOD), hepatomegali, asites şekillenirken, ölüm karaciğer yetmezliği sonucu gerçekleşmektedir. PA'lara maruz kalan hayvanların et, süt, yumurtaları tüketildiğinde hepatic veno-oklüzif hastalık (HVOD) gelişebileceği bildirilmektedir (8,9,20). Türkiye'de gıdalarda PA kontaminasyonuna yönelik yasal bir düzenleme bulunmamaktadır. Avrupa'da ise içerisinde kurutulmuş kekiğin de bulunduğu bazı gıdalar için 2020/2040/AB sayılı Komisyon Tüzüğü'nde belirtilen PA sınır değerleri Tablo 1.'de verilmektedir. Buna göre 1 Temmuz 2022 tarihinde yapılacak regülasyonlarla kekikte PA sınır değerinin 1000 µg/kg olacağı bildirilmektedir (21).

**Tablo 1:** 2020/2040/AB sayılı Komisyon Tüzüğü'nde yer alan bitkisel kaynaklı gıdalarda PA sınır değerleri (21)  
**Table 1:** PA limit values for foods of plant origin included in the Commission Regulation No. 2020/2040/EU(21)

**COMMISSION REGULATION (EU) 2020/2040 of 11 December 2020**

ANNEX

In Section 8 of the Annex to Regulation (EC) No 1881/2006, the following entries are added:

"Foodstuffs (:)	Maximum level (g/kg)
8.4. Pyrrolizidine alkaloids	
8.4.1. Herbal infusions (dried product) with the exception of the herbal infusions referred to in 8.4.2, and 8.4.4.	200
8.4.2. Herbal infusions of rooibos, anise ( <i>Pimpinella anisum</i> ), lemon balm, chamomile, thyme, pep-permint, lemon verbena (dried product) and mixtures exclusively composed of these dried herbs with the exception of the herbal infusions referred to in 8.4.4.	400
8.4.3. Tea ( <i>Camellia sinensis</i> ) and flavoured tea ( <i>Camellia sinensis</i> ) (dried product) with the exception of the tea and flavoured tea referred to in 8.4.4.	150
8.4.4. Tea ( <i>Camellia sinensis</i> ), flavoured tea ( <i>Camellia sinensis</i> ) and herbal infusions for infants and young children (dried product)	75
8.4.5. Tea ( <i>Camellia sinensis</i> ), flavoured tea ( <i>Camellia sinensis</i> ) and herbal infusions for infants and young children (liquid)	1.0
8.4.6. Food supplements containing herbal ingredients including extracts with the exception of the food supplements referred to in 8.4.7.	400
8.4.7. Pollen based food supplements (1) Pollen and polen products	500
8.4.8. Borage leaves (fresh, frozen) placed on the market for the final consumer	750
8.4.9. Dried herbs with the exception of the dried herbs referred to in 8.4.10.	400
8.4.10. Borage, lovage, marjoram and <b>oregano (dried)</b> and mixtures exclusively composed of these dried herbs	1 000
8.4.11. Cuminseeds (seed spice)	400

Dünya kekik ticaretinin % 70'ini sağlayan Türkiye, 2021 yılı verilerine göre 23.959 ton kekik üretimiyle Dünya'da kekik üretimi ve ihracatında ilk sırada yer almaktadır (22). Tıbbi ve kokulu bitkiler içerisinde yer alan bilye kekik (*Organium onites*) baharat, bitki çayı ve yağ tüketimi yanı sıra gıdaların muhafazası (doğal antioksidan), organik tarım, ilaç ve kozmetik sanayi gibi pek çok alanda kullanımı nedeniyle önemli ihracat ürünlerinden biridir. Ülkemizde ihracat talebini karşılamak için özellikle Ege bölgesi'nde etkili kekik tarım alanları bulunmaktadır (23, 24). Türkiye'de toplam kekik üretim alanlarının % 93,79 oluşturan ve üretim miktarının % 89'unu tek başına sağlayan Denizli ili, özellikle İzmir kekiği-bilye kekik olarak bilinen *Organium onites*'in üretim merkezidir (22).

Kekik üretimi; kekik verimi ve kalitesini etkileyen bir çok sorunu da beraberinde getirmektedir. Bunların arasında en önemlilerinden biri, ürüne yabancı otların karışmasıdır. Yabancı otlar, içermiş oldukları alkaloid, glikozid, fenolikler gibi bileşenler ürünü kontamine ederek hem sağlık açısından risk oluşturup hem de ürün ihracatına ilişkin problem yaratmaktadır (24, 25).

**Tablo 2:** Türkiye’de kekik üretimi ve alanları (%), (22)**Table 2:** *Oregano production and fields in Turkey (%)*, (22)

Yıllar	Denizli		Manisa		Uşak		Diğer		Türkiye	
	Alan (da)	Üretim (ton)	Alan (da)	Üretim (ton)	Alan (da)	Üretim (ton)	Alan (da)	Üretim (ton)	Alan (da)	Üretim (ton)
2004-2008	91.36	79.38	3.39	11.30	0.52	0.56	4.73	8.76	100.00	100.00
2009-2013	92.52	86.23	2.01	5.55	0.90	1.56	4.58	6.65	100.00	100.00
2014-2018	92.48	86.47	1.83	5.20	1.36	2.13	4.33	6.20	100.00	100.00
2019	92.49	87.55	1.36	4.08	2.28	3.73	3.87	4.64	100.00	100.00
2020	93.79	89							100.00	100.00

Çalışmada, Türkiye’nin kekik ihracaatında önemli payı olan Denizli’de yetiştirilen kekiklerde (*Origanum onites*) PA ve PANO bileşiklerinin varlığının ve düzeyinin Sıvı Kromatografi Kuadropol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC-MS Q-TOF) ile araştırılarak potansiyel halk sağlığı risklerinin belirlenmesi amaçlandı.

## 2. Gereç ve Yöntem

Çalışmada Denizli ilinde kekik üretimi yapan farklı işletmelerden alınan işlenmiş (öğütülmüş), paketlenmiş 3 adet kekik örneği ile Denizli ilinin farklı bölgelerine ait (Güney, Akçapınar, Uzunpınar, Buldan, Gözler, Çal) işlenmemiş (bütünlüğü bozulmamış) 8 adet kekik örneği olmak üzere toplam 11 örnek materyal olarak kullanıldı. Bu kapsamda tüm kekik örneklerinde PA ve PANO’ların tanımlanması ve miktarlandırılması, LC-MS Q-TOF (Agilent 6550 iFunnel, USA) ile yapıldı.

### Alkoloid ekstraksiyonu:

Oregano örneklerinin ekstraksiyon aşamasında Tablo 4.’de verilen 28 PA ve PANO tayini için Alman Federal Risk Değerlendirme Enstitüsünün bitki numunelerinde LC-MS/MS ile pirolizidin alkoloidlerinin belirlenmesi (BfR-PA-Tea-2.0/2014) metodu uygulandı (26).

*Seyreltik sülfürik asit ile ekstraksiyon:* Örneklerden 2gr tartılıp 20 ml 0.05M sülfürik asit eklenerek 40 °C’deki su banyosunda 15 dakika bekletilip santrifüj işlemi (3800 g, 10 dk) uygulandı. Bu işlem aynı numune için 2 kere tekrarlanıp alınan süpernatantın pH’sı amonyak ile nötralize edildi.

*Katı faz ekstraksiyonu:* Alkoloid Ekstraksiyonu Katı Faz Uygulaması (SPE) ( Strata C18-E ) şartlama, örnek yükleme, yıkama, kurutma ve elüsyon aşamalarından oluşmaktadır. Kartuşlardan ilk adımda 5ml metanol ve 2. adımda 5ml saf su geçirilerek 10 ml örnek eklendi. Yıkama işlemi ultra saf su (2x5.0 ml) ile yapıldıktan sonra 10 dakika boyunca vakumla kurutma gerçekleştirildi. Elüsyon aşaması 2x5.0ml metanol ile yapıldı. Zenginleştirme (uçurma) işlemi kuruluğa kadar azot gazı altında Turbovap LV (Biotage, Sweden) cihazı ile gerçekleştirildi. Örnekler, 2ml su:metanol (4:1) ile çözüldü, 0.45µm filtreden geçirilerek vialle alındı.

### Analiz Aşaması:

Çalışmada, kütle spektrometrik saptama, MS ve MS/MS modunda elektrosprey iyon kaynağı kullanarak pozitif iyonlaşma modunda yapıldı. Thermo Scientific Hypersil-Gold (4,6x100mmx3µm) kolon ile kromatografik ayırım sağlandı. Cihaz şartlarına ait veriler Tablo 3.’de gösterilmektedir. 28 farklı PA ve PANO standartları, analit içermeyen matriks ekstraktları içerisinde 1, 2.5, 5, 25 ve 100 ng/ml olacak şekilde beş farklı konsantrasyonda hazırlanarak LC-MS Q-TOF cihazına verildi (Tablo 4).

**Tablo 3:** Cihaz parametreleri (LC-MS Q-TOF)  
**Table 3:** Instrument parametres (LC-MS Q-TOF)

Cihaz şartları			
İyonlaşma modu:	ESI Pozitif	Kütle okuma aralığı:	40-1700 amu
Kurutucu gaz sıcaklığı:	200 °C	Referans iyonlar:	922.0098
Kurutucu gaz akış, N <sub>2</sub> :	14 L/dk	Skimmer voltaj:	65 V
Nebulizer:	40 psi	Hareketli faz:	5mM amonyum format + %0,1 (v/v) formik asit içeren su (A), metanol (B)
Sheath gaz sıcaklığı:	350 °C	Kolon:	Thermo Scientific Hypersil-Gold (4,6x100mmx3µm)
Sheat gaz akış, N <sub>2</sub> :	11 L/dk	Kolon fırın sıcaklığı:	30 °C
Kapiler voltaj:	1500 V	Enjeksiyon hacmi:	10 µl

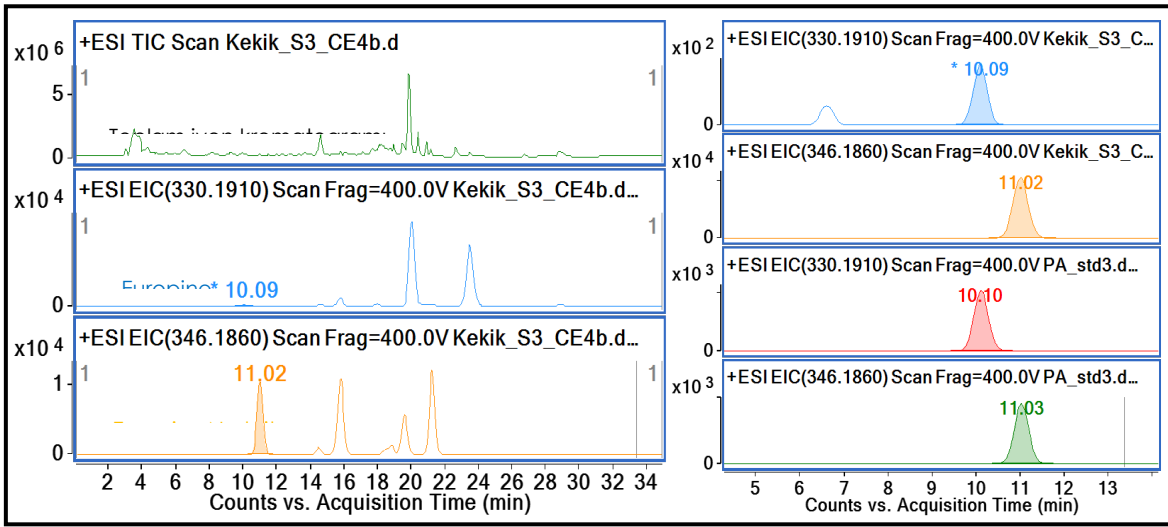
### 3. Bulgular

Analize alınan örneklerden işlenmiş paketlenmiş tek bir örnekte europin ve europin N-oksit miktarı toplam  $280 \pm 22$  µg/kg olarak tayin edildi. Tanımlama ve doğrulama aşamasında europine parçalanma iyonları ve RT değeri standart madde ile eşleşme yapıldı. Aynı ana iyon değerlerine sahip olan analitlerin girişimlerinin engellenmesi, maddelerin kromatografik olarak ayrımı ile sağlandı.

Kalibrasyon 1-100 ng/ml aralığında olmak üzere, her bir bileşik (Tablo 4) için 5 noktalı kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 2). LOQ değeri analitler için 1-5 µg/kg aralığında sağlandı.

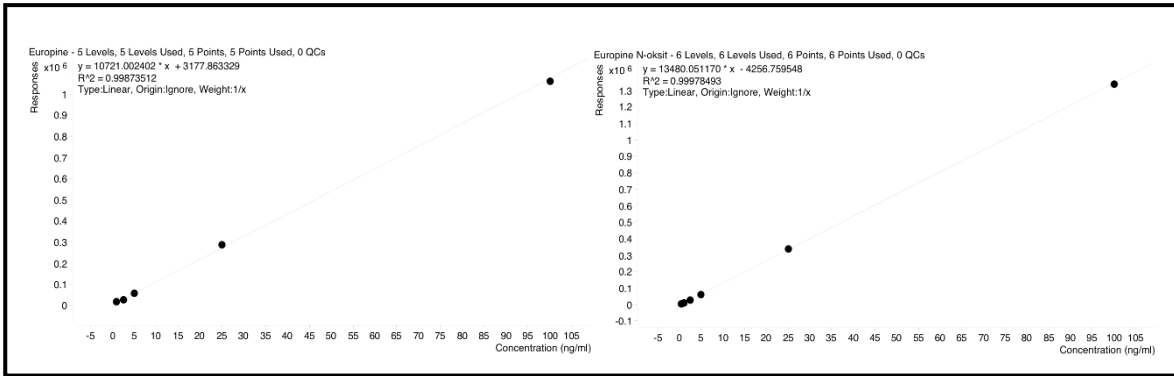
**Tablo 4:** Kekik örneklerinde analizi yapılan PA ve PANO standartlarına ait ana iyon değerleri  
**Table 4:** Precursor ion (M+H) values of PA and PANO standards

No	Bileşik	M+H iyonu	No	Bileşik	M+H iyonu
1	Intermediene	300.1800	15	Seneciphyline N-oksit	350.1605
2	Lycopsamine	300.1801	16	Senecivernine N-oksit	352.1750
3	Helliotrine	314.1963	17	Retrorsine	352.1756
4	Intermediene N-oksit	316.1755	18	Senecionine N-oksit	352.1757
5	Lycopsamine N-oksit	316.1756	19	Jajobine	352.1762
6	Monocrotaline	326.1598	20	Trichodesmine	354.1906
7	Europine	330.1913	21	Erucifiline N-oksit	366.1548
8	Helliotrine N-oksit	330.1914	22	Senkirkine	366.1912
9	Seneciphylline	334.1649	23	Retrorsine N-oksit	368.1703
10	Senecionine	336.1805	24	Jajobine N-oksit	368.1704
11	Senecivernine	336.1805	25	Echimidine	398.2167
12	Monocrotaline N-oksit	342.1547	26	Lasiocarpine	412.2330
13	Europine N-oksit	346.1860	27	Echimidine N-oksit	414.2122
14	Erucifoline	350.1592	28	Lasiocarpine N-oksit	428.2279



**Şekil 1:** Kekik örneği için ekstrakte edilmiş toplam iyon, ekstrakt edilmiş europine ve europin N-oksit iyon kromatogramları

**Figure 1:** Total ion, extraced ion chromatograms of europine and europin N-oxide for the oregano sample



**Şekil 2:** Europin ve europin N-oksit'e ait kalibrasyon eğrileri

**Figure 2:** Calibration curves for europine and europin N-oxide

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Analiz sonuçlarına göre; kekik örneklerindeki PA değeri, 2020/2040/AB sayılı regülasyonda belirtilen PA limit değerinin (1000 µg/kg) altında saptandı. Örneklerin tamamının PA yönüyle halk sağlığı açısından risk oluşturmadığı belirlendi. Ancak işlenmiş ve paketlenmiş örnekte PA saptanması yanısıra aynı bölgeden alınan bütünlüğü bozulmamış kekik örneklerinde PA'ya rastlanmamış olması kekikğin işlenme aşamasında iz miktarda da olsa yabancı ot ve tohum parçalarından kaynaklanan PA kontaminasyonunu işaret etmektedir.

Türkiye'de bazı bölgelere ait çeşitli bitkiler ve tohumlarında PA varlığına ilişkin çalışma bulunmasına (23,24,27) rağmen gıdalarda PA kontaminasyonuna ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak dünyada, bitki kökenli gıdalardan çay, infusion çay, baharat, bal, polen, gıda takviyeleri, süt vb. gibi bir çok gıdada PA tespitine ait bir çok çalışma mevcuttur.

Kaltner ve ark. (28), tarafından yapılan bir çalışmada 36 ülkeden içerisinde kekik, kimyon ve nanenin de bulunduğu 305 örnekte 44 PA/PANO varlığı araştırılmış, örneklerin % 58'inin en az bir PA içerdiği tespit edilmiştir. En

yüksek değer ise 24,6 mg/kg europin N-oksit içeren Türkiye'den bir kekik örneğine (*Oregano onites*) ait bulunmuştur. Bu değer, çalışmada bulunan europin N-oksit miktarının çok üzerinde olup yabani ot kaynaklı olduğu düşünülmektedir (28). Belçika'da yapılan bir başka çalışmada; salata bitkileri, baharat, çay, bitki çayları, buzlu içeceklerinde olduğu bir çok market ürününde 30 farklı PA araştırılmış en yüksek PA varlığına Akdeniz salata bitkilerinde ve baharatlarda rastlanmıştır. Ürünlere ait PA, LOD-187,151 µg/g aralığında bulunurken, 17 adet baharat örneğinin tamamının kontamine olduğu belirlenmiştir. Baharat karışımlarının % 85'inde, hasat sırasında ürüne yabani ot karışması ve tağşişe bağlı olduğu düşünülen *Heliotropium spp.* kaynaklı heliotrin tespit edilmiştir (29).

Izcara ve ark. (30), tarafından UHPL-MS/MS ile birleştirilmiş QuEChERS yöntemiyle 21 farklı PA'nın incelendiği bir çalışmada ise 23 oregano örneğinin tamamının ortalama 1254 µg/kg PA ile kontamine olduğu ve örneklerin % 30'unda sınır değeri (1000 µg/g) aştığı bildirilmektedir. Örneklerin tamamında saptanan europin, europin N-oksit miktarının çalışma bulgularından çok yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca, saptanan PA'ların geniş çeşitlilikte olması oregano örneklerinin, *Boraginaceae* ve *Asteraceae* familyalarından çok farklı yabani bitkilerle kontamine olduğunu işaret etmektedir. Genel olarak sonuçlarda, tüketiciler için potansiyel sağlık riskleri oluşturacak düzeyde PA saptanması, aromatik bitkilerin tamamında bu bileşiklerin varlığının izlenmesi ve ilgili önlemlerin alınması gerekliliğini vurgulamaktadır (29,30).

Çalışma, alkaloid kontaminasyonunu önlemek amacıyla kekik üretiminde işleme sürecinin önemini ve ürünün yabani otlardan arındırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. İçerisinde kurutulmuş kekiğin de bulunduğu bazı gıdalar için PA sınır değerinin 2020/2040/AB sayılı Komisyon Tüzüğü'nde belirtildiği, 2022'de yapılacak regülasyonlarla kekik için bu değer 1000µg/kg olacağı bildirilmektedir. Türkiye'de PA'nın gıdalarla alınmasına yönelik yasal bir düzenleme bulunmamaktadır. Dünya kekik ihracaatında önemli bir paya sahip Türkiye'de üretime ilişkin tarım alanlarında ıslah çalışmaları, yabani otlarla mücadele yapılarak ürün işleme öncesi (patoz) ve sırasında gerekli önlemlerin alınarak denetimlerin yapılması gereklidir. Böylece iyi tarım uygulamalarıyla kekik üretiminde PA kontaminasyonunun önlenmesi mümkün olacaktır. Çalışmanın devamı niteliğinde bölgeden temin edilecek kekik örneği sayısı artırılarak olası PA kontaminasyonu riskinin belirlenmesi hedeflenmektedir. Elde edilen bulgular doğrultusunda Türk Gıda Kodeksi kapsamında PA düzenlemelerine zemin oluşturacağı düşünülmektedir.

### **Çıkar Çatışması Beyanı**

Yazarların çalışma kapsamında herhangi bir kişisel ve finansal çıkar çatışması bulunmamaktadır.

### **Finansal Kaynak Beyanı**

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

### **Yazar Katkısı Beyanı**

Fikir/kavram:Özlem KÜPLÜLÜ  
Deney Tasarımı: Özlem KÜPLÜLÜ, Seda Dicle KORKMAZ,  
Denetleme/Danışmanlık: Özlem KÜPLÜLÜ  
Veri Toplama: Seda Dicle KORKMAZ  
Veri analizi ve yorumu: Seda Dicle KORKMAZ, Özlem KÜPLÜLÜ  
Kaynak taraması:Seda Dicle KORKMAZ  
Makalenin yazımı: Seda Dicle KORKMAZ  
Eleştirel inceleme: Özlem KÜPLÜLÜ

### **Etik Onay**

Bu makaledeki sunulan verilerin, bilgilerin ve dokümanların akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edildiği, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçlarının bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunulduğuna dair yazarlardan etik beyan alınmıştır.

## Kaynaklar

1. Kaltner F, Rychlik M, Gareis M, Gottschalk C. Influence of Storage on the Stability of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Peppermint Tea, Hay, and Honey. *J Agric Food Chem* 2018; 66(20):5221-5228.
2. Ozansoy G, Küplülü Ö. Importance of Pyrrolizidine Alkaloids in Bee Products. *Mellifera* 2017; 17(1): 1-8.
3. Scharmm S, Köhler N, Rozhon W. Pyrrolizidine alkaloids: biosynthesis, biological activities and occurrence in crop plants. *Molecules* 2019;24:498.
4. Chen L, Mulder PPJ, Louisse J, Peijnenburg A, Wesseling S, Rietjens IMCM. Risk assesment for pyrrolizidine alkaloids detected in (herbal) teas and plant food supplements. *Regul Toxicol Pharmacol* 2017; 86, 292-302.
5. European Food Safety Authority (2011). Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA J*. 2011; 9:1–134.
6. Boppre, M. The ecological context of pyrrolizidine alkaloids in food, feed and forage: an overview. *Food Addit Contam Part A* 2011;28(3):260-281.
7. Kempf M, Wittig M, Schönfeld K, Cramer L, Schreier P, Beuerle T. Pyrrolizidine alkaloids in food: downstream contamination in the food chain caused by honey and pollen. *Food Addit Contam Part A* 2011;28(3): 325-331.
8. Wiedenfeld H. Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids—a Serious Health Problem. *J Marmara Univ Inst Health Sci* 2011; 1(2):79-87.
9. Edgar JA, Colegate SM, Boppre M., Molyneux RJ. Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences. *Food Addit Contam Part A* 2011;28(3):308-324.
10. Fu PP, Xia Q, Lin G., Chou, MW. Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metabol Rev* 2004;36(1):1-55.
11. Dusemund B, Nowak N, Sommerfeld C, Lindtner O, Schäfer B, Lampen A. Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin. *Food Chem Toxicol* 2018; 115:63,72
12. Mudge, EM, Maxwell PJ, Paula NB. Quantification of pyrrolizidine alkaloids in North American plants and honey by LC-MS:Single laboratory validation. *Food Addit Contam Part A* 2015;32(12): 2068-2074.
13. Molyneux RJ, Gardner, DL, Colegate, SM, Edgar, JA. Pyrrolizidine alkaloid toxicity in livestock: a paradigm for human poisoning. *Food Addit Contam: Part A* 2011;28(3):293-307.
14. Chen Z, Huo JR. Hepatic veno-occlusive disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations. *Neth J Med* 2010;68(6):252-260.
15. Schrenk D, Gao L, Lin G, Mahony C, Mulder PPJ, Peijnenburg A, Pfuhler S, Rietjens IMCM, Rutz L, Steinhoff B, These A. Pyrrolizidine alkaloids in food and phytomedicine: Occurence, exposure, toxicity, mechanisms and risk assesment- A review. *Food Chem Toxicol* 2020;136:111107.
16. Than KA, Stevens V, Knill A, Gallagher PF, Gaul KL, Edgar JA. Plant-associated toxins in animal feed: screening and confirmation assay development. *Anim Feed Sci Tech* 2005;121:5-21.
17. Crews C, Berthiller F, Krska R. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Anal Bioanal Chem* 2010; 396 (1):327-338.
18. Kempf M, Reinhard A, Beuerle T. Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required. *Mol Nutr Food Res* 2010;54(1):158-168.
19. Wiedenfeld, H, Edgar, J. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochem Rev* 2011;10(1): 137-151.
20. Nemli Y, Kaynar A, Kayadan A, Er T, Kaya İ. *Cuscuta campestris* 'in Pyrrolizidine Alkaloid içeriğine ilişkin ilk kanıt. *Turk J Weed Sci* 2015;18(2):23-25.
21. European Union (2020). Commission Regulation (EU) 2020/2040 of 11 December 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of pyrrolizidine alkaloids in certain foodstuffs. *Off J Eur Union L*. 420:1–5. [accessed 2021 Jun 18]. Available from: URL:<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32020R2040>
22. TÜİK (2021): Bitkisel Üretim İstatistikleri, Erişim: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale =tr>, Erişim tarihi:4.9.2021
23. Karlı B, Demir Z, Dalgıç A. Denizli ilinde kekik üretimi yapan işletmelerin sosyo-ekonomik yapısı ve sorunları. *Isparta Uyg Bilim Ziraat Fak Derg* 2020;15(2):151-160.
24. Sokat Y. Kekik üretim alanlarında görülen bazı zararlı yabancı ot türleri. *Bahri Dağtaş Bitkisel Araştırma Dergisi* 2020;9(1):29-42.
25. Muca B, Yıldırım B, Özçelik Ş, Koca A. Isparta's (Turkey) pisonous plants of public access places. *Biological Diversity and Conversation* 2012;5(1):23-30.



26. BfR (Federal Institute for Risk Assessment) (2016): Opinion No. 030/2016: *Pyrrrolidine Alkaloids: Level in Food should Continue to be Kept as Low as Possible*; BfR: Berlin, Germany, Available from: URL:<https://www.bfr.bund.de/cm/349/pyrrolizidine-alkaloids-levels-in-foods-should-continue-to-be-kept-as-low-as-possible.pdf>
27. Tosun F, Tamer U. Determination of Pas in the Seeds of *Heliotropium Europaeum* by GC/MS. J Fac Pharm Ankara 2004;33 (1): 7,9.
28. Kaltner F, Rychlik M, Gareis M, Gottschalk C. Occurrence and Risk Assessment of Pyrrolizidine Alkaloids in Spices and Culinary Herbs from Various Geographical Origins. Toxins 2020;12(3):155.
29. Picron J-F, Herman M, Hoeck EV, Gosciny S. Analytical strategies for the determination of pyrrolizidine alkaloids in plant based food and examination of the transfer rate during the infusion process. Food Chem 2018; 266:514-523.
30. Izcara S, Casado N, Zarcero SM, Sierra I. A Miniaturized QuEChERS Method Combined with Ultrahigh Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids in Oregano Samples. Foods 2020; 9(9):1319.