



Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi
(International Journal of Agriculture and Wildlife Science)



<http://dergipark.org.tr/ijaws>

Araştırma Makalesi

Buğday ve Çeltikte Okratoksin A'nın Kantitatif Olarak Tespiti ve Validasyon Çalışması

Fatma Hepsağ

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadiri Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Osmaniye

Geliş tarihi (Received): 13.02.2020

Kabul tarihi (Accepted): 03.06.2020

Anahtar kelimeler:

Kontaminasyon, maksimum limit, mikotoksin

***Sorumlu yazar**

fatmahepsag@osmaniye.edu.tr

Özet. Bu çalışmada, buğday ve çeltik Okratoksin A (OTA) varlığı yönünden değerlendirilmiştir. Buğday örnekleri Mersin, çeltik örnekleri ise Edirne ve Çanakkale illerindeki çiftçilerden temin edilmiştir. OTA yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tespit edilmiştir. Buğday örneklerinin 3'ünde (%15) OTA tespit edilmiştir. Konsantrasyon, <ölçüm limiti (LOQ)- 6.93 µg kg⁻¹ arasında değişmekte olup, pozitif numunelerin iki tanesi, doğrudan insan tüketimine zararlı olacağı tahmin edilen OTA için 5 µg kg⁻¹ maksimum limiti geçmiştir. Çeltik örneklerinin 2'sinde (%10) OTA tespit edilmiştir. Konsantrasyon, <LOQ-5.44 µg kg⁻¹ arasında değişmekte olup, pozitif numunelerin bir tanesi, doğrudan insan tüketimine zararlı olacağı tahmin edilen OTA için 5 µg kg⁻¹ maksimum limiti aşmıştır. Genel olarak elde edilen sonuçlar, Türk Gıda Kodeksi (TGK) ve Avrupa Birliği (AB) Maksimum Kalıntı Limitleri (MRL)'nin altında değerlerdir.

Quantitative Determination of Ochratoxin A in Wheat and Rice and Validation Study

Keywords:

Contamination, maximum limit, mycotoxin

Abstract. In this study, wheat and rice were evaluated for the presence of Ochratoxin A (OTA). Wheat samples were obtained from Mersin and rice samples were obtained from farmers in Edirne and Çanakkale. OTA was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) method. OTA was detected in 3 of the wheat samples (15%). The concentration ranged from <LOQ - 6.93 µg kg⁻¹, with two of the positive samples exceeding the maximum limit of 5 µg kg⁻¹ for OTA, which is predicted to be harmful to human consumption. OTA was detected in 2 (10%) of rice samples. The concentration ranged from <LOQ to 5.44 µg kg⁻¹, one of the positive samples exceeding the maximum limit of 5 µg kg⁻¹ for OTA, which is predicted to be harmful to direct human consumption. Generally, the results are below the Turkish Food Codex (TGK) and European Union (EU) Maximum Residual Limits (MRL).

GİRİŞ

Gıda kaynaklı patojenlerin yanı sıra, mikotoksinlerle kontaminasyon, tahıl ve tahıl ürünlerinin güvenliğini ve kalitesini etkileyen en ciddi problemlerdendir. En önemli grupları, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait olan küfler tarafından üretilen aflatoksin (AFS) ve okratoksin A'dır.

Buğday (*Triticum aestivum L.*), dünya çapında tüketilen başlıca tahıldır. Buğday ve buğdaydan türetilmiş ürünlerin tüketimi Avrupa'da (109 kg/kişi/yıl), İtalya'da (146 kg/kişi/yıl) (FAO/INFOODS, 2012), Türkiye'de ise 182 kg/kişi/yıl olarak (TÜİK, 2017) kaydedilmiştir. Buğday ekmek, makarna, kahvaltı gevrekleri, bisküviler, kekler ve hamur işleri olarak tüketilen, temel malzemesi nişasta olan iyi bir kompleks karbonhidrat kaynağıdır. Aynı zamanda bira ve diğer alkollü içeceklerin imalatında da kullanılır. Buğday ve tahıllar, hem tarlada hem de depolama sırasında mantar kontaminasyonuna genellikle hassastır, bu nedenle tahılların kirlenmesine neden olur. Dünyada üretilen gıdaların en az % 60'ının tahıl mahsullerinden kaynaklandığı göz önüne alındığında, mikotoksin sorunu bu nedenle oldukça önemlidir (De Koe ve Juodeikiene, 2012). OTA *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi mikotoksin üreten birkaç tür tarafından üretildiğinden sık sık yiyecek ve çeşitli içeceklerin tahıllar içeren, kahve, kakao, baharat, bira, şarap, üzüm suyu ve kuru meyveler gibi ürünlerde sıkça araştırılması gerekmektedir (EFSA, 2004). OTA, çeşitli hayvan ve insanlara karşı hepatotoksik, genotoksik, teratojenik ve immünotoksik özelliklere sahiptir (El Houry ve Atoui, 2010). Ayrıca, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) OTA'yı insan kaynaklı kanserojen olarak sınıflandırmıştır (Grup 2B) (IARC, 1993).

Penicillium verrucosum kontaminasyonu hasat işlemi sırasında ve kritik olarak kurutma ve depolama sırasında ortaya çıkmaktadır (Lund ve Frisvad, 2003). Mantar büyümesini ve mikotoksin oluşumunu etkileyen birçok faktör olmasına rağmen, iklimlendirmenin, mantar ve mikotoksin oluşumunda en önemli faktör olduğu bilinmektedir (Magan ve ark., 2003).

Asıl OTA kaynakları arasında tahıllar, baharatlar, kahve, çay, şarap ve bira bulunur, bu nedenle bu tahılların ve tahıllardan türetilmiş ürünlerin tüketilmesinden dolayı günlük olarak bu mikotoksin alımının % 50'sini temsil eder (Gareis, 2003). Tahıl bazlı gıda ürünlerinin tüketimi yoluyla tüketicileri OTA'ya maruz kalmaktan korumak için, bazı ülkeler çeşitli gıda maddelerinde maksimum seviyeler belirlemiştir. Özellikle, Avrupa Birliği, çığ tahıl taneleri için izin verilen azami $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, doğrudan insan tüketimine yönelik tüm türetilmiş tahıl bazlı ürünler için $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ve bebek gıdaları ve işlenmiş tahıl bazında $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ seviyelerini belirlemiştir (EC, 2006; EC, 2012).

Gıda güvenliği için OTA'nın hızlı bir şekilde tespiti önemlidir, bu nedenle hızlı OTA taraması için uygun analitik yöntemler geliştirmek için daha fazla çaba gösterilmiştir. OTA tespiti için enzime bağlı immüno sorbent deneyleri (ELISA) veya biyosensörler gibi çeşitli immüno kimyasal yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler basitlik, kullanımı kolay, nispeten hızlı ve kolay taşınabilirlik gibi genel özelliklere odaklanmıştır (Chauhan ve ark., 2016; Xu ve ark., 2016). Son zamanlarda, aptamerler gibi sentetik moleküller kullanan yenilikçi reseptörler, OTA biyosensörlerinin geliştirilmesinde (MIP) veya mimotoplar da kullanılmıştır (Ruscito ve ark., 2016). İnfrared spektroskopisi (IR), kızılötesi (NIR) ve orta kızılötesi (MIR) spektroskopisinin yanı sıra, tarımsal ürünlerde mantar kirliliğinin tespiti ve mikotoksinlerin tahmini için ümit verici araçlar olarak görülmektedir (Saccon ve ark., 2017; Levasseur-Garcia, 2018).

Türkiye'nin iklim şartları ochra-toksijenik küf oluşumuna elverişlidir ve bu nedenle mahsuller hem hasat öncesi hem de hasat sonrası aşamalarında OTA ile kontamine olabilirler. Buğday ve çeltik Türkiye'de temel bir gıda maddeleri olup OTA'nın kirlilik seviyesi ile ilgili veriler sınırlıdır. Bu çalışma, sonraki geniş çaptaki çalışmalara bir ön araştırma teşkil edecektir.

MATERYAL VE METOT

Araştırmada materyallerinden buğday, Mersin ili ve çevresinde buğday üretimi yapan 20 çiftçiden, çeltik ise Edirne ve Çanakkale illerindeki 20 çiftçiden kavuzlu olarak temin edilmiştir. Numunelerin analizleri yapıncaya kadar $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiştir. OTA kontaminasyonu AOAC Official Method 2000.03, 2005 ve Ochratest and Ochratest WB Instruction Manual, 2008 metodu kullanılarak izlenmiştir. Metodun uygulama aşamaları, numunenin hazırlanması, ekstraksiyon, ekstraktın temizlenmesi (IAK safhası), ekstraktta bulunan maddelerin ayrılması (HPLC'ye enjeksiyon), ayrılan maddelerin tanımlanması, sonucun değerlendirilmesi ve hesaplanması şeklinde yapılmıştır.

Standart Maddeler

Bu çalışmada kullanılan Okratoksin A standardı (Supelco), konsantrasyonu belli olan sertifikalı hazır standarttır. Hazır olarak alınan 6 ml 'lik $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ sertifikalı standarttan önce 50000 ppb ana stok, sonra 50 ppb ara stok ve sonra çalışma standartları hazırlanmıştır. 50000 ng ml^{-1} 'lik okratoksin A ana stok standarttan birinci düzey ara stok

500 ng ml⁻¹ olarak ve buradan da ikinci düzey ara stok 50 ng ml⁻¹'lik konsantrasyonda standart hazırlanmıştır. Birinci düzey 500 ppb'lik 25 ml ara stok hazırlamak için 50000 ppb'lik ana stok çözeltisinden 25 ml'lik balon jöjeye 250 µL alınıp ve metanol ile balon jöje hacmine tamamlanmıştır. İkinci Düzey 50 ppb'lik 10 ml ara stok hazırlamak için, birinci düzey 500 ppb'lik ara stok çözeltisinden 10 ml'lik balon jöjeye 1 ml alınıp ve metanol ile balon jöje hacmine tamamlanmıştır. Hazırlanan ikinci düzey ara stoktan 0.25 ng ml⁻¹'lik (ppb), 0.5 ng ml⁻¹'lik (ppb), 1 ng ml⁻¹'lik (ppb), 3 ng ml⁻¹'lik (ppb), 5 ng ml⁻¹'lik (ppb), 10 ng ml⁻¹'lik (ppb), 20 ng ml⁻¹'lik (ppb) gibi farklı konsantrasyondaki çalışma standartları hazırlanmıştır.

HPLC Şartları

HPLC'nin çalışma şartları aşağıda verilmiştir; Kromatografik analiz, bir LC-20ADpump, bir SIL-20AHT otomatik örnekleyici, bir DGU-20A3 çevrimiçi degazör ve CBM- ile donatılmış flüoresan dedektör (Shimadzu RF-20AXL) ile birleştirilmiş bir Shimadzu (Tokyo, Japonya) sıvı kromatografik sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toksinin saptanması, sırasıyla 360 ve 440 nm uyarma ve emisyon dalga boylarına sahip flüoresan ile gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 45 °C'ye, enjeksiyon hacmi 100 ml'ye ayarlanmıştır.

Kalibrasyon Grafiğinin Çizilmesi

Okratoksin A çalışma standart çözeltisi ilgili metotta bildirilen, HPLC şartlarında cihaza enjekte edilmiştir. Her bir çalışma standart konsantrasyonlarına karşılık gelen alıkonma süresine göre, piklerin integrasyonu yapılarak yedi noktadan oluşan bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

HPLC'de kullanılan metanol, asetronitril ve PBS (Phosphate Buffered Saline) HPLC saflığında Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), asetik asit HPLC saflığında Merck (Darmstadt, Almanya), Okratoksin A standardı (Supelco, Almanya), 18.2 MΩ dirençli ultra saf su, bir Milli-Q saflaştırma sistemi (Millipore, Molsheim, Fransa) temin edilmiştir.

Numunenin Hazırlanması ve Analizi

Buğday ve çeltik numuneleri, öğütüldükten sonra homojen hale getirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi için 50 g numune tartılıp, üzerine 100 ml asetronitril:su (60:40) çözeltisi ilave edilip, blenderda 1 dakika yüksek devirde karıştırılmıştır. Ekstrakt, katlı filtre kağıdından geçirilip, filtrat temiz bir mezürde toplanmıştır. Elde edilen karışım tekrar filtre kağıdı yardımıyla süzölmüştür. Ekstraktı seyreltmek için, süzöntüden 10 ml alınıp, üzerine 40 ml PBS ilave edilip karıştırılmıştır. Sonra karışım cam mikrofiber filtreden geçirilip, filtrat temiz bir mezürde toplanmıştır. Kolon kromatografisi aşaması için, bu karışımın 10 ml si, 1 damla sn⁻¹ lik akış hızıyla immunoaffinite kolondan geçirilip ardından sırasıyla 10 ml PBS ve 10 ml distile su immunoaffinite kolondan geçirilmiştir. İmmunoaffinite kolondan şırınga yardımıyla 1.5 ml metanol ve 1.5 ml su geçirilerek son temizleme işlemi yapıлып, elde edilen süzöntü vialer alınarak HPLC'ye enjeksiyon yapılmıştır. Süzöntü küçük vialer alınıp ve HPLC cihazına analiz yapmak üzere verilmiştir (HPLC'ye 100 µl enjekte ettirilmiştir). Sonuçta 1 g örnek 3 kat seyreltilmiş olur, burada seyreltme faktörü 3'dür. Cihaza seyreltme faktörü yazılıp, çıkan pikin integrasyonu alınarak sonuç ppb olarak hesaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) çalışması için kör örneğe 1 ppb düzeyinde Okratoksin A (OTA) standardı eklenerek 24 adet geri alma çalışması yapılmıştır. Tayin limiti ve ölçüm limiti 1 nolu formüle göre hesaplanmış olup Çizelge 1'de verilmiştir.

$$\text{Tayin Limiti} = 3 \times s, \text{ Ölçüm Limiti} = 10 \times s, \text{ s: Standart Sapma} \quad (1)$$

Çizelge 1. Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) çalışmalarına ait veriler.

Table 1. Data on the limit of determination (LOD) and measurement limit (LOQ).

Analiz No	OTA	Analiz No	OTA
1	0.837	13	0.96
2	0.863	14	0.962
3	0.865	15	0.99
4	0.866	16	0.992
5	0.869	17	0.996

Çizelge 1. Devam.

Table 1. Continue.

Analiz No	OTA	Analiz No	OTA
6	0.888	18	1.012
7	0.899	19	1.029
8	0.916	20	1.032
9			
10			
11			
12			
ORTALAMA		0.957	
s		0.074	
LOD (3*s)		0.222	
LOQ (10*s)		0.74	

Lineer Ölçüm Aralığı

Lineer ölçüm aralığını belirlemek amacıyla; Okratoksin A standartları 0.25 ppb, 0.75 ppb, 1.5 ppb, 3 ppb, 5 ppb, 10 ppb ve 20 ppb konsantrasyon düzeylerinde olmak üzere 7 farklı konsantrasyonda her biri 3'er defa hazırlanarak HPLC cihazına enjekte edilmiş ve kalibrasyon grafiği Şekil 1'deki gibi çizilmiştir. Okratoksin A için korelasyon katsayısı (r^2)= 0.9993

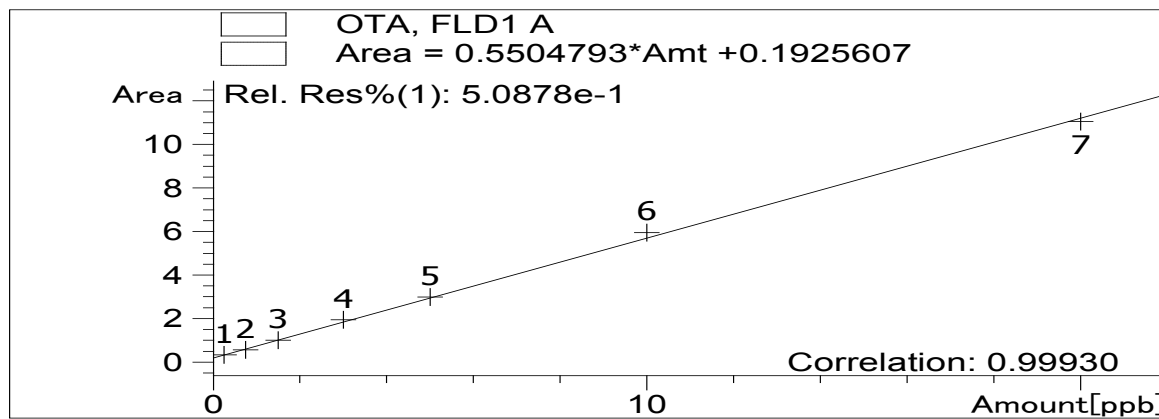
**Şekil 1.** HPLC cihazına ait kalibrasyon grafiği.

Figure 1. Calibration graph of the HPLC instrument.

Kesinlik**Tekrarlanabilirlik**

Farklı iki günde buğday ve çeltik örneklerinde 6'şar adet 1 ppb ve 5 ppb konsantrasyon düzeylerinde okratoksin A geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik limiti için, buğday ve çeltik örneklerinde I. ve II. günün verileri, ayrı ayrı 2 nolu formüle göre hesaplanmıştır:

$$r = 2.8 \times sr, \quad r: \text{Tekrarlanabilirlik limiti}, \quad sr: \text{Standart sapma} \quad (2)$$

Tekrarlanabilirlik çalışmalarından elde edilen veriler ve sonuçları Çizelge 2 ve Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 2. Okratoksin A için I. gün tekrarlanabilirlik verileri.

Table 2. Repeatability data first day for OTA.

Okratoksin A	Buğday		Çeltik	
	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb
Analiz No				
1	0.996	4.774	0.726	14.366
2	1.081	5.108	0.739	5.392
3	0.951	5.397	0.899	5.315
4	0.916	5.345	0.888	4.661
5	0.925	4.594	1.091	5.215
6	0.923	4.843	0.863	5.399
ORT	0.965	43.835	0.868	5.229
s	0.064	0.325	0.133	0.287
RSD	0.066	0.065	0.153	0.055

Çizelge 2. Devam

Table 2. Continue.

Okratoksin A	Buğday		Çeltik	
	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb
Analiz No				
%RSD	6.613	6.488	15.283	5.487
Horwitz	45.496	35.508	46.232	35.281
Tekrarlanabilirlik limiti	0.179	0.91	0.371	0.803

Çizelge 3. Okratoksin A için II. gün tekrarlanabilirlik verileri.

Table 3. Repeatability data second day for OTA.

Okratoksin A	Buğday		Çeltik	
	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb
Analiz No				
1	0.962	5.008	1.049	4.809
2	0.992	4.386	0.99	4.950
3	0.865	4.809	0.869	5.218
4	0.932	4.713	0.96	5.168
5	1.033	5.371	0.837	4.813
6	0.866	4.300	1.012	5.367
ORT	0.942	4.765	0.953	5.054
s	0.068	0.398	0.083	0.231
RSD	0.072	0.083	0.087	0.046
%RSD	7.200	8.347	8.734	4.570
Horwitz	45.666	35.778	45.585	35.461
Tekrarlanabilirlik limiti	0.19	1.114	0.233	0.647

Tekrar Üretilebilirlik

Buğday ve çeltik örneklerinde, I. ve II. gün tekrarlanabilirlik verileri, tekrar üretilebilirlik verisi olarak değerlendirilmiştir. Tekrar üretilebilirlik limiti (R); 3 nolu formüle göre hesaplanmıştır.

$$R = 2.8 \times sR \quad (3)$$

İki analistin 1 ppb ve 5 ppb konsantrasyon düzeylerindeki buğday ve çeltik örneklerindeki sonuçlardan elde edilen standart sapmalar F testi yoluyla test edilmiştir. Aralarındaki fark önemsiz bulunduğundan matrisler birleştirilerek $s_{\text{birleşik}}$ hesaplanmış ve 1 ppb ve 5 ppb düzeyinde ayrı ayrı tekrar üretilebilirlik standart sapmaları elde edilmiştir. Buğday ve çeltik örneklerinde Okratoksin A için tekrar üretilebilirlik verileri Çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. Buğday ve Çeltik örneklerinde Okratoksin A için tekrar üretilebilirlik verileri.

Table 4. Reproducibility data for Ochratoxin A in wheat and rice samples.

OTA	1 ppb				5 ppb			
	Buğday		Çeltik		Buğday		Çeltik	
	1. gün (ppb)	2. gün (ppb)	1. gün (ppb)	2. gün (ppb)	1. gün (ppb)	2. gün (ppb)	1. gün (ppb)	2. gün (ppb)
Analiz No								
1	0.996	0.962	1.029	1.049	4.774	5.008	May.39	4.809
2	1.081	0.992	1.032	0.99	5.108	4.386	5.392	4.950
3	0.951	0.865	0.899	0.869	5.397	4.809	5.315	5.218
4	0.916	0.932	0.888	0.96	5.345	4.713	4.661	5.168
5	0.925	1.033	1.091	0.837	4.594	5.371	5.215	4.813
6	0.923	0.866	0.863	1.012	4.843	4.300	5.399	5.367
ORT	0.954		0.96		4.887		5.141	
s	0.064		0.085		0.369		0.265	
RSD	0.067		0.089		0.076		0.051	
% RSD	6.711		8.904		7.556		5.145	
Horwitz	45.58		45.534		35.641		35.37	
$s_{\text{birleşik}}$	0.075				0.321			
$RSD_{\text{birleşik}}$	0.079				0.065			
TÜ Limiti	0.211				0.899			

Doğruluk

Bu amaçla farklı iki günde buğday ve çeltik örneklerinde 6'şar adet 1 ppb ve 5 ppb konsantrasyon düzeyinde geri kazanım çalışmaları yapılmış ve % hata 4 nolu formüle göre hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 5 ve Çizelge 6'da verilmiştir.

$$\% \text{ Hata (Bias)} = [(X_i - X_t) / X_t] \times 100, \quad X_i: \text{Ölçülen değerlerin ortalamaları}, \quad X_t: \text{Gerçek değer} \quad (4)$$

Çizelge 5. Okratoksin A için I. gün % Hata verileri.

Table 5. % Error data first day for OTA.

I.gün	DOĞRULUK			
	Buğday		Çeltik	
Analiz No	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb
1	0.996	4.774	0.726	5.390
2	1.081	5.108	0.739	5.392
3	0.951	5.397	0.899	5.315
4	0.916	5.345	0.888	4.661
5	0.925	4.594	1.091	5.215
6	0.923	4.843	0.863	5.399
X_i	0.965	5.010	0.868	5.229
X_t	1.000	5.000	1.000	5.000
% Hata	-3.467	0.203	-13.233	4.573

Çizelge 6. Okratoksin A için II. Gün % Hata verileri

Table 6. % Error data second day for OTA.

II.gün	DOĞRULUK			
	Buğday		Çeltik	
Analiz No	1 ppb	5 ppb	1 ppb	5 ppb
1	0.962	5.008	1.049	4.809
2	0.992	4.386	0.99	4.95
3	0.865	4.809	0.869	5.218
4	0.932	4.713	0.96	5.168
5	1.033	5.371	0.837	4.813
6	0.866	4.300	1.012	5.367
X_i	0.942	4.765	0.953	5.054
X_t	1.000	5.000	1.000	5.000
% Hata	-5.833	-4.71	-4.717	1.083

Geri Kazanım

Geri kazanım için doğruluk çalışmasında elde edilen veriler kullanılmış ve hesaplanan % geri alma sonuçları Çizelge 7 ve Çizelge 8'de verilmiştir. Geri alma oranı 5 nolu formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% R = [(CF - CU) / CA] \times 100, \quad CF: \text{Standart eklenmiş kör örnek ölçüm sonucu}, \\ CU: \text{Standart eklenmemiş kör örnek ölçüm sonucu}, \quad CA: \text{Eklenen standart miktarı}. \quad (5)$$

Çizelge 7. Buğday ve çeltik örneklerinde Okratoksin A (1 ppb) için geri alma verileri.

Table 7. Recovery data for OTA (1 ppb) in wheat and rice samples.

Analiz No	Sonuç (ppb)	OTA	
		% Geri Alma	% Geri Alma
1	0.996	99.6	0.996
2	1.081	108.1	1.081
3	0.951	95.1	0.951
4	0.916	91.6	0.916
5	0.925	92.5	0.925
6	0.923	92.3	0.923
7	0.962	96.2	0.962
8	0.992	99.2	0.992
9	0.865	86.5	0.865
10	0.932	93.2	0.932

Çizelge 7. Devamı.

Table 7. Continue.

Analiz No	Sonuç (ppb)	OTA	
		% Geri Alma	% Geri Alma
11	1.033	103.3	1.033
12	0.866	86.6	0.866
13	1.029	102.9	1.029
14	1.032	103.2	1.032
15	0.899	89.9	0.899
16	0.888	88.8	0.888
17	1.091	109.1	1.091
18	0.863	86.3	0.863
19	1.049	104.9	1.049
20	0.99	99	0.99
21	0.869	86.9	0.869
22	0.96	96	0.96
23	0.837	83.7	0.837
24	1.012	101.2	1.012
ORT	1.047	95.671	0.957
s	0.32	7.391	0.074

Çizelge 8. Buğday ve çeltik örneklerinde Okratoksin A (5 ppb) için geri alma verileri.

Table 8. Recovery data for OTA (5 ppb) in wheat and rice samples.

Analiz No	Sonuç (ppb)	OTA	
		% Geri Alma	% Geri Alma
1	4.774	95.48	0.955
2	5.108	102.16	1.022
3	5.397	107.94	1.079
4	5.345	106.9	1.069
5	4.594	91.88	0.919
6	4.843	96.86	0.969
7	5.008	100.16	1.002
8	4.386	87.72	0.877
9	4.809	96.18	0.962
10	4.713	94.26	0.943
11	5.371	107.42	1.074
12	4.300	86.00	0.86
13	5.390	107.8	1.078
14	5.392	107.84	1.078
15	5.315	106.3	1.063
16	4.661	93.22	0.932
17	5.215	104.3	1.043
18	5.399	107.98	1.080
19	4.809	96.18	0.962
20	4.950	99.00	0.99
21	5.218	104.36	1.044
22	5.168	103.36	1.034
23	4.813	96.26	0.963
24	5.367	107.34	1.073
ORT	5.014	100.288	1.003
s	0.34	6.798	0.068

Belirsizlik Kaynakları ve Hesaplamaları

Metodun belirsizlik kaynakları, örnek tartımından gelen belirsizlik, örnek hacminden gelen belirsizlik, standart hazırlamadan gelen belirsizlik, kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik, kesinlikten gelen belirsizlik ve doğruluktan gelen belirsizlik şeklinde tanımlanmıştır. Validasyon sırasında elde edilen veriler üzerinden gerçekleştirilen ölçüm belirsizliği hesaplamalarında; tartım ve hacim belirsizlikleri gibi bileşenlerin etkileri tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik sonuçlarına zaten yansdığından, bu bileşenlerden gelen belirsizlikler ayrıca hesaplamalara dahil edilmemiştir.

Doğrulukta Gelen Belirsizlik

1 ve 5 ppb'lik geri alma sonuçlarının ortalaması ve standart sapması bulunmuş, t testine göre hesaplanmıştır.

$$t = \frac{|1 - \bar{R}|}{u(\bar{R})} \quad (6)$$

\bar{R} : Geri alma oranlarının ortalaması

$u(\bar{R})$: Geri alma oranlarının ortalamalarının standart sapması (yani s/\sqrt{n})

Okratoksin A (1 ppb)

1 ppb buğday ve çeltik örneklerinde Okratoksin A için; bulunan $t = 2.870$ değeri, t 'nin % 95 güven aralığında. t - dağılımı kritik değeri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen t değerleri $n-1=23$ için t değeri 2.069'dir. Sonuç olarak geri alma oranlarının ortalamasının 1'den farkı önemli bulunmuştur. Bu durumda belirsizlik, $u(R)$, 7 nolu formülle hesaplanmıştır.

$$u(\bar{R}) = u(R) = s/\sqrt{n} \quad (7)$$

$u(\bar{R})$: Geri alma oranlarının ortalamalarının standart sapması, $u(R)$: Geri almadan gelen belirsizlik, s : Geri alma oranlarının standart sapması, n : Yapılan analiz tekrar sayısı, k : Genişletilmiş belirsizlik hesabında kullanılan kapsama faktörü, $u(R) = s/\sqrt{n} = 0.015$.

Okratoksin A (5 ppb)

5 ppb buğday ve çeltik örneklerinde Okratoksin A için; bulunan $t = 0.207$ değeri, t 'nin %95 güven aralığında. t - dağılımı kritik değeri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen t değerleri $n-1=23$ için t değeri 2.069'dir. Geri alma oranlarının ortalamasının 1'den farkı önemsiz bulunmuştur. Bu durumda belirsizlik, $u(R)$, 8 nolu formülle hesaplanmıştır.

$$u(\bar{R}) = \frac{t_{\text{krit}} \times u(\bar{R})}{1.96} \quad (8)$$

$$u(R) = (2.069 \times 0.014)/1.96 = 0.015$$

Kesinlikten Gelen Belirsizlik

1 ve 5 ppb'lik tekrar üretilebilirlik çalışmalarından elde edilen rölatif standart sapmalar, RSD birleşik. kesinlikten gelen belirsizlik olarak alınmıştır.

Birleştirilmiş Belirsizlik

Birleştirilmiş belirsizlik sonuçları Çizelge 9'da verilmiştir.

Çizelge 9. Belirsizlik sonuç tablosu.

Table 9. Uncertainty result table.

Belirsizlik Bileşenleri	1 ppb	5 ppb
Doğruluk	0.015	0.015
Kesinlik	0.079	0.065
Birleştirilmiş Belirsizlik	0.08	0.067
Genişletilmiş Belirsizlik (%95 güvenle, $k=2$)	0.16	0.13

Çizelge 10. Okratoksin A için performans kriterleri.

Table 10. Table of performance criteria for OTA.

Limit ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD _r (%)	Okratoksin A	
		RSD _R (%)	Geri Alma (%)
<1	≤ 40	≤ 60	50 – 120
1 – 10	≤ 20	≤ 30	70 – 110

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre geri alma, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik limitlerinin ve % rölatif standart sapma oranlarının 'TGK Gıdalardaki Mikotoksin Limitlerinin Resmi Kontrolü İçin

Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği'nde (Tebliğ No: 2011/32) yer alan "Okratoksin A için Performans Kriterleri"ne (Çizelge 10) uygun olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada 20 buğday örneğinden 3'ünde (%15) OTA tespit edildi. Konsantrasyon, $<LOQ-6.93\mu g\ kg^{-1}$ arasında değişmekte olup, pozitif numunelerin iki tanesi, doğrudan insan tüketimine zararlı olacağı tahmin edilen OTA için $5\ \mu g\ kg^{-1}$ maksimum limiti geçmiştir. Buğdayda mikotoksin bulaşmasının oluşmaması için % 14.5'ten daha düşük bir nem içeriği (ıslak ağırlık temelinde) gereklidir (Magan ve ark., 2003). Tahıl taneleri arasında, buğday Türkiye'de en sık OTA ile bulaşmış mahsul gibi görünmektedir. Buğday aslında Orta Anadolu'da (%32.4), Trakya bölgesinde (% 17), Güneydoğu Anadolu'da (% 13.3) ve Akdeniz bölgesinde (% 12.8) yetiştirilmektedir (TÜİK, 2014). Türkiye'nin iklim şartları ochra-toksijenik küf oluşumuna elverişlidir ve bu nedenle mahsuller hem hasat öncesi hem de hasat sonrası aşamalarında OTA ile kontamine olabilirler (Kara ve ark., 2015). Buğday, Türkiye'de temel bir gıda maddesi olup OTA'nın kirlilik seviyesi ile ilgili veriler sınırlıdır.

El-Sayed ve ark. (2003). Mısır pazarından elde edilen 19 adet buğday ve ununda okratoksin A bulunmadığını tespit etmiştir. Abdelhamid (1990). okratoksin A analizi için 51 buğday numunesinin. %23.5 (12adet) okratoksin A pozitif. Buğdayda kontaminasyon seviyesi $10\ \mu g\ kg^{-1}$ 'di. Abdel-Hafez ve ark. (1990 18 buğdayda *Aspergillus* (*A. ochraceus*), *Fusarium*, *Penicillium* ve *Alternaria* gibi farklı tipte toksijenik mantarların varlığını göstermiştir. Bader ve ark. (2017) buğday taneleri üzerinde oluşan okratoksin A konsantrasyonu. 2009, 2012 ve 2014 yıllarında Kafr El-Şeyh'te sırasıyla 24.9, 25.6 ve $21.4\ \mu g\ kg^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda 20 adet çeltik örneğinden 2'sinde (%10) OTA tespit edilmiştir. Konsantrasyon, $<LOQ-5.44\mu g\ kg^{-1}$ arasında değişmekte olup, pozitif numunelerin bir tanesinde, doğrudan insan tüketimine zararlı olacağı tahmin edilen OTA için $5\ \mu g\ kg^{-1}$ maksimum limiti geçmiştir. Çeltik, suyu seven bir bitkidir ve genellikle çok yüksek nem seviyelerinde hasat edilir (%35-50). Bu nedenle, okratoksin üreten mantarlar tahılı kirletebilir ve işleme sırasında çeşitli seviyelerde OTA üretebilirler. Çalışmamızın aksine Aydın ve ark. (2011). Türkiye'de tüketilen 100 pirinç numunesinin %72'sinde, $LOQ-80.7\mu g\ kg^{-1}$ konsantrasyon aralığında OTA tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada, OTA Türkiye'den toplanan toplam örneklerin %38'inde ve maksimum $3.02\mu g/kg$ seviyesinde bulunmuştur (Büyükcinal ve ark., 2010). Juan ve ark. (2008) 58 pirinç numunesinde OTA analizlerini yapmış, ortalama $0.89\ \mu g\ kg^{-1}$ seviyesine sahip, sadece üç numunede (%5.2) OTA saptamıştır. Başka bir çalışmada, pirinç unu içindeki OTA seviyesinin %18.8 olduğu ve $0.154\ \mu g\ kg^{-1}$ lık konsantrasyonu olduğu görülmüştür (Kara ve ark., 2015). Her ne kadar OTA kontaminasyonu pirinç için buğday ve arpa gibi diğer tahıllara göre daha az bildirilmiş olsa da, Fas'ta yapılan bir çalışmada pirinç örneklerinin % 26 sında $0.036-47\mu g\ kg^{-1}$ aralığında OTA ile kirlenme olduğu bildirilmiştir (Juan ve ark., 2008). Güney Kore'de yapılan bir diğer çalışmada pirinç örneklerinin %9.1'inde, yaklaşık $2.1-6.0\ \mu g\ kg^{-1}$ civarında OTA ile kirlenme olduğu bildirilmiştir (Park ve ark., 2005). İspanya'da yapılan diğer bir çalışmada pirinç örneklerinin %13.1'inde $1-27.3\mu g\ kg^{-1}$ aralığında OTA ile kirlenme olduğu bildirilmiştir (Gonzalez ve ark., 2006).

SONUÇ

Uygulanan analitik yöntem, OTA'nın belirlenmesi için buğday ve çeltikte başarılı bir şekilde doğrulanmıştır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında, Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenen limitler dahilinde ($5\mu g\ kg^{-1}$) buğday ve çeltik örneklerinde OTA analizlerinin sonucunun buğdayda iki numune, çeltikte bir numune hariç uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Avrupa Parlamentosu tarafından öngörülen teknik standartlar ve kurallar göz önüne alındığında ($3\ \mu g\ kg^{-1}$) buğdayın 8 örneği (%40), çeltikte ise 4 örneği (%20) hariç uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Bu anlamda tüketicilerin buğday ve çeltikten üretilen ürünlere de gıda güvenliği bağlamında güvenebileceği sonucuna varılabilir.

Bununla birlikte, bu çalışmanın iki farklı örnek grubuna odaklanan bir ön araştırma olduğu vurgulanmalıdır. Bu araştırmaya, örneğin saklama süresi boyunca kalite ve güvenlik parametrelerini inceleyerek devam etmek ilginç olacaktır. Ayrıca OTA'ya toplam maruziyeti tahmin etmek için farklı gıdalar üzerinde ve daha fazla örnek üzerinde çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazar olarak makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması konusunda herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

YAZAR KATKISI

Yazar olarak makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazımı tarafımda yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- AOAC. (2008). Official Method 2000.03. 2005 Ochratoxin A and Ochratoxin B Instruction Manual, 2008.
- Abdelhamid, A. M. (1990). Occurrence of some mycotoxins (Aflatoxin, ochratoxin A, Citrinin, zearalenone and vomitoxin) in various Egyptian feeds. *Archives of Animal Nutrition*, 40, 647-664.
- Abdel-Hafez, S. I. I., Moubasher Shoreit, A. H., & Ismail, M. A. (1990). Fungal flora associated with combine harvester wheat and sorghum dusts from Egypt. *Journal of Basic Microbiology*, 30, 467-479.
- Aydin, A., Aksu, H., & Gunsen, U. (2011). Mycotoxin levels and incidence of mould in Turkish rice. *Environmental Monitoring and Assessment*, 178, 271-280.
- Badr, A. N., Antonio, F. L., Hassan, A. A., & Taha, H. (2017). Ochratoxin A occurrence on Egyptian wheat during seasons (2009-2014). *Asian Journal of Scientific Research*, 10, 178-185.
- Buyukunal, S. K., Kahraman, T., & Ciftcioglu, G. R. (2010). Occurrence of AF, AFB1, OTA in rice commercialized in eastern Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19, 907-912.
- Chauhan, R., Singh, J., Sachdev, T., Basu, T., & Malhotra, B. D. (2016). Recent advances in mycotoxins detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 81, 532-545.
- De Koe, W. J., & Juodeikiene, G. (2012). *Mycotoxin contamination of wheat, flour and bread*. In S. P. Cauvain (Ed.), *Breadmaking* (pp. 614-618. Woodhead Publishing.
- EC. (2006). *Commission regulation (EU) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. Official Journal of the European Union, L364, 5-24.
- EC. (2012). *Commission Regulation (EU) No 594/2012 of 5 July 2012 amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non dioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs*. Official Journal of the European Union, L176, 43-45.
- EFSA. (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, 101,1-36.
- El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins*, 2, 461-493.
- El-Sayed, A. M. A. A., Soher, E. A., & Sahab, A. F. (2003). Occurrence of certain mycotoxins in corn and corn-based products and thermostability of fumonisin B1 during processing, *Food/Nahrung*, 47, 222-225.
- FAO/INFOODS. (2012) FAO/INFOODS Guidelines for Converting Units, Denominators and Expressions, version 1.0. FAO, Rome.
- Gareis, M. (2003). Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. *Report of Experts Participating in SCOOP Task 3.2. 10-Part A: Trichothecene*, 13-235.
- González, L., Juan, C., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2006). Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 223-227.
- IARC. (1993). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*. Vol. 56, International Agency of Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.
- Juan, C., Zinedine, A., Idrissi, L., & Mañes, J. (2008). Ochratoxin A in rice on the Moroccan retail market. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 83-85.
- Kara, G. N., Ozbey, F., & Kabak, B. (2015). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey. *Food Control*, 54, 275-281.
- Levasseur-Garcia, C. (2018). Updated overview of infrared spectroscopy methods for detecting mycotoxins on cereals (corn, wheat and barley). *Toxins*, 10, 38.
- Lund, F., & Frisvad, J. C. (2003). Penicillium verrucosum in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1117-1123.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., & Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 723-730.
- Park, J. W., Choi, S. Y., Hwang, H. J., & Kim, Y. B. (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for human. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 305-314.
- Ruscito, A., McKenzie, S., Goundreau, D. N., & DeRosa, M. C. (2016). Current status and future prospects for aptamer-based mycotoxin detection. *Journal of AOAC International*, 99, 1-13.

- Saccon, F. A. M., Parcey, D., Paliwal, J., & Sherif, S. S. (2017). Assessment of Fusarium and deoxynivalenol using optical methods. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 34-50.
- TGK. (2011). *Gıdalardaki Mikotoksin Limitlerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği*, Tebliğ No: 2011/32.
- TÜİK. (2017). Bitkisel üretim istatistikleri. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. Erişim tarihi: 12 Haziran 2017.
- Xu, L., Zhang, Z., Zhang, Q., & Li, P. (2016). Mycotoxin determination in foods using advanced sensors based on antibodies or aptamers, *Toxins*, 8, 1-16.