



RASFF SİSTEMİNDE TAHİL VE FIRINCILIK ÜRÜNLERİNİN AFLATOKSİN VE OKRATOKSİN A DÜZEYLERİ VE HATAY YÖRESİ BUĞDAYLARININ BU MİKOTOKSİNLER AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ*

Aydın Sağlam, M. Tuğrul Masatcıoğlu**

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tayfur Sökmen Kampüsü, Antakya, Hatay, Türkiye

Geliş / Received: 02.06.2021; Kabul / Accepted: 12.08.2021; Online baskı / Published online: 13.09.2021

Sağlam, A., Masatcıoğlu, M.T. (2021). RASFF sisteminde tahıl ve fırıncılık ürünlerinin aflatoksin ve okratoksin A düzeyleri ve Hatay yöresi buğdaylarının bu mikotoksinler açısından değerlendirilmesi. *GIDA* (2021) 46 (5) 1195-1204 doi: 10.15237/gida.GD21094

Sağlam, A., Masatcıoğlu, M.T. (2021). Analysis of RASFF notification on cereal and bakery products and evaluation of the aflatoxin and ochratoxin A in wheat from Hatay region. GIDA (2021) 46 (5) 1195-1204 doi: 10.15237/gida.GD21094

ÖZ

Bu araştırma makalesi esas olarak iki bölüm halinde tasarlanmıştır. Öncelikle, Gıda ve Yemler için Hızlı Alarm Sistemi (RASFF) veri kaynağı kullanılarak 2009-2018 yılları arasında yapılan tahıl ve fırıncılık ürünleri bildirimlerinde mikotoksin seviyeleri araştırılmıştır. Son on yılın bildirimleri değerlendirildiğinde, ortalama aflatoksin B₁ (AFB₁), toplam aflatoksin (TAF), okratoksin A (OTA) konsantrasyonları sırasıyla; 21.92, 34.98, 23.10 µg/kg olarak bulunmuştur. Çalışmanın ikinci bölümünde, Hatay yöresinde yetiştirilen 29 buğday örneğinde aflatoksin (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) ve OTA analizi yapılmıştır. Mikotoksinlerin konsantrasyonu, HPLC-FD sistemi ile belirlenmiştir. Analitik yöntem, 401/2006 sayılı EC yönetmeliğine göre valide edilmiş ve geri kazanımlar %83.0-107.2 aralığında saptanmıştır. AFB₁, AFB₂ ve AFG₁ için pozitif örnek yüzdesi sırasıyla; %44.8, %13.8 ve %27.6 bulunmuştur. Bu çalışmada en yaygın mikotoksin, 0.174-137.880 µg/kg aralığında olan OTA'dır (%82.8). İncelenen numunelerin 5'inde OTA düzeyinin, Avrupa mevzuatı maksimum limit değerini (5 µg/kg) aştığı tespit edilmiştir. Ayrıca, RASFF bildirimlerinde belirlenen maksimum OTA düzeyi ortalamasından üç numune daha yüksek çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Gıda ve yemler için hızlı alarm sistemi (RASFF), buğday, aflatoksinler, okratoksin A, HPLC-FD, analitik yöntem validasyonu

ANALYSIS OF RASFF NOTIFICATION ON CEREAL AND BAKERY PRODUCTS AND EVALUATION OF THE AFLATOXIN AND OCHRATOXIN A IN WHEAT FROM HATAY REGION

ABSTRACT

This research paper was designed mainly in two parts. Primarily, the mycotoxin levels in cereal and bakery products notifications between 2009 and 2018 by using the Rapid Alert System for Food and

*Bu araştırma makalesi Aydın Sağlam'ın yüksek lisans tez çalışması kapsamında hazırlanmıştır / *This paper is a part of Aydın Sağlam's MSc thesis.*

**Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author;*

✉ tmasatci@gmail.com

☎ (+90) 326 245 5845

☎ (+90) 326 245 5832

Aydın Sağlam; ORCID no: 0000-0003-3721-7783

M. Tuğrul Masatcıoğlu; ORCID no: 0000-0002-2583-8796

Feed (RASFF) data source were investigated. When the notifications of the last decade are evaluated, the average concentrations of aflatoxin B₁ (AFB₁), total aflatoxins (TAF), and ochratoxin A (OTA) were found 21.92, 34.98, and 23.10 µg/kg, respectively. In the second part of the study, 29 wheat samples grown in the Hatay region of Turkey were analyzed to detect aflatoxin (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) and OTA concentrations. The mycotoxin concentrations were determined by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detection (HPLC-FD) system. The analytical method was validated according to Regulation (EC) No. 401/2006. The recoveries were in the range of 83.0-107.2%. The percentages of positive samples for AFB₁, AFB₂ and AFG₁ were 44.8, 13.8 and 27.6%, respectively. In this study, the most prevalent mycotoxin was OTA (82.8%), which found in the range of 0.174-137.880 µg/kg. Among 5 of the studied samples, it was determined that the OTA level exceeded the European legislation maximum limit of 5 µg/kg. Moreover, OTA levels of three samples were higher than the average of the maximum values of OTA level determined in RASFF notifications.

Keywords: Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), wheat, aflatoxins, ochratoxin A, HPLC-FD, analytical method validation

GİRİŞ

Gıda ve Yemler için Hızlı Alarm Sistemi (Rapid Alert System For Food and Feed; RASFF), Avrupa Birliği üyesi 28 ülkenin ulusal gıda güvenliği otoriteleri, Avrupa Komisyonu, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, EFSA), Avrupa Serbest Ticaret Birliği ve Norveç, Lihtenştayn, İzlanda, İsviçre arasında 1979 yılında kurulan bir araçtır (Anonymous, 2007). Bu sistemin temel amacı, gıda ve yemlerde ciddi riskler (mikotoksinler, patojen mikroorganizmalar, pestisit kalıntıları vb.) oluşmasının sonucunda bu sistemdeki üye ülkeler arasında gıda veya yem ile ilgili sağlık tehditlerine karşı daha hızlı ve koordineli bir şekilde hareket edilmesini ve alınabilecek önlemler ile ilgili yetkili kontrol birimleri arasında bilgi aktarımının sağlanmasıdır. Sistemin çalışma prensibi ise birkaç basamaktan oluşmaktadır. Öncelikle, üye ülkelerden herhangi biri insan sağlığı açısından gıda veya yem kaynaklı olarak tehdit oluşturabilecek bir bilgiyi tespit ederse bunu sistem (RASFF) aracılığı ile Komisyon'a bildirir. İlerleyen aşamada, komisyon irtibat noktası tarafından riskin doğrulanmasından sonra bu bildirimler belirlenen riskin ciddiyetine ve ürünün pazardaki dağılımına göre sınıflandırılır ve RASFF bildirimleri ağda bulunan tüm üyelere iletilir (Anonymous, 2007). Tehlike kategorisine göre gıdalarda en fazla RASFF bildiriminin mikotoksin kaynaklı olduğu, ülkemiz ihracatında da en önemli sorunun mikotoksin kaynaklı gıdaların oluşturduğu bildirilmiştir (Sağlam ve Masatcioğlu, 2020).

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps* ve *Fusarium* cinslerinden çeşitli küfler tarafından üretilen toksik bileşiklerdir (Marin vd., 2013). Üç yüz adet tanımlanmış ikincil metabolitler arasında; zearalenon, deoksinivalenol, aflatoksinler, okratoksin A, patulin, fumonisinler son derece önemli mikotoksinler olarak sayılmaktadır (Amirahmadi vd., 2017). Aflatoksinler (AFs), *Aspergilli* türlerinden özellikle *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen ikincil toksik metabolitlerdir. Bu küfler belli gıda ve yemlerde uygun sıcaklık ve nem koşulları altında büyüyebilir ve hasat öncesi ve/veya sırasında, ambalajlamada, sevkiyatta ve depolamada aflatoksinler üretir (Bushby ve Wogan, 1979). Aflatoksinlerin kanserojen, mutajen ve teratojen madde potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Hendrickse, 1997). Okratoksin ise, kanserojenik, immunosupresif ve teratojenik özelliklere sahip nefrotoksik bir mikotoksin olarak tanımlanmıştır (Murphy vd., 2006). *Penicillium* (örneğin; *Penicillium verrucosum*) ve *Aspergillus* (örneğin; *Aspergillus westerdijkiae*) üyeleri tarafından üretilen Okratoksin A (OTA)'nın, tarımsal ürünler ve buğdaydan üretilen gıdalarda sıklıkla bulunduğu rapor edilmiştir (Duarte vd., 2010; Lee ve Ryu, 2017).

Giray vd. (2007), Türkiye'nin farklı bölgelerinde yetiştirilen 41 buğday çeşidinde AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ düzeylerini incelemişlerdir. Toplam aflatoksin (TAF) konsantrasyonunun 10.4-643.5 ng/kg arasında değiştiği ve örneklerin %59'unun TAF pozitif olduğu bildirilen

çalışmada, aflatoksin seviyelerinin yasal sınırlamaların altında olmasına rağmen bu miktarların mikotoksinlere günlük maruz kalma hususuna dikkat çekilmiştir. Trakya'nın 7 farklı bölgesinden temin edilen buğdaylarda ($n=100$) yürütülen bir diğer araştırmada, 2'şer örneğin hem TAF hem AFB₁, 28 buğday numunesinin ise OTA için izin verilen maksimum tolere edilebilir seviyeden yüksek olduğu rapor edilmiştir (Aydın vd., 2008). Çalışmada ayrıca, Güney-Doğu Avrupa'daki örnekleme alanında OTA varlığının dolaylı yoldan Endemik Balkan Nefropatiyle ilişkili olduğu belirtilmekle birlikte toplum sağlığı için ciddi risk oluşturduğu ifade edilmiştir. Dolayısıyla, mikotoksinlerin tahıllarda ve aynı zamanda yemlerde bulunmaları, tarım işletmelerinde kayıplara neden olan ve halk sağlığını etkileyen önemli bir sorundur.

Bu çalışmanın birincil amacı, 2009–2018 yıllarını kapsayan on yıllık periyotta RASFF (Gıda ve Yemler için Hızlı Alarm Sistemi)'a üye ülkelerde tahıl ve fırıncılık ürünlerinde gerçekleşen mikotoksin bildirimlerinin incelenmesidir. Bir diğer anlatımla, ihracatı yapılan tahıl ve fırıncılık ürünlerinde en yüksek risk grubunu oluşturan mikotoksinlerin RASFF portalında bildirim yapılan düzeyleri saptanarak mevcut durum ortaya konulmaya çalışılmıştır. Çalışmada ayrıca, Hatay İli Antakya merkez ve çevre ilçelerinden buğday numuneleri temin edilerek, aflatoksin (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) ve OTA seviyeleri tespit edilmiş, elde edilen bulgular hem yasal sınırlamalar (Avrupa Komisyonu; European Commission, 2006a); 2011 tarihli ve 28157 sayılı Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde (Anonymous, 2011)) hem de RASFF (RASFF Portal, 2019) bildirimleri ile kıyaslanarak sunulmuştur.

MATERYAL VE YÖNTEM

RASFF Bildirimlerinde Veri Materyali

Bu çalışmada Gıda ve Yemler için Hızlı Alarm Sistemi (Rapid Alert System for Food and Feed; RASFF) veri tabanı (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>) kaynak olarak kullanılmıştır (RASFF Portal, 2019). RASFF portalında primer arama tipi “gıda”, ürün kategorisi ise “tahıl ve

fırıncılık ürünleri” olarak seçilmiş ve tehlike kategorisinde “mikotoksinler” araştırma kapsamında incelenmiştir.

RASFF Verilerinin Değerlendirilmesi

RASFF portalında 01 Ocak 2009 – 31 Aralık 2018 tarihleri arasında, RASFF sistemine üye tüm ülkelere gelen bildirimler dikkate alınarak, yıllara göre mikotoksinlerin (AFB₁, TAF, OTA) düzeyleri Microsoft Excel (2016) programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Buğday Numunelerinin Temini

RASFF bildirimlerinin yanı sıra tahılların mevcut risk durumunun incelenmesi amacıyla, Hatay İli Antakya merkez ve çevre ilçelerindeki un fabrikaları ve değirmenlerden 2018 yılı Nisan-Mayıs aylarında her biri minimum 1 kg olacak şekilde toplam 29 adet buğday numunesi temin edilmiştir. Bu örneklerin temin edilmesini takip eden iki ay içerisinde aflatoksin (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) ve OTA analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular hem Avrupa Komisyonu (European Commission, 2006a) ve Türk Gıda Kodeksi (Anonymous, 2011) tarafından her iki mikotoksin için beyan edilen üst limitler ile hem de RASFF portalında tespit edilen verilerle karşılaştırılarak tartışılmıştır.

Aflatoksin ve Okratoksin A Tayinleri Örnekleme

Toplanan buğdaylar ($n = 29$) laboratuvar ölçekli değirmende (Valsli Değirmen-4000, Bastak, Türkiye) öğütülerek 212 μm 'lik elekten geçirilmiştir. Öğütme işlemi sırasında çapraz kontaminasyonu önlemek amacıyla “mikotoksin negatif buğday” her bir numuneden sonra değirmenden 5 dakika süreyle geçirilmiş ve valsler temizlenmiştir. Benzer işlem her bir numunenin elekten geçirilmesinde de uygulanmıştır. Öğütülen her numune ayrı ayrı ağzı kilitli alüminyum çepirli polietilen poşetlere (ışık ve hava geçirmez) alınarak, analizler gerçekleştirilinceye kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Ekstraksiyon Yöntemi

Aflatoksin (B₁, B₂, G₁ ve G₂)

Un örneklerinden AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ ekstraksiyonu AOAC Metod No: 999.07 de bazı

minör değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (AOAC, 2016). Özetle, 50 g öğütülmüş ve 212 µm'lik elekten geçirilmiş buğday unu üzerine 300 mL metanol:su (4:1, v/v) ve 5 g NaCl (analitik saflıkta, Merck, Darmstad, Almanya) ilave edilerek 30 dakika blenderdan (Philips HR1337, Eindhoven, Hollanda) geçirilerek homojenize edilmiştir. Karışım kaba filtre kâğıdından süzölmüş, ekstraktan 10 mL alınarak üzerine 60 mL fosfat tamponlu tuz çözeltisinden (PBS) ilave edilmiştir. Yeni karışım önce 0.45 mikron gözenekli filtre kâğıdından, sonrasında immünoafinite kolondan (R-Biopharm Rhone Ltd, Glasgow, Scotland, İngiltere) geçirilmiştir. Örnek geçişinden sonra kolon 15 mL ultra saf su ile yıkanmış ve hava ile kurutulmuştur. Daha sonra kolondan sırasıyla 1.375 mL metil alkol (HPLC saflıkta, Merck, Darmstad, Almanya) ve 1.925 mL HPLC saflıkta su geçirilmiş, elüat amber renkli viallere alınmıştır.

Okratoksin A

Çalışma kapsamındaki un numunelerinden OTA ekstraksiyonu, R-Biopharm A20P14.V9 yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (R-Biopharm, 2015). İlk olarak, 50 gr un numunesi 200 mL metanol:su (70:30, v/v) ile 1 dakika boyunca ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışım Whatman no:4 filtre kâğıdından süzölmüş ve 10 mL ekstrakta 40 mL PBS eklendikten sonra cam mikrofiberlerden (Merck, Darmstad, Almanya) tekrar süzölmüştür. Toplanan 20 mL'lik ekstrakt, immünoafinite kolonundan (R-Biopharm Rhone Ltd, Glasgow, Scotland, İngiltere) geçirilmiştir. Kolon, 10 mL PBS ve HPLC saflıkta 10 mL su ile yıkanmıştır. Son olarak OTA, 1.5 mL metanol ve 1.5 mL suyla elüe edilerek amber renkli viallere alınmıştır.

Mikotoksin Analizinde HPLC Koşulları

Aflatoksin ve OTA analizleri için kullanılan HPLC sistemi (Shimadzu, Kyoto, Japonya) LC-20 AD sıvı kromatografisi, DGU-20A₃ degasser, CTO-20A kolon fırını, SCL-10A kontrol sistemi ve LC Solution yazılımından oluşmaktadır. Mikotoksin ölçümlerinde floresans dedektör (RF-10AXL) ve C18 inertsil ODS-3, 4.6 mm × 150 mm, 5 µm kolon (GL Science, Tokyo, Japonya) kullanılmıştır. Çalışmada, kolon fırın sıcaklığı 40 °C, enjeksiyon hacmi 100 µL ve akış hızı 1.000

mL/dk olarak ayarlanmıştır. Aflatoksin (AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂) için 35 µL nitrik asit ve 12 mg KBr içeren ultra saf su/metanol (55:45, v/v) karışımı, OTA için ise asetonitril/ultra saf su/asetik asit (49.5:49.5:1, v/v/v) karışımı mobil faz olarak kullanılmıştır.

Validasyon Yöntemi

Bu çalışmada, 2002/657/EC sayılı Avrupa Komisyonu Kararı tarafından bildirilen kriterlere göre; doğruluk, hassasiyet, tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) belirlenmiştir (European Commission, 2002). Standart eğriler, stok çözeltilerden bilinen en az beş dilüsyonla (aflatoksinler; AFs için 0.25 ile 5 µg/kg ve okratoksin A; OTA için 0.25 ile 10 µg/kg aralığında) yapılmıştır. Geri kazanım, kontrol grubu un numunelerine (mikotoksin negatif buğday unu) yüksek ve düşük konsantrasyon seviyelerinde AFs ve OTA eklenerek on tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Tahıl ve Fırıncılık Ürünlerinde RASFF Portalında Belirlenen Mikotoksin Düzeyleri

Tahıl ve fıırıncılık ürünlerinde 2009-2018 yılları arasında yapılan RASFF bildirimlerinde tespit edilen mikotoksin (aflatoksin B₁; AFB₁, toplam aflatoksin; TAF ve okratoksin A; OTA) düzeyleri Çizelge 1'de verilmiştir. RASFF portalında on yıllık süreçte tahıl ve fıırıncılık ürünlerinde AFB₁ için yapılan bildirimler incelendiğinde, AFB₁ düzeyinin 2.1-251.0 µg/kg aralığında değiştiği ve ortalama değerin 21.92 µg/kg olduğu tespit edilmiştir. Araştırmanın yapıldığı dönemde RASFF sisteminde bildirim yapılan TAF ve OTA düzeyleri ise sırasıyla, 2.8-328.0 µg/kg (ortalama; 34.98 µg/kg) ve 1.0-471.0 µg/kg (ortalama; 23.10 µg/kg) olarak saptanmıştır.

Avrupa Komisyonu (EC: European Commission) No 1881/2006 sayılı düzenlemeye (European Commission, 2006a) ve Türk Gıda Kodeksi "Bulaşanlar Yönetmeliği"ne (Anonymous, 2011) göre tahıl ve tahıl ürünlerinde AFB₁ en yüksek limit değerin 2 µg/kg, TAF için maksimum limit değerin ise 4 µg/kg olduğu bildirilmiştir. Anılan her iki yönetmelikte de, OTA için maksimum limit değerin işlenmemiş tahıllarda 5 µg/kg,

diğer taraftan işlenmiş tahıl ve tahıl ürünlerinde ise 3 µg/kg olduğu beyan edilmiştir. RASFF bildirimlerinde tespit edilen AFB₁ düzeyleri beklenildiği gibi Avrupa Komisyonu tarafından bildirilen en yüksek limit değerlerinin üzerindedir. Ancak TAF düzeylerine bakıldığında, bazı yıllarda en düşük seviyelerin limit değerinin altında kaldığı görülmektedir (Çizelge 1). Bu durum, bildirim yapılan gıda örneğinde sadece TAF değil, yanı sıra AFB₁, OTA ve/veya diğer mikotoksinlerin de

beyan edilmesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, aynı gıda numunesinde, AFB₁ değerinin en yüksek limit değerini aştığı fakat TAF değerinin sınır değeri geçmediği durumlar söz konusu olabilir. Dolayısıyla, RASFF üyesi ülkeler arasında bu gıda örneği için AFB₁'den dolayı bildirim yapılmakta ve yanı sıra analiz edilen TAF değeri de beyan edilmektedir. Benzer durum OTA değerleri incelendiğinde de görülmektedir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Tahıl ve fırıncılık ürünlerinde 2009-2018 yılında yapılan RASFF bildirimlerinde tespit edilen AFB₁, TAF ve OTA düzeyleri*

Table 1. AFB₁, TAF and OTA levels in cereal and bakery products notifications between 2009 and 2018 obtained by RASFF data source

Yıllar Years	AFB ₁ (µg/kg)	TAF (µg/kg)	OTA (µg/kg)
2009	9.96 (2.4-47.0)	14.48 (2.8-51.0)	6.80 (3.6-18.6)
2010	8.80 (2.6-57.0)	14.07 (2.9-127.0)	22.23 (4.9-37.0)
2011	27.55 (2.9-155.3)	27.07 (3.3-153.0)	12.72 (4.8-39.0)
2012	16.24 (3.2-171.4)	68.30 (4.9-328.0)	8.91 (4.5-13.0)
2013	24.90 (3.9-86.1)	23.12 (6.2-57.0)	97.18 (5.1-471.0)
2014	36.67 (2.6-190.0)	59.00 (9.5-200.0)	12.53 (8.9-15.0)
2015	55.33 (2.1-251.0)	77.62 (10.7-284.0)	19.31 (1.4-40.0)
2016	11.09 (4.5-32.5)	13.50 (4.5-36.5)	27.55 (1.0-94.8)
2017	9.52 (3.0-54.0)	20.41 (5.6-67.0)	7.95 (6.0-9.9)
2018	19.12 (3.6-80.2)	32.27 (7.5-86.5)	15.80 (1.2-69.0)
Ortalama Mean	21.92 (3.08-112.45)	34.98 (5.79-139.00)	23.10 (4.13-80.73)

(*) Yıllara göre mikotoksin düzeyleri ortalama değer olarak verilmiştir (parantez içindeki değerler ise; minimum ve maksimum seviyeleri göstermektedir).

(*)Mycotoxin levels by years are given as the average value (the values in parentheses show the minimum and maximum levels).

Aflatoksin ve Okratoksin A için Validasyon Çalışması

Un matrisinde AFs ve OTA için yapılan validasyon çalışması sonuçları Çizelge 2'de sunulmuştur. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı (R²) AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ için sırasıyla; 0.9982, 0.9975, 0.9953 ve 0.9985 bulunmuştur. OTA için ise bu değer 0.9981 olarak tespit edilmiştir. AFB₁ için LOD değeri 0.041 µg/kg, LOQ değeri 0.104 µg/kg bulunmuştur. AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ için LOD değerleri sırasıyla, 0.021, 0.058 ve 0.040 µg/kg olarak; LOQ değerleri ise sırasıyla, 0.079, 0.202 ve 0.124 µg/kg

olarak belirlenmiştir. OTA için bu değerler sırasıyla; 0.050 µg/kg ve 0.166 µg/kg olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). Elde edilen sonuçlar, Kabak (2012)'ın HPLC-floresans dedektör yöntemiyle gerçekleştirdiği çalışmasında, AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ve OTA için bulguladığı LOD-LOQ değerleri ile benzer bulunmuştur.

Bu çalışmada, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım için standart sapma değerleri %3.12 ile %12.62 arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 3). Buğday unu matrisinde AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ için ortalama geri kazanım değerleri

sırasıyla, %99.5, %93.8, %98.6 ve %89.0 olduğu tespit edilmiştir. OTA için ortalama geri kazanım değeri ise %99.3 olarak saptanmıştır. Yüzde 89.0 ile %99.5 arasında değişen tüm geri kazanım değerleri (Çizelge 3), Avrupa Komisyonunun 401/2006 sayılı Komisyon Tüzüğü'nde (European Commission, 2006b) tanımlanan hem

AFB₁ (ve TAF; AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂ toplamı) hem de OTA için kabul edilebilir seviyeler olan 1-10 µg/kg konsantrasyon aralığında %70-110; 1 µg/kg'ın altındaki konsantrasyon değerlerinde ise %50-120 geri kazanım oranları ile uyumlu bulunmuştur.

Çizelge 2. AFs ve OTA için HPLC-FD yöntemiyle elde edilen validasyon verileri

Table 2. Validation data for AFs and OTA by HPLC-FD method

Mikotoksin <i>Mycotoxin</i>	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	R ²	Doğrusallık Eşitliği <i>Linear regression equation</i>
AFB ₁	0.041	0.104	0.9982	y = 0.9991x + 0.0001
AFB ₂	0.021	0.079	0.9975	y = 0.9741x - 0.0026
AFG ₁	0.058	0.202	0.9953	y = 0.9908x + 0.0353
AFG ₂	0.040	0.124	0.9985	y = 1.0071x - 0.0145
OTA	0.050	0.166	0.9981	y = 0.9981x - 0.0183

Çizelge 3. HPLC-FD yöntemiyle buğday unundan AFs ve OTA geri kazanımları

Table 3. The recoveries of AFs and OTA from wheat flour by HPLC-FD method

Mikotoksin <i>Mycotoxin</i>	Toksin ilavesi <i>Spiking</i> (µg/kg)	Geri Kazanım ^a <i>Recovery</i> (%)	Ortalama Geri Kazanım ^b <i>Mean Recovery</i> (%)	RSD ^c (%)
AFB ₁	0.8	95.7	99.5	4.82
	3.2	103.3		
AFB ₂	0.2	96.2	93.8	3.12
	0.8	91.6		
AFG ₁	0.8	90.6	98.6	8.67
	3.2	107.2		
AFG ₂	0.2	94.6	89.0	9.62
	0.8	83.0		
OTA	3.0	98.2	99.3	12.62
	10.0	104.9		

(a) Geri kazanım değerleri 10 tekrarın ortalamasıdır.

(b) Tüm geri kazanım değerleri ortalaması.

(c) RSD; bağıl standart sapma.

(d) Recovery was means of 10 replicates.

(e) Overall average recovery.

(f) RSD; Relative standard deviation

Hatay Yöresi Buğdaylarının Mikotoksin Düzeyleri

Bu çalışmada Hatay İli merkez (Antakya) ve çevre ilçelerinde bulunan değirmen ve un fabrikalarından toplanan buğday numuneleri öğütülerek unda; aflatoksin (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) ve OTA varlığı araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4'de verilmiştir.

Çalışmada LOQ değerinin üzerinde tespit edilen tüm örnekler, pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Buna göre toplam 29 un numunesinde test edilen aflatoksinler (AFs) içerisinde, AFB₁ (%44.8) en yaygın görülen mikotoksin olarak saptanmış, bunu sırasıyla; AFG₁ (%27.6) ve AFB₂ (%13.8)'nin takip ettiği görülmüştür (Çizelge 4). Analiz edilen buğday örneklerinde AFG₂'ye rastlanmamıştır. Çalışmada AFB₁ konsantrasyonu ortalama 0.246 µg/kg (0.136-0.484 µg/kg) olarak belirlenmiş (Çizelge 4) olup, LOQ değeri ile Avrupa Komisyonu maksimum limit değerleri arasında (0.104-2.000 µg/kg) 13 buğday unu

Hatay yöresi buğdaylarının Aflatoxin ve Okratoksin A açısından değerlendirilmesi

örneğinde (%44.8) AFB₁ tespit edilmiştir (Çizelge 5). Çalışmada Avrupa Komisyonu (European Commission, 2006a) ve Türk Gıda Kodeksi (Anonymous, 2011)'ne göre tahıl ve tahıl ürünlerinde AFB₁ maksimum limit değerinin (2 µg/kg) üstünde herhangi bir örnek tespit

edilmemiştir. Dört buğday ununda AFB₂ (0.090-0.190 µg/kg), 8 numunede ise AFG₁ (0.216-0.540 µg/kg) saptanmıştır. Analiz edilen örnekler AFB₁ yönünden RASFF bildirimlerinde tespit edilen düzeylerle (Çizelge 1) kıyaslandığında, oldukça düşük bulunmuştur.

Çizelge 4. Buğday unu örneklerinde tespit edilen AFs ve OTA düzeyleri

Table 4. AFs and OTA concentration in wheat flour samples

Mikotoksin <i>Mycotoxin</i>	Pozitif Örnek ^a n (%) <i>Positive samples n</i>	Konsantrasyon (µg/kg) <i>Concentration</i>	
		Ortalama ^b <i>Mean</i>	Değer Aralığı ^c <i>Range</i>
AFB ₁	13 (44.8)	0.246	0.136-0.484
AFB ₂	4 (13.8)	0.135	0.090-0.190
AFG ₁	8 (27.6)	0.354	0.216-0.540
AFG ₂	Tüm örneklerde AFG ₂ değerleri <LOQ olarak tespit edilmiştir		
OTA	24 (82.8)	17.785	0.174-137.880

(^a) Pozitif örnek: Tayin limiti (LOQ) değerlerinin (AFB₁ için 0.104 µg/kg, AFB₂ için 0.079 µg/kg, AFG₁ için 0.202 µg/kg, AFG₂ için 0.124 µg/kg ve OTA için 0.166 µg/kg) üstünde kalan örnek sayısı

(^b) Pozitif örneklerin ortalama konsantrasyon değerleri

(^c) Pozitif örneklerin minimum ve maksimum değerleri

(^d) *Positive samples: The samples which are over the limit of quantification (LOQ); 0.104 µg/kg for AFB₁; 0.079 µg/kg for AFB₂; 0.202 µg/kg for AFG₁; 0.124 µg/kg for AFG₂ and 0.166 µg/kg for OTA*

(^e) *Average concentration of positive samples*

(^f) *Min. and max. values of positive samples*

Çizelge 5. Buğday unu örneklerinde AFs ve OTA dağılımı

Table 5. Distribution of AFs and OTA in wheat flour samples

Mikotoksin <i>Mycotoxin</i>	Örneklerin mikotoksin dağılımı n (%) <i>Samples' distribution of mycotoxin n</i>				
	<LOD ^a	LOD-LOQ ^b	LOQ-Limit ^c	Limit-RASFF ^e	>RASFF ^e
AFB ₁	16 (55.2)	-	13 (44.8)	-	-
AFB ₂	14 (48.3)	11 (37.9)	4 (13.8) ^d	-	-
AFG ₁	15 (51.7)	6 (20.7)	8 (27.6) ^d	-	-
AFG ₂	22 (75.9)	7 (24.1)	-	-	-
OTA	5 (17.2)	-	19 (65.6)	2 (6.9)	3 (10.3)

(^{a, b}) Mikotoksinlerin LOD ve LOQ değerleri Çizelge 2'de verilmiştir

(^c) Avrupa Komisyonu (EC, 2006) ve TGK "Bulaşanlar Yönetmeliği"ne (Anonim, 2011) göre, tahıl ve tahıl ürünlerinde AFB₁ maksimum limit değeri 2 µg/kg olduğu bildirilmiştir. Yönetmelikte, OTA maksimum limit değerinin işlenmemiş tahıllarda 5 µg/kg, işlenmiş tahıl ve tahıl ürünlerinde ise 3 µg/kg olduğu bildirilmiştir.

(^d) Yasal düzenlemeler ile AFB₂ ve AFG₁ için maksimum limit değeri belirlenmemiştir. Dolayısıyla bu sütunda anılan mikotoksinler için >LOQ örnek sayısı verilmiştir.

(^e) RASFF sisteminde bildirim yapılan AFB₁ ve OTA mikotoksinlerinin ortalama düzeyleri Çizelge 1'de verilmiştir.

(^{a, b}) *LOD and LOQ values of mycotoxins are given in Table 2*

(^c) *According to European Commission (EC, 2006) and Turkish Food Codex (Anonymous, 2011) "Contaminants Regulation", the maximum permitted levels of AFB₁ is 2 µg/kg for all cereals and products derived from cereals, including processed cereal products. In the regulation, it is stated that the OTA maximum limit value is 5 µg/kg in unprocessed cereals and 3 µg/kg in processed cereal products and cereals intended for direct human consumption.*

(^d) *There is no set up maximum permitted levels for AFB₂ and AFG₁ by EU regulations in all cereals and products derived from cereals. Therefore, the number of samples are given as >LOQ for both mycotoxins.*

(^e) *The average levels of AFB₁ and OTA mycotoxins reported in the RASFF system are given in Table 1.*

Bakırcı (2014) çalışmasında 21'i buğday ve buğday temelli ürünler olmak üzere toplam 24 adet tahıl ürünüde yapmış olduğu aflatoksin analiz sonuçlarının, ölçüm limitlerinin altında olduğunu bildirmiştir. Bir başka çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 41 adet buğday numunesinde toplam AF düzeyi 10.4-643.5 ng/kg arasında belirlenmiştir (Giray vd., 2007). Araştırmacılar bu değerlerin Türkiye'de TAF için izin verilen limit değerinin altında olmasına rağmen, test edilen örneklerin %59'unun aflatoksin ile kontamine olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmada ayrıca, AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ için pozitif örnek oranı sırasıyla, %42, %12, %37 ve %12 olarak bildirilmiştir (Giray vd., 2007). ELISA yöntemi kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada, Trakya'nın 7 farklı bölgesinden toplanan 100 buğday unu numunesinin %45'inde TAF (0.05-14.01 µg/kg; ortalama: 0.79 µg/kg), %20'sinde AFB₁ (ortalama: 0.48 µg/kg) ve %81'inde OTA (2.07 µg/kg) tespit edilmiştir (Aydın vd., 2008). Bu örneklerin %2'sinde hem TAF hem de AFB₁ düzeyleri TGK ve Avrupa Komisyonu tarafından bildirilen sınır değerlerinin (sırasıyla; 4 ve 2 µg/kg) üzerinde olduğu rapor edilmiştir.

Çizelge 4 incelendiğinde, analiz edilen örnekler arasında en yaygın mikotoksinin %82.8'lik oranla (24/29) OTA olduğu görülmektedir. Pozitif olarak nitelendirilen numunelerin OTA düzeyleri, 0.174-137.880 µg/kg aralığında tespit edilmiş, ortalama değer ise 17.785 µg/kg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4). Test edilen örneklerin 19'unda, diğer bir ifadeyle %65.6'sında OTA değerleri, LOQ ile limit değerleri arasında tespit edilmiştir (Çizelge 5). Beş numunede ise, Avrupa Komisyonu (European Commission, 2006a) ve Türk Gıda Kodeksi (Anonymous, 2011)'ne göre işlenmemiş tahıllar için OTA en yüksek sınır değeri olan 5 µg/kg'ın üstünde saptanmıştır. Bu örneklerin %10.3'ü; on yıllık dönemde (2009-2018 yılları arasında) RASFF bildirimlerinde tespit edilen OTA düzeylerinin ortalamasından da yüksek bulunmuştur (Çizelge 5).

Karagözlü ve Karapınar (2000), aşurelik buğday, mısır, mısır unu, yulaf gevreği, yulaf ezmesi, yulaf unu ve müsli den oluşan toplam 100 adet gıda örneğinde OTA taraması yapmış ve analiz edilen

örneklerin %4'ünde OTA (0.27-9.84 µg/kg arasında) belirlemişlerdir. Trakya bölgesinde yapılan bir çalışmada, toplanan 100 buğday unu numunesinin %28'inde OTA'nın izin verilen limit değerinden yüksek bulunduğu rapor edilmiştir (Aydın vd., 2008). Ancak çalışmada her ne kadar buğday unu ile çalışıldığı bildirilmiş olsa da, elde edilen bulgular Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde işlenmemiş tahıllar için belirtilen üst limit değeri (5 µg/kg) ile değil; işlenmiş tahıl ve tahıl ürünleri için verilen üst limit değeri (3 µg/kg) ile kıyaslanmıştır. Dolayısıyla, çalışmada bildirilen yaklaşık üç buğday unu örneğinden birinde OTA varlığının tespit edilmiş olması bu duruma bağlı olabilir. Bir diğer çalışmada, analiz edilen 25 adet mısır ve mısır bazlı ürünlerde 17.79-126.2 µg/kg düzeyinde, 34 adet buğday ve buğday temelli ürünlerde ise, 2.02-3.56 µg/kg düzeyinde OTA tespit edilmiştir (Bakırcı, 2014). Çalışmada tahıl ve tahıl bazlı ürünlerin %6'sında OTA tespit edilirken, toplam analizi yapılan 67 örneğin %3'ünün Türk Gıda Kodeksi'ne göre belirlenen kabul edilebilir sınırların üstünde olduğu rapor edilmiştir.

Literatür incelendiğinde, ülkemizde tahıl ve fırıncılık ürünlerinde OTA'nın hem sağlık açısından hem de ticari olarak önemli bir problem olduğu açıkça görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen veriler, geçmiş yıllardan günümüze OTA kaynaklı bu problemin süregeldiğini açıkça ortaya koymaktadır.

SONUÇ

Araştırmanın ilk aşamasında tahıl ve fırıncılık ürünlerinde mikotoksin riski hakkında genel bir durum değerlendirmesi yapmak amacıyla, 2009-2018 yıllarını kapsayan dönemde RASFF sistemine üye tüm ülkelerden gelen bildirimler dikkate alınarak, yıllara göre aflatoksin ve OTA düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, yıllar içerisinde bildirim yapılan AFB₁, TAF ve OTA düzeyleri her ne kadar farklılık göstermiş olsa da, son yıllarda bu mikotoksinlerin tahıl ve fırıncılık ürünleri için hâlâ yüksek bir risk teşkil ettiği açıkça görülmektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, Hatay İli merkez (Antakya) ve çevre ilçelerde bulunan değirmen ve

un fabrikalarından toplanan buğdaylarda aflatoksin ve OTA varlığı araştırılmış, bulgular hem yasal sınırlamalar ile hem de RASFF bildirimlerinde tespit edilen düzeyler ile kıyaslanmıştır. Analiz edilen 29 buğday numunesinde AFB₁ değerlerinin; Avrupa Komisyonu (European Commission, 2006a) ve Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne (Anonymous, 2011) göre, tahıl ve tahıllardan üretilmiş ürünlerdeki maksimum limit değerinin altında kaldığı tespit edilmiştir. Bu buğday numunelerinin 5'inde ise, OTA düzeylerinin yukarıda anılan her iki yönetmelik tarafından bildirilen maksimum limit değerini (5 µg/kg) aştığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgular 2009-2018 yılları arasında tahıl ve fırıncılık ürünlerinde yapılan RASFF bildirimlerinde tespit edilen OTA düzeylerinin maksimum değerlerinin ortalaması (80.73 µg/kg) ile kıyaslandığında 3 buğday örneğinde (%10.3) bu değer üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Özetle, araştırma sonuçları değerlendirildiğinde, buğday numunelerinde OTA'nın primer olarak sağlık açısından dahası ticari olarak önemli bir problem olduğu açıkça görülmektedir.

Fırıncılık ürünlerinde OTA tespitinin en önemli nedenlerinden biri, hammadde olarak kullanılan tahılların bu mikotoksin ile bulaşı halinde olmasıdır. Fırıncılık ürünlerinin pişirilmesi esnasında OTA düzeyinin sadece beşte bir oranında azaldığı, bir diğer ifadeyle, bu mikotoksinin son üründe dikkate değer bir düzeyde kaldığı göz önünde bulundurulursa, tarladan-sofraya tahılların muhafaza koşullarının iyileştirilmesi ve gerekli denetimlerin artırılması önem arz etmektedir. Ayrıca, konuyla ilgili üreticiler, tahıl işletmeleri ve tüketici farkındalığını arttırmaya yönelik çalışmalar yürütülmelidir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

YAZAR KATKILARI

AS, makalenin metodoloji, biçimsel analiz, yazma–orijinal taslak ve görselleştirmesine katkı sunmuştur. MTM, kavramsallaştırma, metodoloji, biçimsel analiz, yazma–orijinal taslak, yazma–inceleme ve düzenleme, görselleştirme ve

danışman olarak katkı sağlamıştır. Yazarlar makalenin son halini okudu ve onayladı.

KAYNAKLAR

Amirahmadi, M., Shoeibi, S., Rastegar, H., Elmi, M., Mousavi Khaneghah, A. (2017). Simultaneous analysis of mycotoxins in corn flour using LC/MS-MS combined with a modified QuEChERS procedure. *Toxin Reviews*, 1-9.

Anonymous (2011). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmî Gazete, Ankara.

Anonymous (2007). The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2007. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2007_en.pdf, (Accessed: 06 May 2019).

AOAC (2016). AOAC (999.07). Official Methods of Analysis AOAC INTERNATIONAL. 20th Edition, Washington DC.

Aydın, A., Gunsen, U., Demirel, S. (2008). Total Aflatoxin, Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A levels in Turkish Wheat Flour. *J Food Drug Anal*, 16(2): 48-53.

Bakırcı, G.T. (2014). Tahıl ve Tahıl Ürünlerinin Aflatoksin, Okratoksin A, Zearalenon, Fumonisin ve Deoksinivalenol Mikotoksinleri Yönünden İncelenmesi. *Akademik Gıda*, 12 (2): 46-56.

Bushby, W.F., Wogan, G.N. (1979). Food-borne mycotoxins and alimentary mycotoxicoses. In: *Food-borne infections and intoxication*, Riemann, H., Bryan, F.L. (chief ed.), Academic Press, New York, pp. 519-610.

Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiol*, 27: 187-198.

European Commission (2002). Commission regulation (EC) No 657/2002 of 17 August 2002 council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L 221, 8-36.

- European Commission (2006a). Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 364, 5-23.
- European Commission (2006b). Commission regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 70, 12-34.
- Giray, B., Girgin, G., Engin, A.B., Aydın, S., Sahin, G. (2007). Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*, 18: 23-29.
- Hendrickse, R.G. (1997). Of sick turkeys, kwashiorkor, malaria, prenatal mortality, heroin addicts and food poisoning: research on the influence of aflatoxins on child health in the tropics. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91: 787-793.
- Kabak, B. (2012). Determination of aflatoxins and ochratoxin A in retail cereal products from Turkey by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Control*, 28: 1-6.
- Karagözü, N., Karapınar, M. (2000). Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Okratoksin-A ve Fungal Kontaminasyon. *Türk J Biol*, 24, 561–572.
- Lee, H.J., Ryu, D. (2017). Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal derived food products: Public health perspectives of their co-occurrence. *J Agric Food Chem*, 65(33): 7034-7051.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol*, 60: 218-237.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M. (2006). Food mycotoxins: an update. *J Food Sci*, 71(5): 51-65.
- RASFF Portal (2019). The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Portal Search Page. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/> (Accessed: 06 May 2019).
- R-Biopharm (2015). *Ochraprep application methods. Art. No A20P14.V9*. Glasgow, Scotland, UK: R-Biopharm Rhone Ltd.
- Sağlam, A., Masatcioğlu, M.T. (2020). Avrupa Birliği ve Türkiye kaynaklı gıdalarda 2009–2018 yılları arasında RASFF bildirimleri. *GIDA* (2020) 45(4) 623-634 doi: 10.15237/gida.GD20051.