



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**TÜRKİYE’ DE PİYASADA SATILAN HUBUBATLARDA
DEOKSİNİVALENOL VE OKRATOKSİN A’NIN YÜKSEK
BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE ARAŞTIRILMASI**

SEMİH ŞAHİN

BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜLDEN ZEHRA OMURTAG

İSTANBUL-2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Beslenme ve Diyetetik
Tez Sahibi : Semih ŞAHİN
Tez Başlığı : Türkiye 'de Piyasada Satılan Hububatlarda Deoksinivalenol ve Okratoksin A'nın Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Kampüs
Sınav Tarihi : 22.12.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Kurumu

İmza

Prof.Dr. Gülden Zehra OMURTAG

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Indrani KALKAN

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Ozan Emre EYUPOĞLU

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Burcu İrem KORKMAZ

Marmara Üniversitesi

Doç.Dr. Mustafa YAMAN

İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı bir davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tez Sahibinin Adı Soyadı

Semih ŞAHİN

TEŞEKKÜR

Tez çalışma konumun belirlenmesinden çalışmanın bitimine kadarki tüm süreçlerde beni yalnız bırakmayıp yönlendiren, deneyimlerini paylaşan, her konuda destek olup cesaretlendiren, hoşgörüsüyle ve anlayışıyla yolumu aydınlatan hem insani hem akademik yönden örnek aldığım çok değerli bilim insanı Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Gülden Zehra OMURTAG'a,

Çalışmanın planlanması ve yürütülmesi başta olmak üzere tüm aşamalarında desteklerini eksik etmeyen, akademik bilgi ve etiği ile örnek aldığım Hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa YAMAN'a,

Örneklerin toplanması ve yoğun laboratuvar analizleri boyunca desteklerini eksik etmeyen kıymetli meslektaşlarım ve arkadaşlarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Halime UĞUR ve Sayın Uzm. Dyt. Özge Pınar HIDIMOĞLU'na,

Kendi irademle hayatımda olan ve hayatımın her anında desteklerini eksik etmeyen ailemden ayırmadığım tüm dostlarıma,

Her fikrimde ve kararımda sorgusuz, maddi ve manevi hep arkamda olan canım babam Selahattin ŞAHİN ve canım annem Meryem ŞAHİN'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4.GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. Hububatların Tanımı ve Sınıflandırılması.....	7
4.2. Dünya’da ve Türkiye’de Hububat Üretimi ve Tüketimi.....	7
4.3. Hububatların Besin Ögesi Bileşimi ve İnsan Beslenmesindeki Önemi.....	9
4.4. Mikotoksinlerin Tanımı, Tarihi ve Mikotoksin Çeşitleri.....	10
4.5. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	11
4.6. Mikotoksinlerin İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	12
4.7. Deoksinivalenol Yapısı, Özellikleri ve Metabolizması.....	14
4.8. Deoksinivalenol Üreten Küfler ve Gelişme Şartları.....	15
4.9. Okratoksin A’nın Yapısı, Özellikleri ve Metabolizması.....	15

4.10. Okratoksin A Üreten Küfler ve Gelişme Şartları.....	17
4.11. Hububatlarda Deoksinivalenol ve Okratoksin A Varlığı.....	17
4.12. Hububatlarda Deoksinivalenol ve Okratoksin A Miktarını Belirleyen Yasal Düzenlemeler.....	20
4.13. Mikotoksin Analizlerinde Kullanılan Metodlar.....	23
5. MATERYAL VE METOD.....	25
5.1. Materyal.....	25
5.1.1. Örneklerin analize hazırlanması.....	25
5.2. Metod.....	25
5.2.1. Hububatlarda HPLC ile deoksinivalenol analizi metodu.....	25
5.2.1.1. <i>HPLC ile deoksinivalenol analizinde kullanılan sistem koşulları ve ekipmanlar</i>	26
5.2.1.2. <i>HPLC ile deoksinivalenol analizinde kullanılan kimyasallar ve hazırlanışları</i>	27
5.2.1.3. <i>Hububatlarda deoksinivalenol analizi için numune hazırlama ve ekstraksiyon</i>	28
5.2.2. Metod validasyonu.....	29
5.2.3. Hububatlarda deoksinivalenol risk tahmini.....	30
5.2.3.1. <i>Maruziyet değerlendirmesi ve risk karakterizasyonu</i>	30
5.2.4. Hububatlarda HPLC ile okratoksin A analizinin metodu.....	32
5.2.4.1. <i>HPLC ile okratoksin A analizinde kullanılan sistem koşulları ve ekipmanlar</i>	32

5.2.4.2. HPLC ile okratoksin A analizinde kullanılan kimyasallar ve hazırlanışları.....	33
5.2.4.3. Hububatlarda okratoksin A analizi için numune hazırlama ve ekstraksiyon.....	34
5.2.5. Metod validasyonu.....	35
5.2.6. Hububatlarda okratoksin A risk tahmini.....	36
5.2.6.1. Maruziyet değerlendirmesi ve risk karakterizasyonu.....	36
6. BULGULAR.....	39
6.1. Deoksinivalenol Analizi İçin Kullanılan Metod Performansının Değerlendirilmesi.....	39
6.2. Aşurelik Buğday, Pirinç, Mısır Unu Ve Tam Buğday Unu Örneklerinde DON Varlığı Ve Miktarı.....	40
6.3. Okratoksin A Analizi için Kullanılan Metod Performansının Değerlendirilmesi.....	43
6.4. Aşurelik Buğday, Pirinç, Mısır Unu Ve Tam Buğday Unu Örneklerinde OTA Varlığı Ve Miktarı.....	44
6.5. Aşurelik Buğday, Pirin., Mısır Unu Ve Tam Buğday Unu Örneklerinde DON Ve OTA Açısından Risk Tahmini.....	47
6.5.1. Maruziyet değerlendirmesi ve risk karakterizasyonu.....	47
7. TARTIŞMA.....	51
8. SONUÇ.....	57
9. KAYNAKLAR.....	59
10. ÖZGEÇMİŞ.....	74

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ATA: Alimantar Toksik Alökia (Alimentary Toxic Aleukia)

BEN: Balkan Endemik Nefropatisi

BMDL: Kıyaslama Dozu Alt Limiti (Benchmark Dose Lower Limit)

CAC: Kodeks Alimentarius Komisyonu (Codex Alimentarius Commission)

DON: Deoksinivalenol

EC: Avrupa Komisyonu (European Commission)

EDI: Tahmini Günlük Alım (Estimated Daily Intake)

EFSA: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)

ELİSA: Enzim bağlanmış immunosorbent yöntemi

FAO: Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)

FDA: Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)

GC: Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography)

GC-MS: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

HPLC: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid

Chromatography)

HPLC-FLD: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Floresans Dedektör (High

Performance Liquid Chromatography-fluorescence detector)

IAK: İmmunoaffinite Kolon (Immunoaffinity column)

JECFA: Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (Joint FAO/WHO Expert

Committee on Food Additives)

kg: kilogram

LB: Tahmini Alt Sınır (Lower Bound Estimate)

LC: Sıvı Kromatografisi (Liquid Chromatography)

LC-MS/MS: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

LOD: Tespit Limiti (Limit of Detection)

LOQ: Tayin Limiti (Limit of Quantification)

MB: Tahmini Orta Sınır (Medium Bound Estimate)

mg: miligram

µg: mikrogram

ML: Maksimum Limit

MoE: Maruz Kalma Marjı (Margin of Exposure)

MS: Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometry)

ng: nanogram

OTA: Okratoksin A

OTB: Okratoksin B

OTC: Okratoksin C

ppb: milyarda bir kısım (Part per billion (µg/kg))

ppm: milyonda bir kısım (Part per million (µg/g))

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)

R²: Korelasyon Katsayısı

TDI: Günlük Tolere Edilebilir Limit (Tolerable Daily Intake)

TGK: Türk Gıda Kodeksi

TLC: İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography)

UB: Tahmini Üst Sınır (Upper Bound Estimate)

UV: Ultraviyole (Ultraviolet)

v.a.: vücut ağırlığı

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ZEN: Zearalenon



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.2.1. Dünya hububat bilgileri (milyon ton).....	7
Tablo 4.2.2. Dünya hububat üretim miktarları (milyon ton).....	7
Tablo 4.4.1. Bazı küf türleri ve bu türlerin oluşturduğu mikotoksinler.....	11
Tablo 4.12.1. Bazı gıdalarda bulunabilecek mikotoksinlerin ülkelere göre tolere edilebilir seviyeleri.....	22
Tablo 4.12.2. DON ve OTA'a ait maksimum limit değerleri.....	23
Tablo 6.2.1. Aşurelik buğday örneklerinde HPLC ile DON analiz sonuçları...	40
Tablo 6.2.2. Pirinç örneklerinde HPLC ile DON analiz sonuçları.....	41
Tablo 6.2.3. Mısır unu örneklerinde HPLC ile DON analiz sonuçları.....	41
Tablo 6.2.4. Tam buğday unu örneklerinde HPLC ile DON analiz sonuçları...	42
Tablo 6.4.1. Aşurelik buğday örneklerinde HPLC ile OTA analiz sonuçları...	44
Tablo 6.4.2. Pirinç örneklerinde HPLC ile OTA analiz sonuçları.....	45
Tablo 6.4.3. Mısır unu örneklerinde HPLC ile OTA analiz sonuçları.....	45
Tablo 6.4.4. Tam buğday unu örneklerinde HPLC ile OTA analiz sonuçları...	46
Tablo 6.5.1.1. Hububatlarda DON'un MB, LB ve UB düzeylerdeki tahmini konsantrasyon miktarları, tahmini günlük alımları ve diyetset maruziyetleri...	49
Tablo 6.5.1.2. Hububatlarda OTA'nın MB, LB ve UB düzeylerdeki tahmini konsantrasyon miktarları, tahmini günlük alımları ve diyetset maruziyetleri...	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1. Türkiye tahıl ekim alanları (%).....	9
Şekil 4.7.1. DON, asetil türevleri ve DON-3G kimyasal yapıları.....	14
Şekil 4.9.1. Okratoksinlerin kimyasal yapıları.....	16
Şekil 4.13.1. YBSK analizi akış şeması.....	24
Şekil 5.2.1.1. Aliminyum oksit, celite, aktif kömür (0.35 g, 0.25 g 0.40 g). Kartuş çapı 13 mm. *Whatman No. 4 filtre kağıdı.....	26
Şekil 5.2.2.1. Deoksinivalenol kalibrasyon eğrisi.....	29
Şekil 5.2.5.1 Okratoksin A kalibrasyon eğrisi.....	35
Şekil 6.1.1. DON standardına ait HPLC kromatogramı (DON: 5 µg/mL).....	39
Şekil 6.2.1. DON ile kontamine olmuş mısır unu örneğine ait HPLC kromatogramı.....	42
Şekil 6.2.2. DON bulunmayan mısır unu örneğine ait HPLC kromatogramı...	43
Şekil 6.3.1. OTA standardına ait HPLC kromatogramı (OTA: 2 µg/mL).....	43
Şekil 6.4.1. OTA ile kontamine olmuş tam buğday unu örneğine ait HPLC-FLD kromatogramı.....	46
Şekil 6.4.2. OTA içermeyen tam buğday unu örneğine ait HPLC-FLD kromatogramı.....	47

1. ÖZET

TÜRKİYE’ DE PİYASADA SATILAN HUBUBATLARDA DEOKSİNİVALENOL VE OKRATOKSİN A’NIN YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE ARAŞTIRILMASI

Hububat ve hububat bazlı gıdalarda mikotoksin maruziyeti sıklıkla görülmektedir. Bu gıda ürünlerinde mikotoksin yaygınlığının ve düzeylerinin tespiti, alınacak önlemlerle ülkelerin belirlediği mikotoksin düzeylerinin altına düşülmesine ve tüketicilerin sağlık risklerinin önlenmesine imkân sağlamaktadır. Bu araştırma, İstanbul'daki marketlerden (markalı ürünler) ve %50’ si açıkta satışı yapılan semt pazarlarından temin edilen 24 adet aşurelik buğday, 24 adet pirinç, 24 adet mısır unu ve 24 adet tam buğdayunun deoksinivalenol (DON) ve okratoksin A (OTA) düzeylerinin UV dedektörlü ve floresans dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile incelenmesi, varsa miktarlarının tespit edilmesi ve diyetel maruziyet risklerinin hesaplanması amacıyla yapılmıştır. 96 adet hububat örneğinin HPLC ile analizi sonucunda 25 adet örnekte (0,13-1,16 µg/kg) DON tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 0,28-0,92 µg/kg). Analizi yapılan örneklerden; 7 adet aşurelik buğday, 8 adet pirinç, 8 adet mısır unu ve 2 adet tam buğday ununda DON saptanmıştır. En yüksek DON düzeyi açıkta satılan mısır unu örneğinde (1,16 µg/kg) tespit edilmiştir. Örneklerin 11 adedinde (0,87-6,97 µg/kg) OTA tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 0,029-0,097 µg/kg). Analizi yapılan örneklerden; 3 adet mısır ununda (1,51-2,23 µg/kg) ve 8 adet tam buğday ununda (0,87-6,97 µg/kg), OTA saptanmıştır. En yüksek OTA düzeyi marketten alınan paketli tam buğday unu örneğinde (6,97 µg/kg) saptanmıştır. Maruziyet marjı açısından incelenen tüm ürün gruplarında her iki toksin için de değerler >10,000 olup bir sağlık riski oluşturmadığı görülmüştür. Araştırmamız sonucunda, hububatlarda DON ve OTA maruziyetinin sıklıkla gözlenebileceğini ve olası riskli seviyelere çıkabileceği görüldüğü için; daha fazla çalışma yapılarak, gerekli önlemler ile kontaminasyon riskinin en aza indirilmesi gerekliliği ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler; Deoksinivalenol, diyetel maruziyet, HPLC, hububat, Okratoksin A

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF DEOXYNIVALENOL AND OCHRATOXIN A IN CEREALS SOLD IN THE MARKET IN TURKEY BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Mycotoxin exposure is common in cereals and cereal-based foods. Detection of mycotoxin prevalence and levels in these food products allows to reduce the mycotoxin levels determined by the countries with the measures to be taken and to prevent the health risks of consumers. This research was conducted to determine the deoxynivalenol (DON) and ochratoxin A (OTA) levels of 24 pieces of wheat flour, 24 pieces of rice, 24 pieces of corn flour and 24 pieces of whole wheat flour obtained from the markets (branded products) in Istanbul and the street markets, 50% of which are sold openly, by HPLC method with UV detector and fluorescence detector, to determine the amount and to calculate the dietary exposure risks. As a result of HPLC analysis of 96 grain samples, DON (LOD-LOQ, 0,28-0,92 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was detected in 25 samples (0,13-1,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$). DON was determined in 7 pieces of ashura wheat, 8 pieces of rice, 8 pieces of corn flour and 2 pieces of whole wheat of the analyzed samples. DON level was found in the corn flour sample (1,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sold in the open. OTA was detected in 11 of the samples (0,87-6,97 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (LOD-LOQ, 0,029-0,097 $\mu\text{g}/\text{kg}$). OTA was detected in 3 corn flours (1.51-2.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and 8 whole wheat flours (0,87-6,97 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of the analyzed samples. The highest OTA level was found in packaged whole wheat flour sample (6,97 $\mu\text{g}/\text{kg}$) bought from the market. Values for both toxins in all product groups examined in terms of exposure margin were $>10,000$ and it was seen that it did not pose a health risk. As a result of our research, since DON and OTA exposure can be observed frequently in cereals and may increase to possible risky levels; further work should be done and the risk of contamination should be minimized with the necessary precautions.

Key words: cereals, Deoxynivalenol, dietary exposure, HPLC, Ochratoxin A

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Mısır, buğday ve arpa gibi hububatlar, dünyadaki çoğu insan tarafından birincil enerji ve besin kaynağı olarak kullanılmaktadır (Lee ve Ryu, 2017; Mishra ve ark., 2013; Nematollahi ve ark., 2019). Bununla birlikte, zengin protein, yağ ve mineral içeriklerine sahip ürünler; uygun koşullarda küflerin gelişimine ortam oluşturlar (Heshmati ve ark., 2017; Kyei ve ark., 2020). Hasat öncesi ve hasat sonrası aşamalarda mahsullerin, özellikle hububatların küflerle kirlenmesi, mikotoksinler olarak bilinen ikincil toksik metabolitlerin üretimine yol açabilmektedir (Lee ve Ryu, 2017). Başlıca mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps* ve *Fusarium* türleri tarafından üretilen, aflatoksinler, deoksinivalenol (DON), T-2 toksin gibi trikotesenler, fumonisinler, zearalenon (ZEN) ve okratoksin A (OTA) 'dır (Amirahmadi ve ark., 2019; Udovicki ve ark., 2018). Bunlar arasında, mısır, buğday, arpa gibi hububatlar ile ilişkili en yaygın mikotoksinlerden biri olan deoksinivalenol, aynı zamanda vomitoxin olarak adlandırılır (tip B trichothecene) (Sobrova ve ark., 2010). DON esas olarak *F. graminearum* ve *F. culmorum* gibi *Fusarium* türleri tarafından üretilmektedir. DON ilk önce Japonya'da (1972) küflü arpa ile izole edilmiş ve DON'un Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) mısır ürününde bulunan emetik faktörle aynı olduğu bulunmuştur (Coppock ve ark., 1985; Richard ve ark., 1993).

Yaygın olarak görülen bir diğer mikotoksin türü ise okratoksinlerdir. Okratoksinler (OTA, OTB, OTC), özellikle *P. verrucosum*, *A. ochraceus* ve *A. carbonarius* olmak üzere *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerinin çeşitli türlerinden sentezlenen ikincil metabolitlerdir (EFSA, 2006). Okratoksinler ilk olarak 1965 yılında Güney Afrika'da mantar kültürlerinden tanımlanmış olup, OTA, OTB ve OTC gibi üç türevi olduğu bulunmuştur (Van der Merwe ve ark., 1965; Atumo, 2020).

Dünyada hasat edilen ürünlerin %25-50'sinin her yıl mikotoksinlerle kontamine olduğu bildirilmiştir (Ricciardi ve ark., 2013). Besinlerin işlenmesi

sırasında oluşan reaksiyonlar, DON ve OTA'nın hububatlarda olabileceğini göstermiştir (Berthiller ve ark., 2013; Rychlik ve ark., 2014). Depolanan hububatlarda küflerin büyümesi ve mikotoksin biyosentezini arttıran başlıca faktörler yüksek tane nemi (%16-30), yüksek tane sıcaklığı (25-32°C) ve yüksek hava bağıl nem (%80-100) olarak bilinmektedir (Shanahan ve ark., 2003). DON üretimi için optimum sıcaklık 26-30°C arasında değişmektedir (Milani, 2013). Bazı *Aspergillus* türleri yüksek nem ve sıcaklık koşulları altında okratoksin üretirken, bazı *Penicillium* türleri 5°C kadar düşük sıcaklıklarda dahi okratoksin oluşturabilmektedirler (Gupta ve ark., 2018). OTA üretimi için optimum sıcaklık *A. ochraceus*, *A. niger* ve *A. carbonarius* için sırasıyla 25-30°C, 20-25°C ve 10-20°C olarak belirtilmektedir (Atumo, 2020; Bui-Klimke ve Wu, 2015). 2-3°C'lik bir sıcaklık artışının küf gelişimine veya böcek istilasına işaret ettiği belgelenmiştir (Neme ve Mohammed, 2017). Bununla birlikte, mikotoksin seviyelerini azaltmada en etkili birim işlemleri ayıklama, temizleme gibi çürümüş parçaların veya tanelerin fiziksel olarak çıkarılmasını içeren işlemler gibi görülmektedir (Bullerman ve Bianchini, 2007). Mikotoksinlerin kimyasal yapısı, sıcaklık ve koşullar, işlem süresi, işlem sırasında nem oranı veya nemin olmaması gibi çeşitli faktörler spesifik işlem aşamaları sırasında mikotoksin oluşumunu etkileyebilmektedir (Lancova ve ark. 2008; Amirahmadi ve ark. 2017; Rastegar ve ark., 2016; Scudamore, 2008; Scudamore ve ark., 2009; Fandohan ve ark., 2005; Karlovsky ve ark., 2016).

Fusarium toksinleri arasında DON, buğdayda Fusarium Head Blight oluşumunun en yaygın ve önemli bir göstergesidir (EFSA, 2013). İnsanlarda DON'la ilgili kronik maruziyet hakkında yetersiz toksikolojik veri olmakla birlikte, 2010 yılında Gıda Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) ve Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) tarafından değerlendirilmiştir ve DON için günlük 1 µg/kg maksimum tolere edilebilir günlük alım (PMTDI) olarak belirlenmiştir (EFSA, 2017). Tüketicileri yüksek DON seviyelerine maruz kalmaktan korumak için, dünya çapındaki düzenleyici otoriteler hem işlenmemiş hem de işlenmiş tahıllar ve hububatlar için maksimum seviyeler belirlemişlerdir (EC, 2006; FDA, 2010). Örneğin Avrupa Birliği (AB) ve Türk Gıda Kodeksi; buğday, yulaf ve mısır dışındaki işlenmemiş hububatlarda DON,

1250 µg/kg, işlenmemiş buğday, yulaf ve mısırdaki 1750 µg/kg, doğrudan kullanım amaçlı hububatta 750 µg/kg, tahıl unu, kepek ve ruşeym ile makarna, ekmek, hamur işleri, tahıl atıştırma kalıpları ve kahvaltılık gevrekler için 500 µg/kg, bebekler ve küçük çocuklar için tahıl bazlı gıdalar ve bebek mamaları için 200 µg/kg maksimum seviyeleri belirlemişlerdir (EC, 2006). Aynı zamanda Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), buğday ürünleri (un, kepek ve tohum) için 1000 µg/kg, hububat ve hububat bazlı ürünler için 10 mg/kg ve damıtıcılar ve bira tahılları için 30 mg/kg hayvan yemleri için 5 ile 10 mg/kg arasında tavsiye seviyeleri belirlemiştir (FDA, 2010).

OTA ve diğer mikotoksinlerle ilgili ilk olarak 1993 yılında AB’de halk sağlığını korumak amacıyla spesifik kontaminantlar için maksimum tolerans limitlerinin oluşturulması gerektiği kararı AB ‘Council Regulation (EEC) No 315/93’ sayılı tüzüğünde verilmiştir (EC, 1993). 2006 yılında yayımlanan AB ‘Commission Regulation (EC) No 1881/2006 sayılı tüzüğünde OTA ile ilgili olarak daha önce belirlenmiş olan hububat (5 µg/kg), işlem görmüş hububat bazlı gıdalar (3 µg/kg) ve kurutulmuş asma meyveleri (10 µg/kg), bebek/küçük çocuk ek gıdaları ve bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet ek gıdalarının (0,5 µg /kg) yanı sıra kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve (5 µg/kg), kahve ekstratı, çözünebilir kahve (10 µg/kg) için de değerler belirlenmiştir (EC, 2006). AB ve Türk Gıda Kodeksi (TGK) ise OTA’nın hububatlarda bulunabileceği maksimum limit değerlerini; işlenmemiş hububatlarda 5 µg/kg, işlenmemiş hububatlardan elde edilen tüm ürünlerde (doğrudan insan tüketimine sunulan hububat ve işlenmiş hububat ürünleri dahil) 3 µg/kg, bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar ve bebek/küçük çocuk ek gıdalarda 0,5 µg/kg olarak belirlemiştir (EC, 2006).

Mikotoksinler, karsinojenik, teratojenik, immunotoksik, nefrotoksik ve östrojenik etkiler gibi kronik etkilerinden dolayı insan sağlığına zararlıdır (Zain, 2011; Coppa ve ark., 2019). Triketesinlerle deney hayvanlarında in vivo ve in vitro yapılan toksikolojik çalışmalarda çeşitli toksik etkileri gösterilmiştir (Lu ve ark.,2013). Triketesinlerle ilgili toksik etkilerden bazıları mitokondriyal disfonksiyon, protein inhibisyonu, immunosupresyon, sitotoksikite, kan hücresi

sayısında değişiklikler olarak sayılabilir (Cano-Sancho, ve ark., 2011). Ayrıca cilt ve mukoza zarında bozukluk, iştahsızlık, kusma, karın ağrısı, hemorajik bozukluklar, kardiyovasküler disfonksiyon olarak gözlenmiştir (Galbenu-Morvay ve ark, 2011).

Hububatlarda mikotoksin maruziyetinden kaçınmak neredeyse imkansızdır. Ancak, bu gıda ürünlerinde mikotoksin yaygınlığının ve düzeylerinin tespiti, alınacak önlemlerle ülkelerin belirlediği mikotoksin düzeylerinin altına düşürülmesi ve tüketicilerin sağlık risklerinin önlenmesine imkân sağlamaktadır. Bu çalışmanın amacı, Türkiye’ de satılan hububatlarda DON ve OTA düzeylerinin UV dedektörlü ve floresans dedektörlü (FLD) HPLC yöntemi ile belirlenmesidir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Hububatların Tanımı ve Sınıflandırılması

Danelerinin büyük bir kısmı nişastadan oluşan, öğütüldüğünde un ve kepek elde edilen; ayrıca protein, yağ ve mineral maddeleri içeren ve yetiştirilmesinde belirli bir sıcaklık isteği olan ürün grubuna hububat (tahıl) denmektedir. Hububatlar; un, ekmek, makarna, bisküvi gibi birçok yiyeceğin hazırlanmasında kullanılmaktadır ve buğday, arpa, çavdar, yulaf, mısır, pirinç/çeltik olarak türlere ayrılmaktadırlar (Elgün ve Ertuğay, 2002).

4.2. Dünya’da ve Türkiye’de Hububat Üretimi ve Tüketimi

Hububat üretimi, temelde mısır üretimindeki artış nedeniyle 2020/21 döneminde önceki dönemin yaklaşık %2 üzerinde 2,2 milyar ton seviyesindedir. Hububat ürünlerinde buğday, mısır, arpa, yulaf, çavdar üretiminde artış kaydedilmiştir (TMO, 2020).

Tablo 4.2.1. Dünya hububat bilgileri (milyon ton) (TMO, 2020)

	2015/ 16	2016/ 17	2017/ 18	2018/ 19	2019/ 20	2020/ 21
Üretim	2.058	2.128	2.142	2.139	2.185	2.226
Tüketim	2.013	2.126	2.152	2.164	2.190	2.235
Ticaret	346	353	369	364	395	416
Stok	598	658	648	625	617	609

Tablo 4.2.2. Dünya hububat üretim miktarları (milyon ton) (TMO, 2020)

	2015/ 16	2016/ 17	2017/ 18	2018/ 19	2019/ 20	2020/ 21
Buğday	740	757	763	732	762	774
Mısır	1.023	1.132	1.090	1.129	1.125	1.140
Arpa	150	148	145	139	156	159
Yulaf	22	24	24	22	23	26
Çavdar	13	13	13	11	13	15
Dünya	2.058	2.189	2.139	2.141	2.185	2.226

Dünya buğday üretimi 2020/21 sezonunda %1,4 artışla 773 milyon ton olmuştur ve bu miktar son birkaç yılda kaydedilen en yüksek üretim miktarı olmuştur. Artış büyük oranda Rusya, Kazakistan, Avustralya ve Kanada'da gözlemlenirken, Avrupa Birliği, Birleşik Krallık ve Arjantin'in üretimlerinde düşüş kaydedilmiştir. Buğdayın besin ve yem kullanımındaki artışla bu yıllarda tüketim %2 artarak 756 milyon tona ulaşmıştır (TMO, 2021).

Dünya 2020/21 arpa üretimi, geçen sezonun 2,4 milyon ton üzerinde 158 milyon ton rekor seviyesinde gerçekleşmiştir. Bu artış büyük oranda Avustralya üretiminin 4 milyon ton artmasından kaynaklanmaktadır (TMO, 2021).

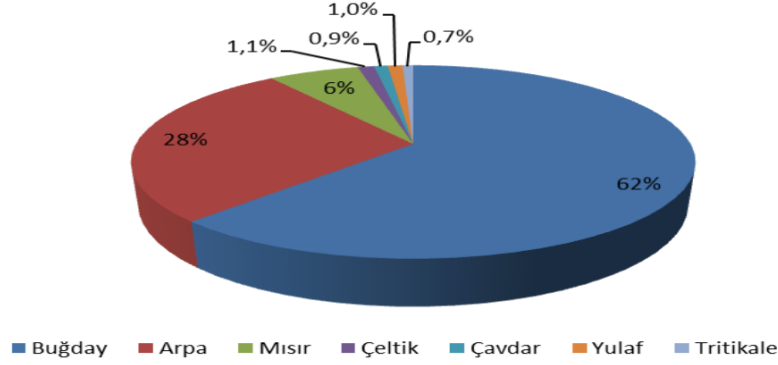
Mısır, 2020/21 Dünya üretimi %1 artışla 1,1 milyon ton seviyesine yükselmiştir. 2021/22 sezonunda ekiliş alanında beklenen %1'lik artışla üretimin %5 oranında artması öngörülmektedir (TMO, 2021).

Dünya pirinç üretimi 2020/21 döneminde %1,3 artarak 503,6 milyon ton seviyesinde gerçekleşmiştir. Üretimin yarısından fazlası Çin ve Hindistan'da yapılmaktadır. Üretimdeki artış özellikle Hindistan, ABD ve Tayland'da ekili alanların artışından kaynaklanmaktadır. 2020/21 dönemi dünya pirinç stokları da 175,8 milyon ton ile rekor seviyededir. Tüketim ise 502,2 milyon ton ile bugüne kadarki en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu artış tamamen nüfus artışından kaynaklı olup kişi başına tüketim fazla değişmemiştir (TMO, 2021).

Ülkemiz, geniş bir ürün yelpazesine imkan veren iklim ve ekolojik özellikleri nedeniyle tarımsal üretim açısından avantajlı bir ülkedir. Hububat ürünlerinden temin edilen ürünlerle gerçekleştirilen mamul madde dış ticareti, ülke ekonomisine önemli bir gelir sağlamaktadır. Ülkemiz dünya un ihracatında birinci, makarna ihracatında ikinci sırada yer almaktadır (TMO, 2020).

Türkiye, yüz ölçümünün %29,5'i (23,14 milyon hektar) ile tarım yapabilir özelliktedir. Tarım alanlarının nadas alanları hariç %67,5'i tarla ziraatına ayrılmıştır. Bu alanın yaklaşık %71'inde (11,13 milyon hektar) hububat ekilmektedir. Hububat ekim alanı içerisinde %62'lik payla ilk sırada buğday,

%28'lik pay ile ikinci sırada arpa ve %6,2'lik payla üçüncü sırada mısır yer almaktadır (Şekil 4.2.1) (TMO, 2020).



Şekil. 4.2.1. Türkiye tahıl ekim alanları (%)

4.3. Hububatların Besin Ögesi Bileşimi ve İnsan Beslenmesindeki Önemi

Hububatlar, dünyada genellikle tüm ülkelerin temel besini olması nedeniyle sıklıkla zenginleştirilebilen ürünlerdir ve ortalama günlük enerjinin %50'sini sağlamaktadırlar. Türkiye'de hububatlar ve türevleri günlük kalorisinin %58'ini karşılamaktadır ve günlük ortalama 3500 kalorilik enerjinin %44'ü ekmekten, %14'ü bulgur, makarna ve pirinçten gelmektedir. Hububatlar insan beslenmesinde önemli rol oynamakta olup; spesifik karbonhidratlar, protein, lipid, lif ve geniş vitamin ve mineral kaynağıdır (Kockova ve Valik, 2011).

Dünya çapında beslenmede ana enerji, karbonhidrat ve bitkisel protein kaynağı olarak önem arz eden hububatların sadece %41'i insan tüketimi, %35 kadarı ise hayvan yemi için kullanılmaktadır. Hububatların, çevresel olarak sürdürülebilir ve sağlıklı bitkisel protein kaynağı olarak sürdürülebilir bir besin sistemine geçişte önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir (Davies, 2020).

Hububatlar, insan diyetinde uzun zamandır diyet lifi de dahil en önemli karbonhidrat kaynağı olarak kabul edilmiştir; ancak protein alımına katkıları çok az ilgi görmüştür. Yetişkin popülasyonlarda tüketilen hububat miktarına ve kalitesine bağlı olarak önemli bir enerji (alınanın %30'u), protein (%25-30), karbonhidrat (%40-45, lif (%40-45) ve tiamin (%25-35), folat (%30-35), demir

(%40-45), kalsiyum (%10-30, selenyum (%20) gibi vitamin ve minerallerin kaynağıdır (McKevith, 2004).

Bitkisel protein kaynakları tüketimi ile hastalık veya ölüm riski arasındaki ilişki çalışmalarda nadiren ele alınmaktadır. Ancak, bitkisel protein ile hayvansal protein tüketiminin hastalık riski ile arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar; yüksek hayvansal protein alımı ile artmış kardiyovasküler hastalık ile ilişkilendirilirken yüksek bitkisel protein alımı tüm nedenlere bağlı ölüm ve kardiyovasküler hastalık ile ters orantılı ilişkilendirilmiştir (Song ve ark., 2016; Qui ve Shen, 2020). Bu çalışmalara ek olarak, 200'den fazla diyet müdahale çalışması sonucu; hububat ve ürünlerinin tüketiminin vücut ağırlığını azalttığını, toplam kolesterolü düşürdüğünü, sistolik kan basıncını, tokluk glikoz ve insülin homeostazını iyileştirdiğini ve inflamatuvar belirteçleri azalttığını göstermiştir (Reynolds ve ark., 2019; Marventano ve ark., 2017; Hajihashemi ve ark., 2019; Hui ve ark., 2019; Hollænder ve ark., 2015).

4.4. Mikotoksinlerin Tanımı, Tarihçesi ve Mikotoksin Çeşitleri

Doğada yaygın olan küfler gelişimi için uygun durumlarda (sıcaklık, nem, vb.) tarımsal ürünlerde gelişerek ve bu ürünlerin kullanımıyla elde edilen besinler ve yemlerde çeşitli toksik madde oluşturmaktadırlar (Van Egmond, 1989). Bu tarımsal ürünlerin hasat öncesi ve hasat sonrası aşamalarda mahsullerin, özellikle hububatların küflerle kirlenmesi, mikotoksinler olarak bilinen ikincil toksik metabolitlerin üretimine yol açabilmektedir (Lee ve Ryu, 2017). Mikotoksin kelimesi Yunanca'da mantar anlamına gelen 'mykes' ile Latince'de zehir anlamına gelen 'toxicum' kelimelerinin birleşimiyle oluşturulmuştur. Mikotoksinli ürünlerin tüketiminden kaynaklı insan ve hayvan sağlığı sorunlarına 'mikotoksikozis' denilmektedir (Anonim, 2015).

Tablo 4.4.1. Bazı küf türleri ve bu türlerin oluşturduğu mikotoksinler (Taydaş, 2006)

Küf türleri	Mikotoksinler
<i>A.flavus, A.parasiticus, A.nomius</i>	Aflatoksin B1, B2 (M1, M2)
<i>A.Parasiticus, A.nomius</i>	Aflatoksin G1, G2
<i>A.ochraceus, P.viridicatum, P.cyclopium, P.verrucosum</i>	Okratoksin A
<i>P.expansum, A.clavatus</i>	Patulin
<i>F.culmorum, F.graminearum, F.sporotrichioides</i>	Deoksinivalenol
<i>F.sporotrichioides, F.poa</i>	T-2 toksin
<i>F.sporotrichioides, F.poa, F.graminearum</i>	Diasetoksisirpenol
<i>F.sporotrichioides, F.culmorum, F.graminearum</i>	Zearalenon
<i>F.moniliforme, F.verticillioides</i>	Fumonisinler
<i>A.coenophialum</i>	Ergopeptine alkaloidleri
<i>A.lolii</i>	Lolitrem alkaloidleri
<i>Pithomyces chartarum</i>	Sporidesmin

Mikotoksin üreten küfler mikotoksijenik olarak bilinmektedirler. Bazı küfler birden fazla mikotoksin üretebilir ve bazı mikotoksinler de birden fazla küf türü tarafından üretilmektedirler. Günümüzde kanserojenik ya da toksik etkisi olan, 100'den fazla küf tarafından üretilen yaklaşık 400 mikotoksin bilinmektedir (Luo ve ark., 2018). Başlıca mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps* ve *Fusarium* türleri tarafından üretilen, aflatoksinler, deoksinivalenol, T-2 toksin gibi trikotesenler, fumonisinler, zearalenon ve okratoksin A'dır (Amirahmadi ve ark., 2019; Udovicki ve ark., 2018). Ülkemizde mikotoksin sorunu ilk olarak Kanada'ya 1967 yılında ihraç edilen fındıkların aflatoksin miktarının limitlerin üzerinde olması tespitiyle geri çevrilmesiyle raporlanmıştır (Artık, 2007).

4.5. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Mikotoksijenik küfler, dünyadaki tarımsal bölgelerin çoğunluğunda yaygın görülen patojenlerdir. Çok çeşitli etkenlerde mevcut olup büyüyebilirler ve farklı etkiler altında mikotoksin üretimlerini gerçekleştirebilirler.

Mikotoksinler ile kontaminasyon genellikle tarlada başlayıp hasat, kurutma ve depolama gibi aşamalarda artış gösterebilir ve besin zincirinin farklı noktalarında da oluşabilmektedir (Iqbal ve ark., 2018; Dauo ve ark., 2021).

Tarladaki nem ve sıcaklık başta olmak üzere iklimsel koşullar mikotoksin gelişimini, hayatta kalmasını, sıklığını ve sonrasındaki toksin birikimini önemli ölçüde etkilemektedir (Doohan ve ark., 2003). Küf gelişimi için optimal koşullar her daim mikotoksin üretimine yol açmamakla birlikte, genellikle 25-30 °C arasındaki sıcaklık, 0,78'den yüksek su aktivitesi, %88-95 arasındaki bağıl nem, asidik pH gibi faktörler küf gelişimi ve sonrasında mikotoksin üretimi için uygun şartlar olarak kabul görmektedir (Dauo ve ark., 2021; Thanushree ve ark., 2019).

4.6. Mikotoksinlerin İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkileri

Fusarium küfleri toprakta yaygın olup trikotesenler, ZEN ve fumonisler gibi bir takım farklı toksin üretmektedirler. Küflerin ve toksinlerin oluşumu bazı hububat türlerinde meydana gelebilmektedir. *Fusarium* türlerinin ürettiği çok çeşitli toksik bileşikler arasında en büyük ekonomik etki DON ve türevleriyle ilgilidir. Belirli hububatlar farklı *fusarium* toksinleri ile ilişkilendirilir. Örneğin hem DON hem de ZEN sıklıkla buğday, T-2 ve HT-2 toksinleri yulaf ve fumonisinler mısır ile ilişkilidir (WHO, 2018; Munkvold, 2017). Trikotesenler, insan sağlığı için akut toksik olup ciltte ani tahriş, bağırsak mukozasında hızlı bir şekilde tahrişe neden olup ishale yol açabilmektedirler. Hayvan sağlığında ise rapor edilmiş kronik belirtiler, bağışıklık sisteminin baskılanmasını içermektedir. ZEN, hormonal, östrojenik etkilere sahip olduğundan dolayı özellikle domuzlarda yüksek alımı kısırlığa neden olabilmektedir. Fumonisinler ise insanlarda özofagus kanseri, hayvanlarda karaciğer ve böbrek toksisitesi ile ilişkilendirilir (WHO, 2018).

Tarihte ilk olarak belirlenen mikotoksizkozis olayı 'Kutsal Ateş' ya da 'Aziz Anthony'nin Ateşi' olarak bilinen ergotizm hastalığıdır. Ergotizm, *Claviceps purpurea* toksinleri ile kontamine olmuş çavdar ve diğer tahıl tanelerinden yapılan ekme ürünlerinin tüketimi sonucu, Orta Çağ'da Avrupa'da ortaya çıkmıştır (Thrane, 2001). 1890 yılında Japonya'da, kardiyak

beriberi hastalığı (sarı pirinç hastalığı) ortaya çıkmıştır. Bu hastalık, *Penicillium* küfleri tarafından üretilen bir nörotoksin olan sitreoviridinin neden olduğu bir hastalıktır. Erkeklerin ‘sarı pirinç’ yemesi sonucu kusma, kaslarda istemsiz kasılmalar ve kas fonksiyon kaybına neden olmuştur. Hastalık belirtilerinden sonra 1-3 gün sonra ölümlerin meydana geldiği rapor edilmiştir.

DON, ilk olarak 1972 yılında Japonya’da keşfedilmesinden sonra başlangıçta RD toksin olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra *F. graminearum* ile kontamine olmuş mısır ürünlerinden izole edilen DON, domuzlarda kusma ile ilişkilendirilerek “vomitoksin” adını almıştır. Hayvanların DON’a karşı akut ve kronik maruziyeti çeşitlilik göstermekle birlikte, en duyarlı hayvan türünün domuzlar olduğu bildirilmiştir. Onu fare, sıçan, kümes hayvanları, geviş getiren hayvanlar, evcil hayvanlar (kediler ve köpekler) ve balıklar (somon) takip etmektedir (EFSA, 2013). DON ile akut olarak yüksek miktarda maruz kalan deney hayvanlarında kusma, ishal, lökositoz, kanama, dolaşım şoku ve nihayetinde ölüm gözlenebilmektedir. Kronik düşük doz toksitesisi ise ağırlık kaybı, düşük ağırlık alımı, besinsel emilim bozuklukları, nöroendokrin değişiklikler ve immünolojik değişiklikler ile karakterize edilebilmektedir (Maresca, 2013). Asya ülkelerinde rastlanan vakalarda DON akut maruziyet sonrası, insanlarda mide bulantısı, kusma, ishal, baş ve karın ağrısı, ateş gibi belirtilere rastlanmış olup, ölüm olayı rapor edilmemiştir. DON’un kronik maruziyeti sonrası insanlarda gösterdiği etkiler ile ilgili yeterli kanıt bulunmamaktadır (EFSA, 2017b).

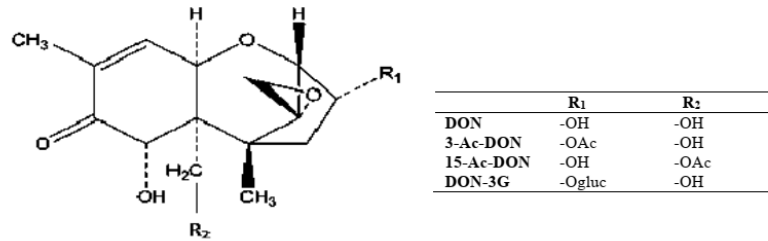
Okratoksin A, genellikle mahsüllerin depolanması sırasında oluşur ve hayvanlarda bazı toksik etkilere neden olmaktadır. Özellikle böbrek hasarı gözlemlenmekle beraber toksinin fetal gelişim ve bağışıklık sistemi üzerinde de etkileri olabilmektedir. Hayvanlarda OTA maruziyetine bağlı olarak böbrek toksitesisi ve böbrek kanseri gelişimi kanıtlanmıştır. Ancak insanlarda böbrek üzerindeki etkileri gözlemlenmiş olmasına rağmen bu ilişki belirsizdir (WHO, 2018; Malir ve ark., 2016). Dünyadaki önemli vakalar arasında, Balkanlar’da *Aspergillus ochraceus* tarafından oluşturulan OTA’nın neden olduğu Balkan endemik nefropatisi (BEN) ve Rusya’nın Orenburg bölgesinde 1942-1947 yılları

arasında binlerce insanın ölümüne neden olan *Fusarium sporotrichioides* toksinlerinin yol açtığı Alimentary Toxic Aleukia (ATA) gelmektedir (Froquet ve ark, 2001; Sherif ve ark, 2009).

Besin kaynaklı mikotoksinlerin etkileri akut olup, bu kontamine besinlerin tüketilmesinden hemen sonra ciddi hastalık semptomları ortaya çıkmaktadır. Uzun vadede etkileri ise kanser oluşumunun uyarılması ve immun yetmezlik ile ilişkilendirilmektedir. Tanımlanan yüzlerce mikotoksinde özellikle aflatoksinler, OTA, patulin, trikotosenler (DON, nivalenol, T-2 ve HT-2 toksin), zearalenon ve fumonisinin insan sağlığı açısından en fazla üzerinde durulan mikotoksinler olmuştur (Bbosa ve ark., 2013; WHO, 2018).

4.7. Deoksinivalenol Yapısı, Özellikleri ve Metabolizması

C8 pozisyonunda bir karbonil grubu ile karakterize olan DON'un yaygın bilinmekte olan adı trichothec-9-en-8-one,12,13-epoksi-3,7,15-trihidroksi-,3 α ,7 α 'dır. Molekül formülü ve molekül ağırlığı sırasıyla, C₁₅H₂₀O₆ ve 296,32 g mol⁻¹ olan DON'un Chemical Abstracts Service (CAS) numarası 51481-10-81'dir. DON, su ve sulu metanol, asetonitril ve etil asetat gibi bazı polar organik çözücüler ile çözünmektedir (EFSA, 2004). DON-3G yapısında bir glikozitin varlığı ana toksine kıyasla molekülün polaritesinde artışa neden olurken, 3-Ac-DON ve 15-Ac-DON'da bir asetil grubu varlığı ana moleküle göre polaritede azalmaya yol açmaktadır (Maresca, 2013). DON, asetil türevleri ve DON-3G kimyasal yapıları Şekil 4.7.1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.7.1. DON, asetil türevleri ve DON-3G kimyasal yapıları

DON çoğunlukla hububat tanelerinin dış gövdelerine bağlanmasıyla, tanelerin temizlenmesi, kabuk ayıklama işlemi, kepek gibi tahıllarda bu toksinin miktarında belirgin artışlara yol açmaktadır. DON'da diğer mikotoksinler gibi ısıtma işlemine karşı stabil bir yapı olup, besin prosedürlerinde ürünün nem içeriğine de bağlı olarak kısmi parçalanmaya uğramaktadır (EFSA, 2017b).

4.8. Deoksinivalenol Üreten Küfler ve Gelişme Şartları

F.graminearum ve *F.culmorum* küfleri tarafından üretilen DON, B tipi bir trikotesendir. DON özellikle ılıman iklimlerde yetişen tahıl ve tahıl bazlı ürünlerde (malt, bira, ekmek vb.) yaygın olarak karşılaşılan mikotoksin türüdür (Marin ve ark., 2013). Tahıllarda DON kontaminasyonu iklim, sıcaklık ve nem ile ilgili olarak değişiklik göstermektedir. Oluşumu için optimum sıcaklık aralığı 21-29 °C ve >%20 nem değerleridir (EFSA, 2015).

DON ve türevleri olan 3-Ac-DON, 15-Ac-DON ve 3,15-Ac-DON buğday, arpa, yulaf, çavdar ve mısır başta olmak üzere çeşitli hububat ve hububat kaynaklı besinlerde birlikte bulunabilirler. DON asetil türevleri, DON üreticisi küflerin farklı suşları tarafından sentezlenebilmektedir ve ana bileşik olan DON'dan daha düşük miktarlarda sentezlendiği belirtilmektedir (Gilbert ve ark., 2014).

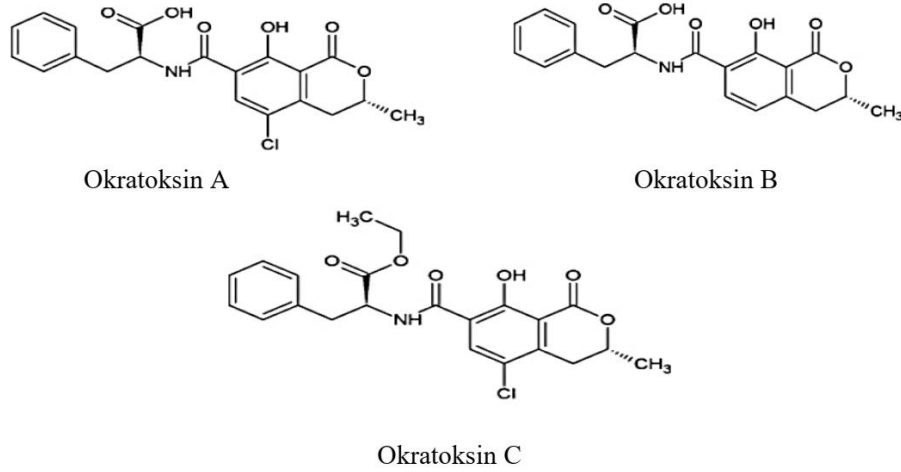
Tahıl ve yem maddelerinde DON-3G, 3-Ac-DON ve 15-Ac-DON konsantrasyonlarının DON'a nispi oranlarının sırasıyla %20, %10 ve %15 olduğu belirtilirken, bira ve benzeri düşük alkollü içeceklerde DON-3G miktarının DON miktarına nispi oranının %80'e çıkabileceği belirtilmektedir (EFSA, 2017b).

4.9. Okratoksin A'nın Yapısı, Özellikleri ve Metabolizması

Okratoksinler (OTA, OTB ve OTC), özellikle *P.verrucosum*, *A.ochraceus* ve *A.carbonarius* olmak üzere *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsinin farklı türleri tarafından sentezlenen ikinci metabolitlerdir (EFSA, 2006). Okratoksinler ilk olarak 1965 yılında Güney Afrika'da mantar kültürlerinden tanımlanıp karakterize edilmiş ve OTA, OTB ve OTC olmak üzere üç türevi olduğu

belirlenmiştir (Atumo, 2020). Özellikle depolama aşamasında besinlerde en yaygın görülen kontaminantlardan olup, insanlarda ve hayvanlarda zararlı etkileri olan başlıca formdur (Wu ve ark., 2011, Köszegi ve Poór, 2016).

Farklı küflerin toksik metabolitleri olan okratoksinlerin yapıları, amid bağı yolu ile L-fenilalanine bağlanmış bir dihidroizokumarin kısmından oluşmaktadır. OTB dışında OTA ve OTC bir paraklorofenol kısmında içermektedir. OTC'nin OTA'dan farkı ise yapısında fazladan bir etil ester bulundurmasındandır (Atumo, 2020, Köszegi ve Poór, 2016). OTA'dan oluşan tüm metabolitlerin ana bileşikten daha az toksik olduğu bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2018). OTA beyaz ve renksiz, kokusuz, ısıya dayanıklı, kristal katı bir maddedir ve suda çözünürlüğü zayıftır. Yapısı nedeniyle güçlü floresans özelliğine sahip olup alkali koşullarda mavi floresans, asidik koşulda ise yeşil floresans özellik göstermektedir (Janik ve ark., 2020; Köszegi ve Poór, 2016).



Şekil 4.9.1. Okratoksinlerin kimyasal yapıları

Hayvanlarda ve insanlarda OTA böbrek, karaciğer ve bağırsaklarda metabolize edilmektedir. Hidroliz, hidrosilasyon, konjugasyon ve lakton açılması OTA'nın başlıca metabolik yollarıdır ve çeşitli okratoksin metabolitleri oluşabilmektedir (Wu ve ark., 2011). OTA'nın gastrointestinal sistemden emildikten sonra dolaşımdaki yaklaşık %99'luk kısmı, çoğunluğu albümin olmak üzere yüksek afinite ile plazma proteinlerine bağlanır. Bundan dolayı OTA'nın kanda yarılanma ömrü yüksek olup yaklaşık bir aydır (Malir ve ark.,

2013; Capraro ve Rossi, 2012; Özçelik ve ark., 2001). Emilimi takiben toksinin konsantrasyonu alınan doz, maruz kalma yolu ve süresi gibi değişkenlerle birlikte türe özgü faktörlere de bağlıdır (Ringot ve ark., 2006).

4.10. Okratoksin A Üreten Küfler ve Gelişme Şartları

Okratoksin A, *Aspergillus* (*A. carbonarius*, *A. foetidus*, *A. laticoffeatus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. sclerotium*, *A. steynii*, *A. tubingensis*, *A. westerdijkiae*) ve *Penicillium* (*P. nordicum*, *P. verrucosum*) cinsinin çeşitli toksijenik küf türleri tarafından, ikincil metabolit olarak üretilen bir mikotoksindir (Malir ve ark., 2013).

OTA oluşumunu etkileyen en önemli faktörler su varlığı ve sıcaklıktır. Su aktivitesi, besin değeri yüksek substratlar üzerinde küf oluşumunu, çimlenmesini ve büyümesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Atumo, 2020; Naresh ve David, 2005). *Penicillium verrucosum* tarafından üretilen OTA'nın kontaminasyonunun, 0,95 su aktivitesi ve 25°C sıcaklıkta meydana geldiği gösterilmiştir. OTA üretimi için optimum sıcaklık *A. ochraceus*, *A. carbonarius* ve *A. niger* için sırasıyla 25-30°C, 10-20°C ve 20-25°C olarak belirtilmiştir ve su aktiviteleri 0,95-0,99, 0,82, 0,77 olarak saptanmıştır (Atumo, 2020).

OTA kimyasal olarak kararlıdır ve normal sıcaklıklardan önemli ölçüde etkilenmemektedir. Genellikle ısıya dayanaklı olup, fırınlama ve kavurma işlemlerinin toksin içeriğine yaklaşık %20 azaltıcı etkisi olduğu ve kaynatmanın hiçbir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Malir ve ark., 2013). Üç saat boyunca 121°C'deki yüksek basınçlı buhar sterilizasyonuna karşı direnç gösteren OTA, pişirme sırasında tamamen kaybolmaz. Ayrıca 250°C'de bile OTA'da sadece kısmen bozunma gerçekleştiği bilinmektedir (Köszegi ve Poór, 2016).

4.11. Hububatlarda Deoksinivalenol ve Okratoksin A Varlığı

Mikotoksinler ile ilgili dünyada ilk çalışmalar hububatlar üzerine yapılmıştır. 1900'lü yılların başında küflerin ürettiği penisilinlerin keşfinden sonra, araştırmacılar antibiyotik konusundaki çalışmalarını da arttırmışlardır (Çelik, 2008). Başlangıçta antibiyotik olarak kabul edilen bazı küf metabolitleri

sonradan toksik madde olarak kabul edilmiş ve toksinler olarak sınıflandırılmışlardır (Peraica ve ark., 1999).

Fas'ta yapılan bir araştırmada 80 adet durum buğdayı DON ve ZEA yönünden incelenmiştir ve 80 örneğin 4'ünde 121-1480 µg/kg arasında DON kontaminasyonu tespit edilmiştir (Blesa ve ark., 2014). 2006-2007 yılları arasında İtalya'da mısır örneklerinde DON, aflatoksin ve ZEA araştırılmıştır. Araştırma sonucunda; örneklerin tümünde 197-3980 µg/kg düzeyleri arasında DON saptanmıştır (Covarelli ve ark., 2011). İspanya'nın çeşitli bölgelerinde bulunan marketler ve perakendecilerden temin edilen farklı markalardaki 182 adet hububat bazlı ve glutensiz ürünler DON yönünden analiz edilmiştir. Buğday bazlı 119 ürünün %79,8'inde DON kontaminasyonuna maksimum 83,2 µg/kg'a ulaşan düzeylerde rastlanmıştır. 23 adet pirinç örneğinin %13'ünde DON tespit edilmiştir ve maksimum 5,5 µg/kg'a ulaşan düzeyde ölçülmüştür. Aynı araştırmada 17 mısır örneğinin %29,4'ünde maksimum 22,1 µg/kg'a ulaşan DON tespit edilmiştir (Rodríguez ve ark., 2014). Litvanya'da 2006-2007 dönemi hasat zamanlarında kışlık ve baharlık toplam 125 adet buğday, arpa ve çavdar numuneleri ELİSA metodu ile DON açısından incelenmiştir. 2006 yılı kışlık 32 adet örnekte 223 µg/kg, baharlık 32 örnekte 100-231 µg/kg arası, 2007 yılı kışlık 28 örnekte 146,3-171,3 µg/kg arası, baharlık 33 örnekte 138-445 µg/kg arası düzeylerde DON kontaminasyonu tespit edilmiştir (Mankevičienė ve ark., 2011). 2014 yılı hasat mevsimi boyunca Romanya'nın güneyindeki 4 bölgeden 31 adet tam buğday unu ve 35 adet beyaz buğday unu dahil toplam 66 adet örnekte DON varlığı araştırılmıştır. Araştırma sonucu; 31 tam buğday örneğinin 8'inde (110-1787 µg/kg), 35 beyaz buğday unu örneğinin 1'inde (190 µg/kg) DON saptanmıştır (Stanciu ve ark., 2017). İtalya'da marketlerden temin edilen 2 bebek maması ve 27 durum buğdayı makarnası olmak üzere 27 adet örnek incelenmiştir ve örneklerin tamamında 20,89-247,27 µg/kg düzeyleri arasında DON tespit edilmiştir (Tolosa ve ark., 2017). İran'da 34 buğday örneği ile yapılan bir araştırmada; örneklerin 8'inde DON (1,2-1746,5 µg/kg), 3'ünde OTA (1,9-41,5 µg/kg) tespit edilmiştir (Sadhasivam ve ark., 2017). Ontario'da 2008-2009 yılları arasında toplanan 100 adet hububat örneğinde (25 kışlık buğday, 15 baharlık buğday, 15 mısır, 10 yulaf, 20 arpa, 15 çavdar) DON

kontaminasyonu araştırılmıştır. Araştırma sonucu; 25 adet kışlık buğdayın tamamında (1,044-982 ng/g), 15 adet baharlık buğdayın tamamında (1,207-122 ng/g), 15 mısır örneğinin 14'ünde (1,041-989 ng/g), yulaf örneklerinin 6'sında (22-71 g/g), arpa örneklerinin tamamında (1,071-973 ng/g), çavdar örneklerinin tamamında (87-500 ng/g) DON tespit edilmiştir (Martos ve ark., 2010).

Hububat ve hububat bazlı ürünlerin OTA üretimi için oldukça uygun substratlar olduğu düşünülmektedir (González-Osnaya ve ark., 2007). OTA tarım ürünlerinden ilk olarak 1969 yılında mısırdaki saptanmıştır (Shotwell ve ark., 1969). Çoğunlukla mısır, buğday, yulaf, arpa, çavdar, pirinç, kuru meyveler, şarap, bira, bebek maması gibi çeşitli ürünlerde OTA bulunmaktadır (Nguyen ve Ryu, 2014). Bulgaristan, Romanya ve Tuna Nehri kıyı bölgelerinde görülen Balkan Endemik Nefropatisi ile ilişkili OTA'nın, bu bölgelerde incelenen hububat örneklerinde (n=765) OTA kontaminasyon sıklığı %3,1 ve OTA konsantrasyonu 11,8 µg/kg'a ulaşan seviyelerde bulunmuştur (Tunail, 2000). Türkiye'de yapılan bir çalışmada buğday, mısır, mısır unu, yulaf gevreği, yulaf ezmesi ve müsli örneklerini içeren 100 adet örnekte OTA incelenmiştir. Örneklerden 1 adet aşurelik buğday (0,27 µg/kg), 2 adet mısır (1,79 ve 9,84 µg/kg) ve 1 adet yulaf ezmesinde (4,19 µg/kg) OTA tespit edilmiştir (Karagözlü ve Karapınar, 2000). Slovakya'da hububatlarda yapılan bir çalışmada; 92 adet buğday örneğinin %75,8'inde (0,02-160 µg/kg) ve 51 adet mısır örneğinin %33,3'ünde (0,02-40 µg/kg) OTA saptanmıştır (Puntarić ve ark., 2001). Ülkemizin Bursa ilinde çeşitli market, fırın ve Türk Silahlı Kuvvetleri'nin farklı birliklerinden sağlanan 34 buğday unu, 14 tam buğday unu ve 10 mısır unu örnekleri OTA bakımından incelenmiştir ve tespit edilen OTA miktarları sırasıyla 6,89, 9,3 ve 6,39 µg/kg olarak tespit edilmiştir (Cengiz ve ark., 2007). Erzurum'da tüketilmekte olan 50 buğday unu örneğinde OTA analizi yapılan bir çalışmada; örneklerin %90'ında OTA saptanmıştır. 0,625-3 µg/kg değerleri arasında bulunan 5 pozitif örneğin Türk Gıda Kodeksi'ne göre kabul edilebilir sınırların (3 µg/kg) altında olduğu belirtilmiştir (Özturan ve ark., 2007). Yine ülkemizin Kayseri ilinde çeşitli hububat ürünlerinde (25 adet tam buğday unu, 25 adet pirinç ve 25 adet bulgur) OTA kontaminasyonu araştırılmıştır. Araştırma sonucunda; buğday unu örneklerinde 1011,84-14,66 g/kg, pirinç örneklerinde

381,93-153,76 g/kg, bulgur örneklerinde 548,80-158,53 g/kg değerleri arasında OTA tespit edilmiştir (Şeviktürk ve Gönülalan, 2007). Adana’da marketler ve küçük dükkanlardan sağlanan 24 kahvaltılık gevrek, 24 hububat bazlı bebek maması ve 35 bira örneğinde HPLC-FD yöntemiyle OTA varlığı incelenmiştir. Kahvaltılık gevreklerin %38’inde (0,172-1,84 ng/ml), hububat bazlı bebek mamalarının %17’sinde (0,122-0,374 ng/ml) ve bira örneklerinin %14’ünde (0,012-0,045 ng/ml) OTA tespit edilmiştir (Özden ve ark., 2012). İspanya’da yapılan bir araştırmada mısır, buğday, pirinç ve arpa örneklerinde sırasıyla %4,7 (ortalama 0,1 µg/kg), %64,2 (ortalama 0,43 µg/kg), %87,5 (ortalama 0,16 µg/kg) ve %57,7 (ortalama 0,1 µg/kg) OTA saptanmıştır (Vidal ve ark., 2013). Çin’de yapılan bir başka çalışmada 65 adet hububat örneğinde OTA varlığı araştırılmıştır. Buğday örneklerinin %36,36’sında (4,248 ng/g), mısır örneklerinin %26,08’inde (7,366 ng/g), pirinç örneklerinin %15’inde (3,382 ng/g) OTA bulunmuştur (Zhang ve ark., 2011). Juan ve arkadaşlarının (2008) İspanya ve Portekiz’den temin ettiği 83 adet organik ve organik olmayan pirinç, buğday, arpa, çavdar, mısır ve yulaf örneklerinde OTA analizi yaptığı çalışma sonucunda; 18 örnekte 0,2-27,10 µg/kg değerleri arasında OTA içeriği saptamıştır. Kontamine 18 örneğin %72’si organik hububat ve %28’i organik olmayan örnek grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. 2007-2008 hasat yılları arasında İspanya’nın kuzey bölgesi Navarra’da 123 arpa örneği ile yapılan bir araştırmada; örneklerin %58’inde maksimum 3,53 µg/kg’a ulaşan düzeyde OTA tespit edilmiştir (Ibáñez-Vea ve ark., 2012).

4.12. Hububatlarda Deoksinivalenol ve Okratoksin A Miktarını Belirleyen Yasal Düzenlemeler

Mikotoksinlerin keşfinden bugüne tüketicileri mikotoksinlerin zararlı etkisinden korumak amacıyla pek çok gelişmiş/gelişmekte olan ülkelerde çeşitli maksimum limit değerleri belirtilmiştir. Bu konuda ilk olarak, 1993 yılında Avrupa Birliği (AB)’nde halk sağlığını korumak amacıyla belirli kontaminantlar için maksimum tolerans limitlerinin oluşturulması gerektiği kararı ‘Council Regulation (EEC) NO 315/93’ sayılı tüzüğünde verilmiştir (EEC, 1993). 2006 yılında yayımlanan AB ‘Commision Regulation (EC) No 1881/2006 sayılı

tüzüğünde ise OTA, FUM, DON, ZEA ve PAT ile ilgili çeşitli besinlerde bulunmasına izin verilen maksimum limit değerleri belirlenmiştir (EC, 2006). Bununla birlikte FAO ve WHO tarafından tüketici sağlığını korumak ve besin ticaretinde adil uygulamaları teşvik etmek amacıyla kurulan Kodeks Alimentarius Komisyonu (CAC) standartları küresel olarak kabul görmektedir. Her iki komisyonda belirli besinlerdeki bazı mikotoksinler için maksimum limitler belirlemenin yanı sıra, resmi kontroller için örnekleme ve analiz metodlarını da belirlemişlerdir (EC, 2006; WHO, 2019).

İnsan ve hayvan sağlığı için risk içeren bu ikincil metabolitler doğal olarak ortaya çıktığından gıda ürünlerinden tamamen uzaklaştırılmasının çok zor olduğu bilinmektedir. Bazı gıda ürünlerinde en yaygın bulunan ve tüm dünyada kabul edilebilir azami seviyeler belirlenmiştir. Tüketicilerin korunması, iyi tarım ve işleme uygulamalarının ardından mikotoksin seviyeleri tolere edilebilir ölçüde tutulup takip edilmektedir. Mikotoksinler ve gıdalardaki izin verilen maksimum limit düzeyleri ülkeler arası önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Mikotoksinlerin ülkelere göre bazı ürünlerdeki tolere edilebilir miktarları Tablo 4.12.1’de gösterilmiştir (Anfossi ve ark., 2016).

Tablo 4.12.1. Bazı gıdalarda bulunabilecek mikotoksinlerin ülkelere göre tolere edilebilir seviyeleri (Anfossi ve ark., 2016)

Mikotoksin	Gıda	Ülke	Maksimum tolere edilebilir seviyeler ^a (µg/kg)
Aflatoksinler	Yağlı tohumlar, fındık, kuru meyveler, tahıllar, baharatlar	AB Avustralya, Kanada, GCC Nijerya, Yeni Zelanda, Güney Afrika ABD, Brezilya, MERCOSU Hindistan	4-15 ^a (2-12 ^a aflatoksin B1) (15 aflatoksin B1) 20 30
Deoksinivalenol	Tahıllar, unlu mamuller	AB Brezilya Rusya Kanada, Çin, Hindistan Japonya, ABD	500-1750 ^a 750-3000 ^a 700-1000 1000
Fumonisinler	Mısır	AB, Norveç, İsviçre ABD Brezilya	800-4000 ^a 2000-4000 ^a 2000-5000 ^a
Okratoksin A	Tahıllar, kuru meyveler, kahve, kakao, şarap, bira, üzüm suyu, baharat	AB, Mısır Çin, GCC, Kenya Nijerya, Rusya Hindistan Brezilya Uruguay	2-10 ^a 5 20 2-30 ^a 50
T-2 ve HT-2	Tahıllar	AB Rusya	İzin verilmiyor 50-100 ^a
Zearalenon	Tahıllar, unlu mamuller, mısır yağı	AB Brezilya Çin, Rusya, Şili	75-400 ^a 200-1000 ^a 200000 ^a

^a Ürüne göre değişir (en düşük – en yüksek maksimum tolere edilebilir seviyeler)

AB: Avrupa Birliği

ABD: Amerika Birleşik Devleti

GCC: Körfez Ülkeleri İşbirliği Konseyi (Gulf Cooperation Council)

MERCOSUR: Güney Amerika Ortak Pazarı (Mercado Comun del Sur)

Ülkemizde 29.11.2011 tarihinde 28157 sayılı (3. Mükerrer) Resmi Gazete’de yayımlanan ‘Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği’nde riskli gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri belirlenmiştir (TGK, 2011). DON ve OTA için TGK Yönetmeliği’nde yer alan maksimum limit değerleri Tablo 4.12.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.12.2. DON ve OTA 'a ait maksimum limit değerleri (TGK, 2011)

Gıda	Deoksinivalenol (µg/kg)
İşlenmemiş tahıllar (durum buğdayı, yulaf ve mısır hariç)	1250
İşlenmemiş durum buğdayı ve yulaf	1750
İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	1750
Tahıllar, tahıl unları, kepek ve rüşeym (doğrudan insan tüketimine sunulan)	750
Makarna	750
Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar	500
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	200
500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği veya mısırdan elde edilen pelleter ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri	750
500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri	1250
	Okratoksin A (µg/kg)
İşlenmemiş tahıllar	5
İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0.5
Bebek ve küçük çocuk ek gıdalar	0.5

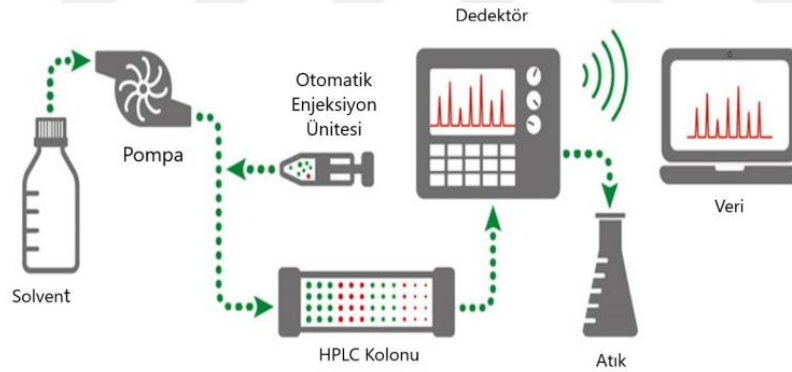
4.13. Mikotoksin Analizlerinde Kullanılan Metodlar

Besinler ve yemlerde mikotoksin tayini, uygun örnek alım planının uygulanması, örneğin homojenize edildikten sonra genellikle sulu organik çözücüler ile toksinin besin matriksinden ekstraksiyonu, ekstraktın saflaştırılması ve tespit ile kantitatif tayini içeren çok adımlı bir işlemdir. Mikotoksinlerin besinlerde heterojen dağılım göstermesi nedeniyle, örnek lama, öğütme ve homojenizasyon basamakları güvenilir analitik sonuçlar elde etmede büyük önem taşımaktadır. Analizlerde ikinci aşamayı ekstraksiyon ve ekstrakt temizleme işlemleri oluşturmaktadır. Bu aşamada, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı-

faz ekstraksiyonu, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, jel geçirgenlik kromatografisi ve ekstrakt temizleme amacıyla immunoaffinite kolon (IAC) kullanımı yaygındır (Köppen ve ark., 2010).

Mikotoksinlerin tespitlerinde; ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS), enzim bağlanmış immunosorbent yöntemi (ELISA), biyosensörler ve immunojik temele dayanan kalitatif veya yarı kantitatif hızlı test yöntemleri kullanılmaktadır (Gilbert ve Anklam, 2002).

HPLC yöntemi besin ve yemlerde bulunabilecek DON, OTA ve diğer mikotoksin türlerinin kalitatif/kantitatif tayininde dünyada kullanılan en yaygın yöntem olarak bilinmektedir. HPLC yöntemi, adsorban ile doldurulmuş bir kolondan ayrılması istenen tayini yapılan numune karışımını içeren yüksek basınç altında geçirilmesi prensibine dayanmaktadır (Şekil 4.13.1)



Şekil 4.13.1. HPLC analizi akış şeması

HPLC yöntemi ile mikotoksin tayininde durulması gereken önemli noktalardan birisi, mikotoksin-dedektör ilişkisidir. DON analizinde UV dedektör, OTA analizinde ise FLD kullanılmaktadır (Girelli ve Mattei, 2005).

5. MATERİYAL VE METOD

5.1. Materyal

Materyalimizi oluşturan hububatların %50' si İstanbul'daki marketlerden (markalı ürünler) ve %50' si açıkta satışı yapılan semt pazarlarından 2020 yılının Eylül ve Ekim aylarında temin edildi. Toplam örnek sayısı 96'dır; bu örneklerin 24 adedi aşurelik buğday, 24 adedi pirinç, 24 adedi mısır unu ve 24 adedi tam buğday unuydu. Tüm örneklerin orijinleri Türkiye'nin çeşitli bölgeleridir. Örneklerin toplanmasında 'Türk Gıda Kodeksi Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği (Tebliğ No:2018/10)' esas alınmıştır (TGK, 2018).

5.1.1. Örneklerin analize hazırlanması

Marketlerden toplanan örnekler en az 250 g olup orijinal ambalajlarında ve semt pazarlarından toplanan örnekler en az 500 g olup şeffaf poşet torbalarda laboratuvara getirildi. Tüm örnekler satın alınan orijinal paketlerinde numaralandırıldı ve 4 ± 1 °C'lik buzdolabında analizleri yapılabilecek kadar bozulmadan saklanması için bekletildi. Örnekler bekleme süresince soğuk ve karanlık ortamda muhafaza edilmiş oldu.

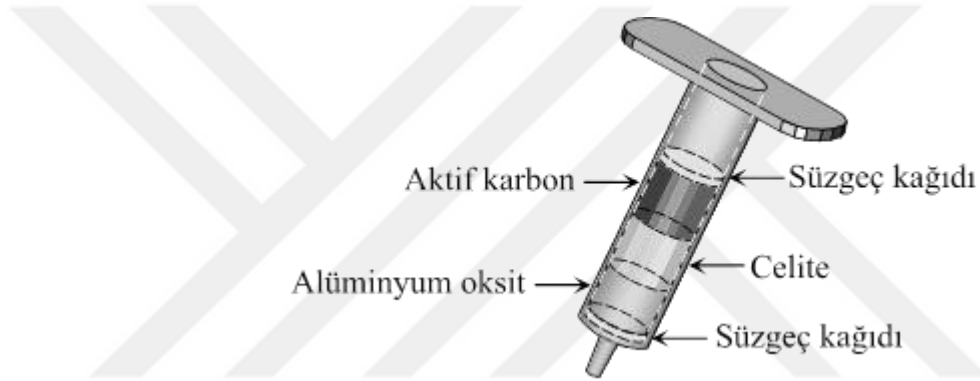
5.2. Metod

Tüm hububatların DON ve OTA ekstraksiyon analizleri İstanbul Medipol Üniversitesi Toksikoloji Laboratuvarında, deoksinivalenol'ün HPLC analizi İstanbul Medipol Üniversitesi, okratoksin A'nın floresans detektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-FLD) analizi ise İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Ar-Ge merkezinde yapıldı.

5.2.1. Hububatlarda HPLC ile deoksinivalenol analizi metodu

Bu çalışmada, DON standardı Sigma'dan (D-0156) elde edildi. Kullanılan tüm çözücüler HPLC kullanımı için gerekli kalitededir ve standartların hazırlanmasında Millipore Milli Q-RG'den elde edilen su kullanılarak HPLC

mobil faz hazırlanmıştır. Analiz boyunca kullanılan tüm cam malzemeler distile su ve metanolden geçirildikten sonra etüvde kurutuldu. DON analizi için katı faz ekstraksiyonu, solid phase extraction (SPE) kolonlar örneklerin kirliliklerden temizlenmesi için Omurtag ve Beyoğlu'nun çalışmasında kullandığı yöntem ile hazırlandı. 6 mL'lik boş SPE kolona ilk önce süzgeç kağıdı (Whatman no:4) alt kısmı tamamen kapatacak şekilde kesilerek yerleştirildi. Üzerine hassas terazide tartılan 0,35 g alüminyum oksit, 0,25 g celite, 0,4 g aktif kömür yerleştirildi. Bu tabakaların birbirine karıştırılmadan oluşturulmasına dikkat edildi. Son tabaka olan aktif kömürün üzerine de süzgeç kağıdı (Whatman no:4) düzgün bir şekilde yerleştirildi (Şekil 5.2.1.1) (Omurtag ve Beyoğlu, 2003).



Şekil 5.2.1.1. Alüminyum oksit, celite, aktif kömür (0.35 g, 0.25 g 0.40 g). Kartuş çapı 13 mm. *Whatman No. 4 filtre kağıdı.

5.2.1.1. HPLC ile deoksinivalenol analizinde kullanılan sistem koşulları ve ekipmanlar

- a) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı (HPLC): 220 nm' de (Agilent 1100) ayarlanmış değişken dalga boylu UV-görünür dedektörlü bir Model 600 pompalı çok solventli dağıtım sisteminin (Waters Corporation, ABD) kombinasyonu.
- b) Analiz süresi: 20 dk
- c) Enjeksiyon hacmi: 100 µl
- d) Kolon sıcaklığı: 25 °C
- e) Pompa akış hızı: 0,7 ml dk⁻¹
- f) HPLC kolonu: C18 (4.6 x 250 mm, 100 Å, 5 µl parçacık büyüklüğü, parça no HX56005269)

- g) Analitik terazi: Radwag – AS 220.R2 (0,1 mg hassasiyetiyle ölçüm yapabilen)
- h) Yüksek devirli blender (patlamaya dayanıklı): WARING 8011ES (1000 mL blender kabı ile birlikte, min 18000-max 22000 rpm hızda)
- i) Vakum evaporatörü: Buchi Rotavapor R-100
- j) Whatman No:4 filtre kağıdı
- k) Süzme hunisi
- l) Çeşitli hacimlerde balon joje
- m) Çeşitli hacimlerde Erlenmayer
- n) Toplama kabı: Kolon atığı için cam kap
- o) Millipore Millex HV filtresi (0,45 µm) tipi Hidrofilik Duro pore (PVDF)
- p) Mobil faz süzme aparatı: Do-Chrom 300 ml
- q) Otomatik pipet: 0-100 µl ve 100-1000 µl arası ayarlanabilen
- r) Vakum manifoldu: Chromabond, REF 730151N
- s) HPLC Şartları: 220 nm, Enjektör: Rheodyne 7725 numune enjektörü idi. Sıcaklık: oda sıcaklığı, Basınç: basınç değeri 35 °C’de 155-165 bar arasında değişir.

5.2.1.2. HPLC ile deoksinivalenol analizinde kullanılan kimyasallar ve hazırlanışları

- a) Bütün çözeltiler: analitik saflıkta
- b) Kullanılan su: ultra saf su, HPLC için uygun kalitede
- c) Su bidistilasyon cihazı: Millipore Milli Q-RG
- d) SPE kolon: 6 mL’lik boş kolona ilk önce süzgeç kağıdı (Whatman no:4) alt kısmı tamamen kapatacak şekilde kesilerek yerleştirildi. Üzerine hassas terazide tartılan 0,35 g alüminyum oksit, 0,25 g celite, 0,4 g aktif kömür yerleştirildi. Bu tabakaların birbirine karıştırılmadan oluşturulmasına dikkat edildi. Son tabaka olan aktif kömürün üzerine de süzgeç kağıdı (Whatman no:4) düzgün bir şekilde yerleştirilmiştir.
- e) Asetonitril: Carlo Erba Ürün no: 73-05-8, HPLC için uygun kalite
- f) Metanol: Carlo Erba Ürün no: 67-56-1, HPLC için uygun kalite

- g) Ekstraksiyon/seyreltme çözeltileri: Asetonitril/Su (21:4, v/v), Metanol/Su (20:80, v/v)
- h) HPLC mobil fazı: Metanol/Su (70:30, v/v)
- i) DON standartı: Sigma (D-0156) marka stok çözeltileri, asetonitril içinde 1 µg/µl konsantrasyonda hazırlandı. Örnek standart çözeltisi daha sonra metanol/su (20:80 v/ v) içinde 0,5 ng/µl çalışma standardı çözeltisi hazırlamak için kullanıldı. Hazırlanan stok çözeltilerinin ağızları kapatıldı ve -20°C'de saklandı.

HPLC cihazına verilen hububat örneklerindeki deoksinivalenol düzeylerinin saptanması amacıyla Sigma D-0156 marka DON standartı kullanıldı. Bu standart kullanılarak hazırlanan farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler cihaza verilerek kalibrasyon grafiği oluşturuldu. HPLC cihazında bulunan Agilent ChemStation veri istasyonu kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiklerinin oluşturulmasında 3-5-10-20-40 ng'lık DON standart çözeltileri kullanıldı ve hububat örneklerinde DON varlığının incelenmesinde, hazırlanmış olan bu kalibrasyon grafiğinden yararlandı.

5.2.1.3. Hububatlarda deoksinivalenol analizi için numune hazırlama ve ekstraksiyon

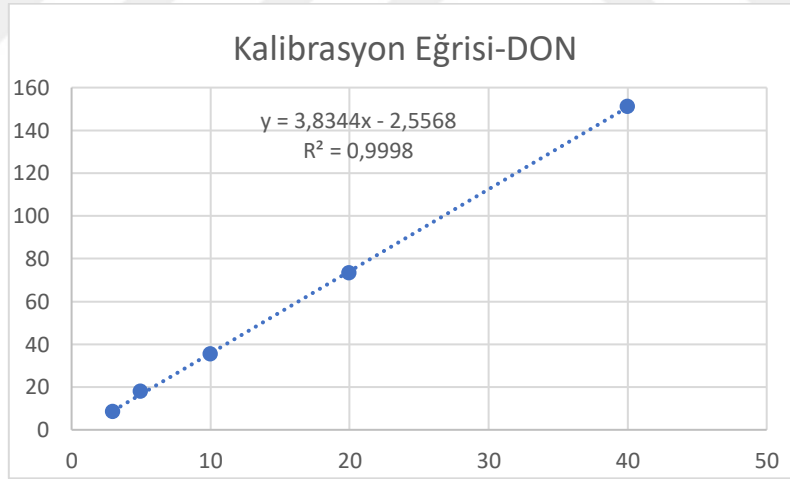
İstanbul piyasasından toplanan ve el blenderinde öğütülen örneklerden; hassas terazide 50 g tartılıp 250 mL asetonitril/su (21:4, v/v) karışımı eklendi. Waring blender'da (Waring Commercial Laboratory Blender-Waring Products Division, Torrington, Connecticut, USA) 3 dakika karıştırıldı ve 30 dakika bekletildi. Whatman no:4 süzgeç kağıdında süzüldü. Süzüntüden 5 ml alındı. Elde edilen bu çözelti oda sıcaklığına gelen, 10 ml asetonitril/su (21:4, v/v) ile ön yıkama işlemi yapılmış SPE kolondan Chromabond marka vakum manifold aracılığıyla geçirildi. 10 ml asetonitril/su (21:4, v/v) ile DON elüe edildi. Asetonitril/su (21:4, v/v)' lu ekstre dibi yuvarlak balona alındı ve vakum evaporatöründe 60°C de kuruluğa kadar evapore edildi. DON numune özü 1 ml %20 metanol-su içinde çözüldü ve HPLC'den önce Millipore Millex HV filtresi (0,45 µm) tipi Hidrofilik Duropore (PVDF) ile filtre edilip viallendi. Viallengen örnekler, kalibrasyon grafiği hazırlamak için kullanılan aynı koşullar altında

HPLC sistemine enjekte edildi ve ikili analiz edildi. DON analiz sonuçlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri her bir örnek için ayrı ayrı Microsoft Excel® programında hesaplandı.

5.2.2. Metod validasyonu

Aşurelik buğday, pirinç, mısır unu, tam buğday unu örneklerinde deoksinivalenol varlığını ve miktarını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen HPLC analizinin metod validasyonu için linearite aralığı, linearite eşitliği ve kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları (R^2)'ndan oluşan linearite verilerinin yanı sıra, tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ) belirlendi.

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla 5 farklı konsantrasyonda hazırlanıp ikişer tekrarlı olarak HPLC cihazına enjekte edilen kalibrasyon çözeltilerinin içeriğindeki DON standartlarının oluşturduğu piklerin alanlarının hesaplanmasıyla, 5 farklı noktadan oluşan kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve linearite verileri hesaplandı (Şekil 5.2.2.1).



Şekil 5.2.2.1. Deoksinivalenol kalibrasyon eğrisi

Deoksinivalenol içermediği tespit edilen kör bir örneğe, DON ara standart çözeltiden (5 ppb) eklenip geri kazanım sonucu hesaplandı. Çıkan değerlerin ortalama ve standart sapması belirlendi ve standart sapmanın 3 katı alınıp LOD değeri, 10 katı alınıp LOQ değeri bulundu.

5.2.3. Hububatlarda deoksinivalenol risk tahmini

5.2.3.1. Maruziyet değerlendirmesi ve risk karakterizasyonu

Bireylerin kontamine olmuş besinleri ağız yoluyla tüketmesi sonucu ortaya çıkan maruziyet risk değerlendirmesi için, besinlerde tespit edilen DON konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ile TÜİK Bitkisel Ürün Denge Tabloları verilerine göre ülkemizde ortalama aşırelik buğday (17,4 $\text{kg}/\text{kişı}/\text{yıl}$), pirinç (8 $\text{kg}/\text{kişı}/\text{yıl}$), mısır (13,1 $\text{kg}/\text{kişı}/\text{yıl}$), tam buğday (82,6 $\text{kg}/\text{kişı}/\text{yıl}$) tüketim miktarları ile çarpıldı (TÜİK, 2019). Daha sonra EFSA tarafından önerilen yetişkin bireyler için 70 kg ortalama vücut ağırlığına bölünerek muhtemel günlük alım (EDI, estimated daily intake) belirlendi (EFSA, 2012). Her bir çalışılan örnek grubunun ve mikotoksinin muhtemel günlük alımın belirlenmesi, aşağıda gösterildiği gibi hesaplandı (Ismail ve ark, 2015).

$$\text{EDI (ng/kg v.a./gün)} = \frac{[\text{Cm(ng/kg)} \times \text{K(kg/gün)}]}{\text{ortalama vücut ağırlığı (kg)}}$$

ortalama vücut ağırlığı (kg)

EDI, Estimated daily intake: muhtemel günlük alım

Cm, Concentration of mycotoxins: Besinlerde belirlenen mikotoksinin ortalama konsantrasyonu

K: Araştırılan besinin bir günde kg cinsinden yetişkin bir popülasyondaki kişi başı tüketim miktarı

Ortalama vücut ağırlığı: 70 kg

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan “Besinlerdeki Kimyasalların DiyetSEL Maruziyet Değerlendirmesi” raporu doğrultusunda; ilgili besin grupları için DON maruziyeti belirlenirken, ortalama toksin konsantrasyonunun hesaplanmasında tespit edilemeyen, LOD ve LOQ’un altında kalan değerleri hesaplamaya dahil etmek için önerilen metod uygulandı. Deoksinivalenol konsantrasyonu tespit edilemeyen ve $<\text{LOD}$ olan ürünler için tahmini alt sınır (LB, Lower Bound) hesaplamasında “sıfır”, konsantrasyonu $<\text{LOQ}$ olan ürünler için LB hesaplamasında LOD değeri kullanıldı. Tahmini orta sınır (MB, Middle Bound) hesaplamasında konsantrasyonu tespit edilemeyen ve $<\text{LOD}$ olan ürünler için $\frac{1}{2}$ LOD, konsantrasyonu $<\text{LOQ}$ olan ürünler için $\frac{1}{2}$ LOQ

hesaplamaya katıldı. Tahmini üst sınır (UB, Upper Bound) hesaplamasında ise konsantrasyonu tespit edilemeyen ve <LOD olan ürünler için LOD, konsantrasyonu <LOQ olan ürünler için LOQ değerleri dikkate alındı (WHO, 2020).

EDI hesaplandıktan sonra her bir mikotoksinin sağlık risk karakterizasyonu (%TDI), EDI'nın aşağıda gösterildiği gibi "tolere edilebilir günlük alım"a (TDI, µg/kg v.a./gün) bölünmesiyle elde edilir. EFSA ve JECFA gibi ilgili kurumlar tarafından belirlenen bir değer olan TDI, sağlık riski olmadan bir ömür boyu tüketilebilecek bir maddenin miktarını gösterir. Eğer %TDI<100 ise tolere edilebilir bir maruz kalma seviyesini, %TDI>100 ise tolere edilemez bir maruz kalma seviyesini belirtir (159-162). Kıyaslama yapabilmek için EFSA tarafından belirlenmiş olan, maruziyet seviyesi için risk kabul edilen, kıyaslama dozu alt sınırı (BMDL 1 µg/kg v.a./gün) kullanıldı (EFSA, 2013). Bazı çalışmalar ve EFSA, deoksinivalenol gibi mikotoksinlerin risk karakterizasyonu için maruz kalma marjı (MoE) önermiş olup biz de çalışmamızda risk karakterizasyonu için bu yaklaşımı uygulamış bulunuyoruz. MoE, kıyaslama dozu alt limitinin (BMDL, Benchmark Dose Lower Limit), DON'ların EDI'sine bölünmesiyle hesaplandı. Düşük sağlık riskinden bahsedebilmemiz için MoE≥ 10,000 olması gerekmektedir (EFSA 2013, Schernk ve ark, 2020).

$$\%TDI = \frac{EDI}{TDI} \times 100$$

$$\%MoE = \frac{BMDL}{EDI}$$

TDI, Tolerable daily intake: Tolere edilebilir günlük alım

EDI, Estimated daily intake: Muhtemel günlük alım

MoE, Margin of exposure: Maruz kalma marjı

BMDL, Benchmark dose lower limit: Kıyaslama dozu alt limiti

5.2.4. Hububatlarda HPLC ile okratoksin A analizinin metodu

Bu çalışmada, OTA standardı Supelco; 34037 marka ile elde edildi. Kullanılan tüm çözücüler HPLC derecesinde ve analitik veya HPLC kalitede olan kimyasal maddelerdir. Okratoksin A için immünoafinite kolonlar (OchraStar) Romer Labs firmasından temin edildi. Analiz boyunca kullanılan tüm cam malzemeler teknik metanolden geçirildi ve 200°C'de 4 saat boyunca sterilizatörde bırakıldı.

5.2.4.1. HPLC ile okratoksin A analizinde kullanılan sistem koşulları ve ekipmanlar

- a) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı (HPLC): SHIMADZU-Nexera-I LC-2040C 3D
- b) Floresans Dedektör: RF-20A (eksitasyon:333nm, emisyon: 443 nm)
- c) Analiz süresi: 20 dk
- d) Enjeksiyon hacmi: 100 µL
- e) Kolon sıcaklığı: 40 °C
- f) Pompa akış hızı: 1 mL/dk
- g) HPLC kolonu: Inertsil ODS-3 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm)
- h) Analitik terazi: Radwag – AS 220.R2 (0,1 mg hassasiyet ile ölçüm yapabilen)
- i) Yüksek devirli blender (patlamaya dayanıklı): Waring 8011ES (1000 mL blender kabı ile birlikte, min 18000-max 22000 rpm hızda)
- j) Manyetik karıştırıcı: Isolab Laborgerate GmbH
- k) Whatman No:4 filtre kağıdı
- l) Süzme hunisi
- m) Çeşitli hacimlerde balon joje
- n) Çeşitli hacimlerde erlenmayer
- o) Cam toplama kabı
- p) Vorteks: Velp Scientifica ZX3 Advanced
- r) Millipore Millex HV filtresi (0,45 µm) tipi Hidrofilik Duropore (PVDF)
- s) Mobil faz süzme aparatı: Do-Chrom 300 mL

- t) Otomatik pipet: 0-100 µl ve 100-1000 µl arası ayarlanabilen
- u) İmmunoafinite kolon: OchraStar Romer Labs
- v) Vakum manifoldu: Chromabond, REF 730151N
- y) HPLC Şartları: Ex.: 333 nm, Em.: 443 nm, Sıcaklık: 40 °C, Pompa akış hızı: 1 mL/dk, Basınç: basınç değeri 40 °C’de 155-165 bar arasında değişir. Oda sıcaklığının 25 °C’den az olduğu durumlarda pompa basıncı 165 bar’ı geçebilir.

5.2.4.2. HPLC ile okratoksin A analizinde kullanılan kimyasallar ve hazırlanışları

- a) Bütün çözeltiler: analitik saflıkta
- b) Kullanılan su: ultra saf su, HPLC için uygun kalitede
- c) Su distilasyon cihazı: Millipore Milli Q-RG
- d) Fosfat tamponlu tuz (PBS): 0,2 g potasyum klorür, 0,2 g potasyum dihidrojen fosfat, 1,16 g disodyum hidrojen ortofosfat ve 8 g sodyum klorür 0,9 L ultra saf suda çözüldü. Bu çözelti, manyetik karıştırıcı aracılığı ile tamamen çözüldükten sonra 0,1 mol/L HCl veya 0,1 mol/L NaOH kullanarak pH 7,4’e ayarlandı. Sonrasında çözelti ultra saf su ile 1 litreye tamamlandı.
- e) Asetik asit: Sigma Aldrich, Ürün kodu; 27225, CAS No; 64-19-7, HPLC için uygun kalitede
- f) Asetonitril: Carlo Erba Ürün no: 73-05-8, HPLC için uygun kalite
- g) Metanol: Carlo Erba Ürün no: 67-56-1, HPLC için uygun kalite
- h) Ekstraksiyon çözeltisi: Asetonitril/Saf Su (6:4, v/v)
- i) HPLC mobil faz: Asetonitril/Su/Asetik asit (47:51:2, v/v/v) karışımı hazırlanıp, kullanmadan önce süzüldü.
- j) İmmunoafinite kolon: OchraStar Romer Labs 4-8 °C’de muhafaza edildi. İmmunoafinite kolon kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
- k) Okratoksin A standardı: Supelco; 34037 marka, asetonitril içinde çözülmüş halde

HPLC cihazına verilen hububat örneklerindeki okratoksin A düzeylerinin saptanması amacıyla Supelco; 34037 marka OTA standardı kullanıldı. Bu standart kullanılarak hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler cihaza verilerek kalibrasyon grafiği elde edildi. HPLC cihazında bulunan 'LabSolution LC Software (Shimadzu) paket programı' yazılımı kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiklerinin oluşturulmasında; 0,4-0,8-2-10-20 ppb'lik OTA standart çözeltileri kullanıldı.

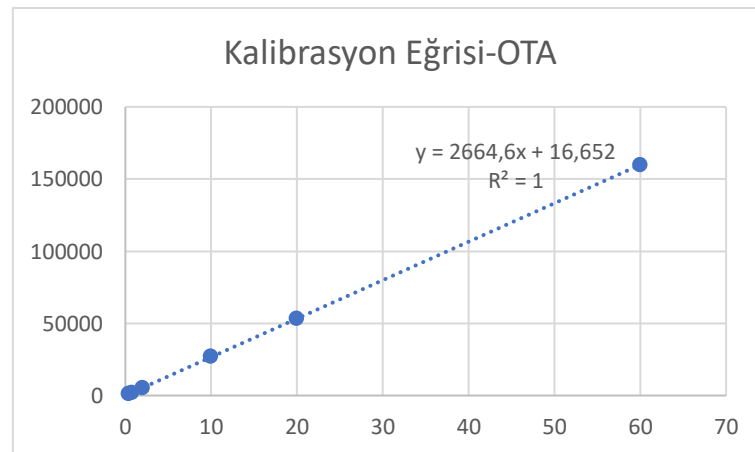
5.2.4.3. Hububatlarda okratoksin A analizi için numune hazırlama ve ekstraksiyon

İstanbul piyasasından toplanan ve el blenderinde öğütülen örneklerden; hassas terazide 50 g tartılıp 200 mL asetonitril/saf su (6:4, v/v) karışımı eklendi. Waring blender'da 3 dakika karıştırıldı. Whatman no:4 süzgeç kağıdında süzülerek 250 mL'lik bir erleninde toplandı. Süzüntüden 10 mL alındı. Elde edilen bu çözelti 10 ml pipetle alınarak 100 mL'lik bir behere konuldu ve üzerine 40 mL PBS ilave edildi. Sonraki aşamada kullanılacak olan immunoafinite kolonların (IAK) oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Oda sıcaklığına gelen IAK'lar, Chromabond marka vakum manifoldu'na yerleştirildi ve seyreltilmiş filtratın 25 mL'si 3 mL/dakika akış hızı ile OTA'ya duyarlı antikolar içeren (OchraStar) Romer Labs IAK'dan sabit hızla geçirildi. Daha sonra IAK'dan 2 damla/saniye olacak şekilde sabit hızla 10 mL fosfat tamponlu su (PBS) ve 10 mL ultra saf su geçirilerek kolon yıkandı ve 5-10 saniye düşük vakum uygulanarak kurutuldu. IAK'lar vakum manifoldu'ndan alındı. IAK'daki antikora tutunmuş olan OTA, IAK'tan saniyede 0,5 mL metanol geçecek şekilde backflushing yapılarak elue edildi ve cam tüpe toplandı. Bir dakika bekledikten sonra 0,5 mL daha metanol ile aynı işlem tekrarlandı. IAK'tan son olarak 1 mL ultra saf su geçirilerek toplam eluat miktarı 2 mL olacak şekilde aynı cam tüpe toplandı. Sonrasında bu eluat vortekslendi ve 0,45 µm'lik şırınga uçlu filtreden süzüldükten sonra viallenip floresans dedektörlü HPLC cihazına yerleştirildi. HPLC de üç tekrarlı okuma gerçekleştirildi. OTA analiz sonuçlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri her bir örnek için ayrı ayrı Microsoft Excel® programında hesaplandı.

5.2.5. Metod validasyonu

Aşurelik buğday, pirinç, mısır unu, tam buğday unu örneklerinde okratoksin A varlığını ve miktarını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen HPLC analizinin metod validasyonu için linearite aralığı, linearite eşitliği ve kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları (R^2)'ndan oluşan linearite verilerinin yanı sıra, tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), geri alma ve tekrarlanabilirlik uygulamaları yapıldı.

Okratoksin A kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için asetonitril içinde çözülmüş olan 10 µg/mL OTA içeren 2 mL OTA standardı (2 mL'lik ampul Supelco; 34037 okratoksin standardı) balon jøjeye alınarak metanol ile 10 mL'ye tamamlandı ve ikinci ara standart çözeltisi oluşturuldu. Bu haliyle ikinci ara standart çözeltisi 2 µg/mL OTA'dan meydana geldi. İkinci ara standart çözeltisinden de 0,1 mL alınıp balon jøjeye konuldu ve metanol ile tekrar 10 mL'ye tamamlandı. Bu standart çözelti de bu haliyle 0,02 µg/mL OTA'dan oluştu. Daha sonra bu standart çözeltinin de metanol eklenerek seyreltilmesiyle HPLC kalibrasyon çözeltileri elde edildi. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla 6 farklı konsantrasyonda (0,4-0,8-2-10-20-60 ppb) hazırlanıp ikişer tekrarlı olarak HPLC cihazına enjekte edilen kalibrasyon çözeltilerinin içeriğindeki DON standartlarının oluşturduğu piklerin alanlarının hesaplanmasıyla, 6 farklı noktadan oluşan kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve linearite verileri hesaplandı (Şekil 5.2.5.1).



Şekil 5.2.5.1 Okratoksin A kalibrasyon eğrisi

Okratoksin A içermediği tespit edilmiş kör bir örneğe, 0,5 ppb'lik (0,0005 µg/mL OTA) Okratoksin A ara standart çözeltiden 500 µL eklendi ve bu işlem on tekrarlı gerçekleştirilerek geri kazanım çalışması yapıldı. Çıkan değerlerin ortalama ve standart sapması belirlendi, standart sapmanın (SS) 3 katı alınıp LOD değeri, 10 katı alınıp LOQ değeri bulundu. Okratoksin A için geri kazanım değerleri aşağıda belirtilen formül kullanılarak hesaplandı. Tekrarlanabilirlik değerleri ise kör örnekte OTA'nın geri kazanım çalışmalarından elde edilen değerlerin yüzde bağıl standart sapması (%RSD) alınarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{Geri kazanım} = \frac{\text{Standart eklenmiş örnek analiz sonucu } (\mu\text{g/kg}) \times 100}{\text{Eklenen standart miktarı } (\mu\text{g/kg})}$$

$$\% \text{RSD} = \frac{\text{Geri kazanım için hesaplanan standart sapma } (\%) \times 100}{\text{Geri kazanım için hesaplanan ortalama değer } (\%)}$$

%RSD, Relative standard deviation: Yüzde bağıl standart sapma

5.2.6. Hububatlarda okratoksin A risk tahmini

5.2.6.1. Maruziyet değerlendirmesi ve risk karakterizasyonu

Bireylerin kontamine olmuş besinleri ağız yoluyla tüketmesi sonucu ortaya çıkan maruziyet risk değerlendirmesi için, besinlerde tespit edilen OTA konsantrasyonları (µg/kg) ile TÜİK Bitkisel Ürün Denge Tabloları verilerine göre ülkemizde ortalama aşurelik buğday (17,4 kg/kişi/yıl), pirinç (8 kg/kişi/yıl), mısır (13,1 kg/kişi/yıl), tam buğday (82,6 kg/kişi/yıl) tüketim miktarları ile çarpıldı (TÜİK, 2019). Daha sonra EFSA tarafından önerilen yetişkin bireyler için 70 kg ortalama vücut ağırlığına bölünerek muhtemel günlük alım (EDI, estimated daily intake) belirlendi (EFSA, 2012). Her bir çalışılan örnek grubunun ve mikotoksinin muhtemel günlük alımının belirlenmesi, aşağıda gösterildiği gibi hesaplandı (Ismail ve ark, 2015).

$$\text{EDI (ng/kg v.a./gün)} = [\text{Cm(ng/kg)} \times \text{K(kg/gün)}]$$

ortalama vücut ağırlığı (kg)

EDI, Estimated daily intake: muhtemel günlük alım

Cm, Concentration of mycotoxins: Besinlerde belirlenen mikotoksinin ortalama konsantrasyonu

K: Araştırılan besinin bir günde kg cinsinden yetişkin bir popülasyondaki kişi başı tüketim miktarı

Ortalama vücut ağırlığı: 70 kg

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan “Besinlerdeki Kimyasalların Diyetel Maruziyet Değerlendirmesi” raporu doğrultusunda; ilgili besin grupları için OTA maruziyeti belirlenirken, ortalama toksin konsantrasyonunun hesaplanmasında tespit edilemeyen, LOD ve LOQ’un altında kalan değerleri hesaplama dahil etmek için önerilen metod uygulandı. Okratoksin A konsantrasyonu tespit edilemeyen ve <LOD olan ürünler için tahmini alt sınır (LB, Lower Bound) hesaplamasında “sıfır”, konsantrasyonu <LOQ olan ürünler için LB hesaplamasında LOD değeri kullanıldı. Tahmini orta sınır (MB, Middle Bound) hesaplamasında konsantrasyonu tespit edilemeyen ve <LOD olan ürünler için $\frac{1}{2}$ LOD, konsantrasyonu <LOQ olan ürünler için $\frac{1}{2}$ LOQ hesaplamaya katıldı. Tahmini üst sınır (UB, Upper Bound) hesaplamasında ise konsantrasyonu tespit edilemeyen ve <LOD olan ürünler için LOD, konsantrasyonu <LOQ olan ürünler için LOQ değerleri dikkate alındı (WHO, 2020). EDI hesaplandıktan sonra her bir mikotoksinin sağlık risk karakterizasyonu (%TDI), EDI’nın aşağıda gösterildiği gibi “tolere edilebilir günlük alım”a (TDI, $\mu\text{g}/\text{kg v.a./day}$) bölünmesiyle elde edilir. EFSA ve JECFA gibi ilgili kurumlar tarafından belirlenen bir değer olan TDI, sağlık riski olmadan bir ömür boyu tüketilebilecek bir maddenin miktarını gösterir (Wang et all, 2018, EFSA, 2014). Ancak EFSA tarafından yayınlanan 2020 raporunda OTA için daha önceden belirlenmiş olan haftalık tolere edilebilir alım miktarı (PTWI = 120 ng/kg v.a.) yerine maruz kalma marjı (MoE) değeri yaklaşımının benimsenmesinin gerekli olduğu bildirilmiş olup biz de çalışmamızda OTA risk karakterizasyonu için bu yaklaşımı uygulamış bulunuyoruz. MoE; BMDL’nin, OTA’nın EDI’sine bölünmesiyle hesaplandı. OTA için neoplastik etkilerin karakterizasyonunda 14,5 $\mu\text{g}/\text{kg v.a./gün}$ değerleri EFSA’nın 2020 raporundan elde edildi. Düşük sağlık riskinden bahsedebilmemiz için $\text{MoE} \geq 10,000$ olması gerekmektedir (Schernk, 2020).

$$\%TDI = \frac{EDI \times 100}{TDI}$$

$$\%MoE = \frac{BMDL}{EDI}$$

TDI, Tolerable daily intake: Tolere edilebilir günlük alım

EDI, Estimated daily intake: Muhtemel günlük alım

MoE, Margin of exposure: Maruz kalma marjı

BMDL, Benchmark dose lower limit: Kıyaslama dozu alt limiti



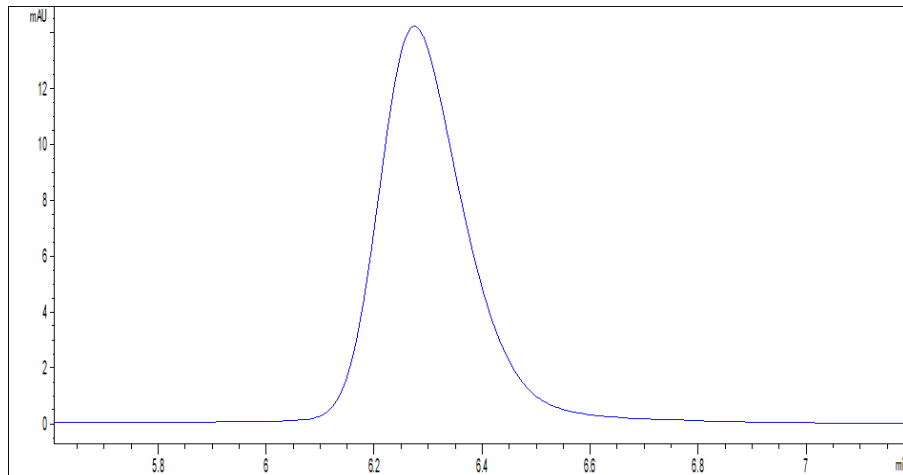
6. BULGULAR

Bu çalışmada, Türkiye’de önemli miktarda üretilen ve tüketilmekte olan hububatlardan toplamda 96 örnek olmak üzere, 24 aşurelik buğday, 24 pirinç, 24 mısır unu ve 24 tam buğday ununda mikotoksinlerden DON ve OTA’ nın HPLC ile analizlerinin yapılması amaçlanmış olup, çalışmanın bulguları tablolarda gösterilmiştir.

6.1. Deoksinivalenol Analizi için Kullanılan Metod Performansının Değerlendirilmesi

Aşurelik buğday, pirinç, mısır unu, tam buğday unu örneklerinde deoksinivalenol varlığını ve miktarını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen HPLC analizinin metod validasyonu için linearite aralığı, linearite eşitliği ve kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları (R^2)’ndan oluşan linearite verilerinin yanı sıra, tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ) belirlendi.

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla, DON (5 $\mu\text{g/mL}$) içerikli HPLC cihazına enjekte edilen DON standardına ait HPLC kromatogramı Şekil 6.1.1’de gösterildi. Oluşan kromatograma göre DON alıkonma zamanı 6,2 dk olarak belirlendi.



Şekil 6.1.1. DON standardına ait HPLC kromatogramı (DON: 5 $\mu\text{g/mL}$)

Deoksinivalenol içermediği tespit edilen kör bir örneğe, DON ara standart çözeltiden (5 ppb) eklenip, geri kazanım sonucu hesaplanan DON analizine ait tespit limit (LOD), ölçüm limiti (LOQ) ve geri kazanım sırasıyla; 0,28 µg/kg, 0,92 µg/kg ve %96 bulunmuştur. 5 farklı konsantrasyonda hazırlanıp HPLC cihazına enjekte edilen piklerin alanlarının hesaplanmasıyla oluşan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (R^2)=0,9998 bulunmuştur.

6.2. Aşurelik Buğday, Pirinç, Mısır Unu ve Tam Buğday Unu Örneklerinde DON varlığı ve Miktarı

96 adet hububat örneğinin HPLC ile analizi sonucunda 25 adet örnekte (0,13-1,16 µg/kg) DON tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 0,28-0,92 µg/kg). Analizi yapılan örneklerden; 7 adet aşurelik buğday, 8 adet pirinç, 8 adet mısır unu ve 2 adet tam buğday ununda DON saptanmıştır. En yüksek DON düzeyi açıkta satılan mısır unu örneğinde (1,16 µg/kg) tespit edilmiştir.

Tablo 6.2.1. Aşurelik buğday örneklerinde HPLC ile DON analiz sonuçları

	Örnek No	Üretim Yeri	DON (µg/kg)	Örnek No	Üretim Yeri	DON (µg/kg)
Açıkta satılan	1 ^a	Konya	TE	5 ^p	OB	>LOQ
	10 ^a	Konya	<LOQ	14 ^p	OB	<LOQ
	16 ^a	Konya	<LOQ	19 ^p	OB	<LOQ
	23 ^a	Malatya	<LOQ	27 ^p	Sakarya	TE
	31 ^a	Konya	TE	34 ^p	OB	TE
	42 ^a	Malatya	TE	46 ^p	Ankara	TE
	55 ^a	Konya	TE	51 ^p	OB	TE
	62 ^a	Konya	TE	59 ^p	OB	TE
	66 ^a	Konya	TE	70 ^p	OB	TE
	76 ^a	Konya	<LOQ	80 ^p	OB	TE
	89 ^a	Konya	TE	87 ^p	Ankara	TE
	91 ^a	Konya	TE	93 ^p	Ankara	TE

^aAçıkta satılan dökme ürün

^pMarketten alınan paketli ürün

OB: Orijini bilinmiyor

TE: Tespit edilemedi

Tablo 6.2.2. Pirinç örneklerinde HPLC ile DON analiz sonuçları

Örnek No	Üretim Yeri	DON (µg/kg)	Örnek No	Üretim Yeri	DON (µg/kg)
2 ^a	Çorum	>LOQ	6 ^p	Edirne	<LOQ
11 ^a	Çorum	<LOQ	15 ^p	Trakya	<LOQ
17 ^a	Samsun	<LOQ	20 ^p	Bolu	<LOQ
24 ^a	Bolu	<LOQ	28 ^p	OB	TE
32 ^a	Çorum	TE	35 ^p	Çorum	TE
43 ^a	Bolu	TE	37 ^p	Çorum	TE
56 ^a	Bolu	TE	47 ^p	Samsun	<LOQ
63 ^a	Çorum	TE	52 ^p	OB	TE
67 ^a	Çorum	TE	60 ^p	Bolu	TE
77 ^a	Çorum	TE	71 ^p	Çorum	TE
90 ^a	Bolu	TE	81 ^p	Bolu	TE
92 ^a	Bolu	TE	94 ^p	OB	TE

^aAçıkta satılan dökme ürün

^pMarketten alınan paketli ürün

OB: Orijini bilinmiyor

TE: Tespit edilemedi

Tablo 6.2.3. Mısır unu örneklerinde HPLC ile DON analiz sonuçları

Örnek No	Üretim Yeri	DON (µg/kg)	Örnek No	Üretim Yeri	DON (µg/kg)
3 ^a	Giresun	<LOQ	7 ^p	OB	>LOQ
4 ^a	Ordu	>LOQ	12 ^p	OB	<LOQ
13 ^a	Rize	<LOQ	21 ^p	OB	<LOQ
18 ^a	Giresun	<LOQ	29 ^p	OB	TE
25 ^a	Rize	<LOQ	36 ^p	OB	TE
33 ^a	Rize	TE	48 ^p	Eskişehir	TE
41 ^a	Giresun	TE	53 ^p	OB	TE
44 ^a	Trabzon	TE	61 ^p	OB	TE
57 ^a	Ordu	TE	72 ^p	OB	TE
64 ^a	Trabzon	TE	82 ^p	OB	TE
68 ^a	G.antep	TE	88 ^p	Ankara	TE
78 ^a	Mersin	TE	95 ^p	OB	TE

^aAçıkta satılan dökme ürün

^pMarketten alınan paketli ürün

OB: Orijini bilinmiyor

TE: Tespit edilemedi

Tablo 6.2.4. Tam buğday unu örneklerinde HPLC ile DON analiz sonuçları

Örnek No	Üretim Yeri	DON (µg/kg)	Örnek No	Üretim Yeri	DON (µg/kg)
26 ^a	Malatya	TE	8 ^p	OB	<LOQ
38 ^a	Antalya	TE	9 ^p	Kırşehir	TE
39 ^a	OB	TE	22 ^p	OB	<LOQ
40 ^a	Muğla	TE	30 ^p	Tekirdağ	TE
45 ^a	Muğla	TE	49 ^p	Aydın	TE
50 ^a	OB	TE	54 ^p	Konya	TE
58 ^a	Konya	TE	65 ^p	Konya	TE
69 ^a	G.antep	TE	73 ^p	OB	TE
74 ^a	İzmir	TE	83 ^p	Tekirdağ	TE
75 ^a	OB	TE	85 ^p	Konya	TE
79 ^a	OB	TE	86 ^p	OB	TE
84 ^a	OB	TE	96 ^p	Tekirdağ	TE

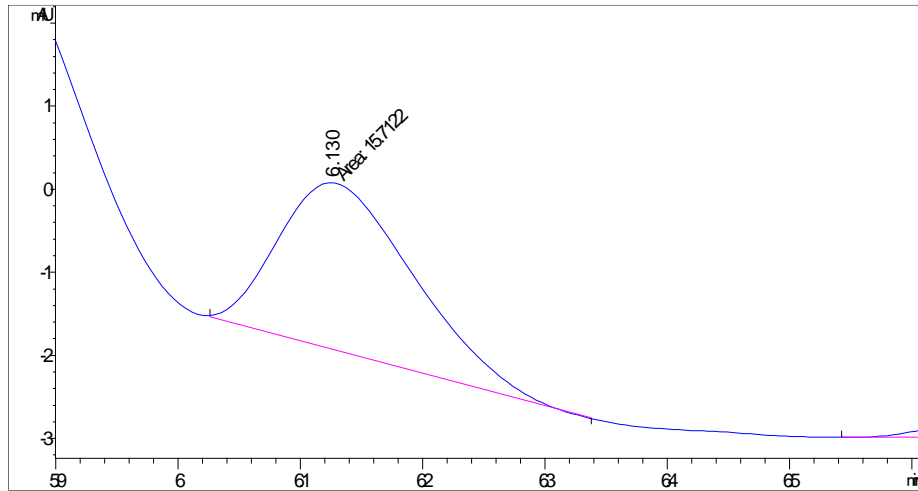
^aAçıkta satılan dökme ürün

^pMarketten alınan paketli ürün

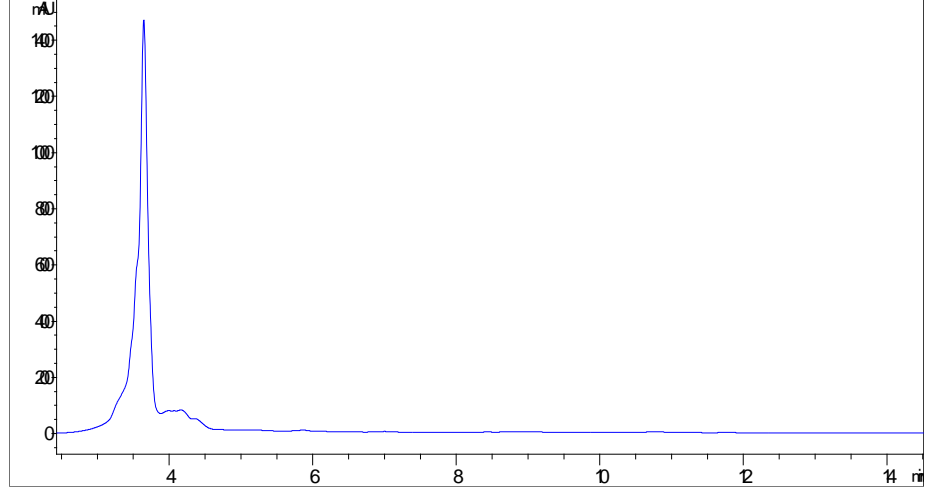
OB: Orijini bilinmiyor

TE: Tespit edilemedi

DON karşılaştırmasının kolay olması açısından, yukarıda da verilen HPLC cihazına enjekte edilen kalibrasyon çözeltilerine ait HPLC kromatogramları gösterildi. Oluşan kromatogramlara göre DON alıkonma zamanı 6,2 dk. olarak belirlendi. Şekil 6.2.1’de DON ile kontamine olmuş mısır unu örneğine ait HPLC kromatogramı verildi. Şekil 6.2.2’de ise DON bulunmayan mısır unu örneğine ait HPLC blank kromatogramı gösterildi.



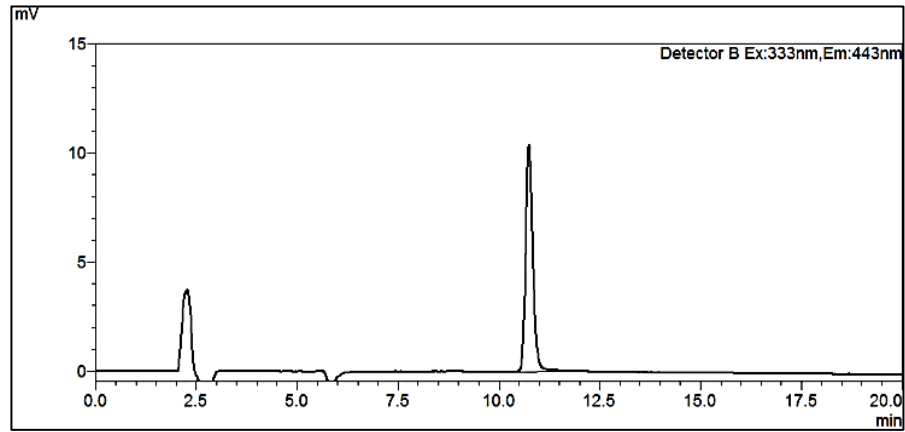
Şekil 6.2.1. DON ile kontamine olmuş mısır unu örneğine ait HPLC kromatogramı



Şekil 6.2.2. DON bulunmayan mısır unu örneğine ait HPLC kromatogramı

6.3. Okratoksin A Analizi için Kullanılan Metod Performansının Değerlendirilmesi

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla, OTA (2 µg/mL) içerikli, HPLC cihazına enjekte edilen OTA standardına ait HPLC-FLD kromatogramı Şekil 6.3.1’de gösterildi. Oluşan kromatograma göre OTA’nın alıkonma zamanı 10,7 dk. olarak belirlendi.



Şekil 6.3.1. OTA standardına ait HPLC kromatogramı (OTA: 2 µg/mL)

Okratoksin A analizi için kullanılan metod performans değerlendirilmesinin yapılabilmesi için; linearite aralığı, linearite eşitliği ve kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları (R^2) verilerin yanı sıra LOD, LOQ, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik uygulamaları yapılmıştır. 6 farklı

konsantrasyonda hazırlanıp HPLC cihazına enjekte edilen piklerin alanlarının hesaplanmasıyla kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve hesaplamalar sonucu bu kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (R^2)=1 bulunmuştur. Elde edilen R^2 sonucu, metod validasyon çalışmaları için kabul edilebilir değer olarak tespit edilmiştir.

Okratoksin A içermediği tespit edilen kör bir örneğe, OTA standart çözeltiden (0.8 ppb) eklenip, on tekrarlı geri kazanım sonucu hesaplanan OTA analizine ait LOD, LOQ, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik değerleri sırasıyla; 0,029 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,097 $\mu\text{g}/\text{kg}$, %96,75 ve %1,15 saptanmıştır. Yapılan hesaplamalarda Microsoft Excel 2016 programı kullanılmıştır.

6.4. Aşurelik Buğday, Pirinç, Mısır Unu ve Tam Buğday Unu Örneklerinde OTA varlığı ve Miktarı

96 adet hububat örneğinin HPLC ile analizi sonucunda örneklerin 11 adedinde (0,87-6,97 $\mu\text{g}/\text{kg}$) OTA tespit edilmiştir (LOD-LOQ, =0,029-0,097 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Analizi yapılan örneklerden; 3 adet mısır ununda (1,51-2,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ve 8 adet tam buğday ununda (0,87-6,97 $\mu\text{g}/\text{kg}$), OTA saptanmıştır. En yüksek OTA düzeyi marketten alınan paketli tam buğday unu örneğinde (6,97 $\mu\text{g}/\text{kg}$) saptanmıştır.

Tablo 6.4.1. Aşurelik buğday örneklerinde HPLC ile OTA analiz sonuçları

	Örnek No	Üretim Yeri	OTA ^c ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Örnek No	Üretim Yeri	OTA ^c ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Açıkta satılan	1 ^a	Konya	TE	5 ^p	OB	TE
	10 ^a	Konya	TE	14 ^p	OB	TE
	16 ^a	Konya	TE	19 ^p	OB	TE
	23 ^a	Malatya	TE	27 ^p	Sakarya	TE
	31 ^a	Konya	TE	34 ^p	OB	TE
	42 ^a	Malatya	TE	46 ^p	Ankara	TE
	55 ^a	Konya	TE	51 ^p	OB	TE
	62 ^a	Konya	TE	59 ^p	OB	TE
	66 ^a	Konya	TE	70 ^p	OB	TE
	76 ^a	Konya	TE	80 ^p	OB	TE
Marketten satılan	89 ^a	Konya	TE	87 ^p	Ankara	TE
	91 ^a	Konya	TE	93 ^p	Ankara	TE

^aAçıkta satılan dökme ürün

^pMarketten alınan paketli ürün

^cSonuçlar, üç tekrarlı analiz sonucunun ortalamasını ve standart sapmasını ifade etmektedir

OB: Orijini bilinmiyor

TE: Tespit edilemedi

Tablo 6.4.2. Pirinç örneklerinde HPLC ile OTA analiz sonuçları

Örnek No	Üretim Yeri	OTA ^c (µg/kg)	Örnek No	Üretim Yeri	OTA ^c (µg/kg)
2 ^a	Çorum	TE	6 ^p	Edirne	TE
11 ^a	Çorum	TE	15 ^p	Trakya	TE
17 ^a	Samsun	TE	20 ^p	Bolu	TE
24 ^a	Bolu	TE	28 ^p	OB	TE
32 ^a	Çorum	TE	35 ^p	Çorum	TE
43 ^a	Bolu	TE	37 ^p	Çorum	TE
56 ^a	Bolu	TE	47 ^p	Samsun	TE
63 ^a	Çorum	TE	52 ^p	OB	TE
67 ^a	Çorum	TE	60 ^p	Bolu	TE
77 ^a	Çorum	TE	71 ^p	Çorum	TE
90 ^a	Bolu	TE	81 ^p	Bolu	TE
92 ^a	Bolu	TE	94 ^p	OB	TE

^aAçıkta satılan dökme ürün

^pMarketten alınan paketli ürün

^cSonuçlar, üç tekrarlı analiz sonucunun ortalamasını ve standart sapmasını ifade etmektedir

OB: Orijini bilinmiyor

TE: Tespit edilemedi

Tablo 6.4.3. Mısır unu örneklerinde HPLC ile OTA analiz sonuçları

Örnek No	Üretim Yeri	OTA ^c (µg/kg)	Örnek No	Üretim Yeri	OTA ^c (µg/kg)
3 ^a	Giresun	TE	7 ^p	OB	TE
4 ^a	Ordu	TE	12 ^p	OB	TE
13 ^a	Rize	TE	21 ^p	OB	TE
18 ^a	Giresun	TE	29 ^p	OB	TE
25 ^a	Rize	TE	36 ^p	OB	TE
33 ^a	Rize	TE	48 ^p	Eskişehir	1,51±0,03
41 ^a	Giresun	TE	53 ^p	OB	2,23±0,03
44 ^a	Trabzon	TE	61 ^p	OB	1,50±0,03
57 ^a	Ordu	TE	72 ^p	OB	TE
64 ^a	Trabzon	TE	82 ^p	OB	TE
68 ^a	G.antep	TE	88 ^p	Ankara	TE
78 ^a	Mersin	TE	95 ^p	OB	TE

^aAçıkta satılan dökme ürün

^pMarketten alınan paketli ürün

^cSonuçlar, üç tekrarlı analiz sonucunun ortalamasını ve standart sapmasını ifade etmektedir

OB: Orijini bilinmiyor

TE: Tespit edilemedi

±: Standart sapma

Tablo 6.4.4. Tam buğday unu örneklerinde HPLC ile OTA analiz sonuçları

Örnek No	Üretim Yeri	OTA ^c (µg/kg)	Örnek No	Üretim Yeri	OTA ^c (µg/kg)
26 ^a	Malatya	1,31±0,03	8 ^P	OB	1,79±0,05
38 ^a	Antalya	TE	9 ^P	Kırşehir	6,97±0,21
39 ^a	OB	TE	22 ^P	OB	TE
40 ^a	Muğla	TE	30 ^P	Tekirdağ	TE
45 ^a	Muğla	1,48±0,03	49 ^P	Aydın	TE
50 ^a	OB	TE	54 ^P	Konya	0,92±0,03
58 ^a	Konya	TE	65 ^P	Konya	TE
69 ^a	G.antep	TE	73 ^P	OB	4,20±0,05
74 ^a	İzmir	TE	83 ^P	Tekirdağ	TE
75 ^a	OB	TE	85 ^P	Konya	TE
79 ^a	OB	TE	86 ^P	OB	TE
84 ^a	OB	0,87±0,03	96 ^P	Tekirdağ	0,84±0,03

^aAçıkta satılan dökme ürün

^PMarketten alınan paketli ürün

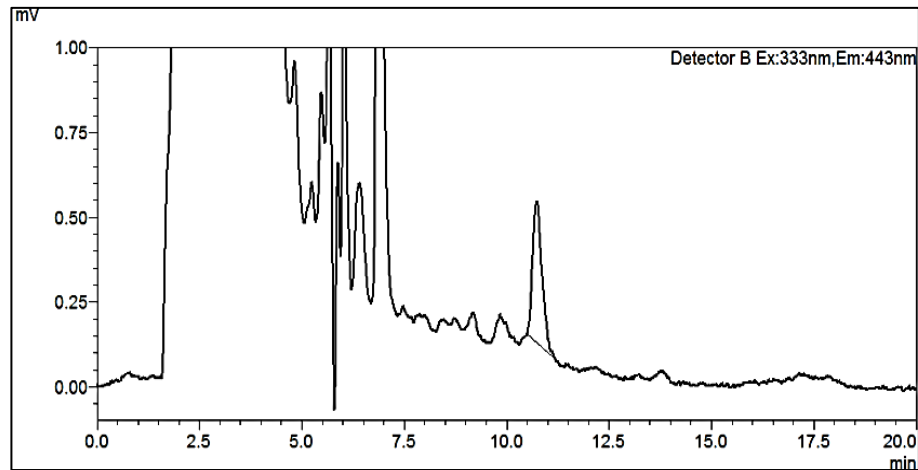
^cSonuçlar, üç tekrarlı analiz sonucunun ortalamasını ve standart sapmasını ifade etmektedir

OB: Orijini bilinmiyor

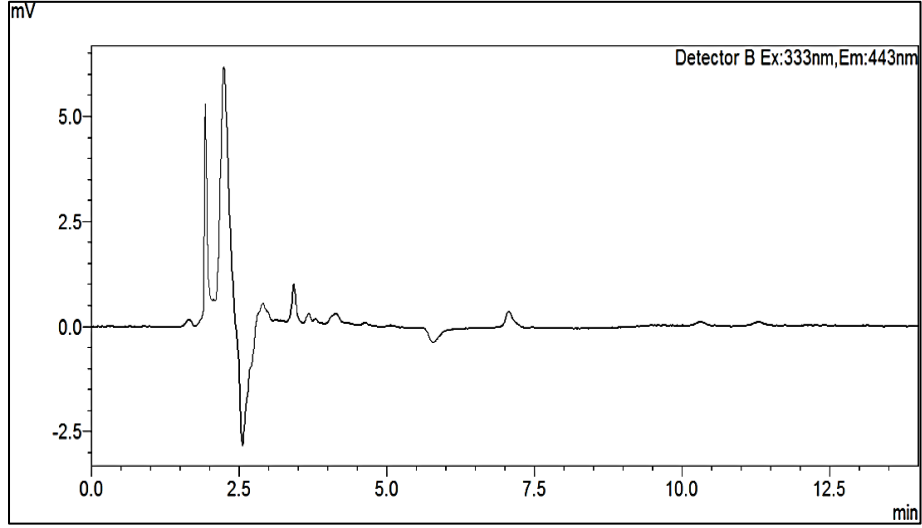
TE: Tespit edilemedi

±: Standart sapma

OTA karşılaştırmasının kolay olması açısından, yukarıda da verilen HPLC cihazına enjekte edilen kalibrasyon çözeltilerine ait HPLC-FLD kromatogramları gösterildi. Oluşan kromatogramlara göre OTA'nın alıkonma zamanı 10,7 dk. olarak belirlendi. Şekil 6.4.1'de OTA ile kontamine olmuş tam buğday unu örneğine ait HPLC-FLD kromatogramı verildi. Şekil 6.4.2'de ise OTA bulunmayan tam buğday unu örneğine ait HPLC-FLD blank kromatogramı gösterildi.



Şekil 6.4.1. OTA ile kontamine olmuş tam buğday unu örneğine ait HPLC-FLD kromatogramı



Şekil 6.4.2. OTA içermeyen tam buğday unu örneğine ait HPLC-FLD kromatogramı

6.5. Aşurelik Buğday, Pirinç, Mısır Unu ve Tam Buğday Unu Örneklerinde DON ve OTA Açısından Risk Tahmini

6.5.1. Maruziyet değerlendirmesi ve risk karakterizasyonu

Bireylerin kontamine olmuş besinleri ağız yoluyla tüketmesi sonucu ortaya çıkan maruziyet risk değerlendirmesi için, besinlerde tespit edilen DON ve OTA konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ile TÜİK Bitkisel Ürün Denge Tabloları verilerine göre ülkemizde ortalama aşurelik buğday (17,4 kg/kişi/yıl), pirinç (8 kg/kişi/yıl), mısır (13,1 kg/kişi/yıl), tam buğday (82,6 kg/kişi/yıl) tüketim miktarları ile çarpıldı (TÜİK, 2019). Daha sonra EFSA tarafından önerilen yetişkin bireyler için 70 kg ortalama vücut ağırlığına bölünerek muhtemel günlük alım (EDI) belirlendi (EFSA, 2012).

Aşurelik buğday, pirinç, mısır unu ve tam buğday unlarında DON ve OTA'ların LB, MB ve UB düzeylerdeki tahmini konsantrasyon miktarları ile bu ürünleri tüketen yetişkinlerin tahmini günlük alımları LB, MB ve UB düzeyinde hesaplanıp Tablo 6.5.1.1 ve Tablo 6.5.1.2 de gösterildi.

Bu besin gruplarında, yetişkinler için DON'un tahmini MB, LB ve UB günlük alımları 0,00-0,92 ng/kg v.a./gün aralığında bulundu. Kıyaslama

yapabilmek için EFSA tarafından belirlenmiş olan, maruziyet seviyesi için risk kabul edilen, kıyaslama dozu alt sınırı (BMDL 1 µg/kg v.a./gün) kullanıldı (EFSA, 2013).

OTA'nın ise tahmini MB, LB ve UB günlük alımları 0,000-2,481 ng/kg v.a./gün aralığında bulundu. EFSA tarafından belirlenmiş olan, neoplastik durumlar için risk kabul edilen, kıyaslama dozu alt sınırı (BMDL 14,5 µg/kg v.a./gün) kullanıldı (Sherenk ve ark., 2020).

Tablo 6.5.1.1 ve Tablo 6.5.1.2 tahmini günlük alıma (EDI) ve BMDL'ye bağlı olarak, yetişkin bireyler için değerlendirilen DON ve OTA'nın tahmini diyetel maruziyet risk karakterizasyonunu (MoE) göstermektedir. Aşurelik buğday, pirinç, mısır unu ve tam buğday ununun her birinde MoE, hem DON hem de OTA için bu numunelerde >10,000 olarak bulundu. Düşük sağlık riskinden bahsedebilmemiz için MoE ≥ 10,000 olması gerekmektedir (Sherenk et al., 2020).

Tablo 6.5.1.1. Hububatlarında DON'un MB, LB ve UB düzeylerdeki tahmini konsantrasyon miktarları, tahmini günlük alımları ve diyetel maruziyetleri

Ürün Çeşidi	Örnek sayısı (n)	DON konsantrasyonu (µg/kg)		Günlük tüketim (g/gün)	DON tahmini ortalama alım (ng/kg v.a./gün)		Kıyaslama dozu alt limiti (ng/kg v.a./gün) BMDL ^c	Maruziyet marjı MOE ^d
		MB ^a	LB-UB ^b		MB ^a	LB-UB ^b		
Aşurelik Buğday	24	0,23	0,09-0,42	48,3	0,16	0,06-0,29	1,000	>10,000
Pirinç	24	0,20	0,06-0,36	22,2	0,63	0,02-0,11	1,000	>10,000
Mısır Unu	24	0,27	0,14-0,46	36,4	0,14	0,07-0,24	1,000	>10,000
Tam Buğday Unu	24	0,14	0,00-0,28	229,3	0,46	0,00-0,92	1,000	>10,000

^aMB: Medium Bound Estimate, Tahmini orta sınır: Konsantrasyon <LOD olanlar için ½ LOD değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için ½ LOQ değeri kullanıldı.

^bLB: Lower Bound Estimate, Tahmini alt sınır: Konsantrasyon <LOD olanlar için “sıfır” değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için LOD değeri kullanıldı. UB: Upper Bound Estimate, Tahmini üst sınır: Konsantrasyon <LOD olanlar için LOD değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için LOQ değeri kullanıldı.

^cBMDL: Benchmark dose, Kıyaslama dozu alt limiti: DON için BMDL (1 µg/kg v.a./gün), hesaplamada 1,000 ng/kg v.a./gün kullanılmıştır.

^dMOE: Margin of exposure, Maruziyet marjı: BMDL'nin, tahmini ortalama alıma (EDI) bölünmesi ile bulunur

Tablo 6.5.1.2. Hububatlarında OTA'nın MB, LB ve UB düzeylerdeki tahmini konsantrasyon miktarları, tahmini günlük alımları ve diyetsetel maruziyetleri

Ürün Çeşidi	Örnek sayısı (n)	OTA konsantrasyonu (µg/kg)		Günlük tüketim (g/gün)	OTA tahmini ortalama alım (ng/kg v.a./gün)		Kıyaslama dozu alt limiti (ng/kg v.a./gün) BMDL ^c	Maruziyet marjı MOE ^d
		MB ^a	LB-UB ^b		MB ^a	LB-UB ^b		
Aşurelik Buğday	24	0,014	0,000-0,029	48,3	0,009	0,000-0,009	14,500	>10,000
Pirinç	24	0,014	0,000-0,029	22,2	0,004	0,000-0,020	14,500	>10,000
Mısır Unu	24	0,222	0,209-0,235	36,4	0,114	0,107-0,121	14,500	>10,000
Tam Buğday Unu	24	0,745	0,735-0,755	229,3	2,449	2,415-2,481	14,500	>10,000

^aMB: Medium Bound Estimate, Tahmini orta sınır: Konsantrasyon <LOD olanlar için ½ LOD değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için ½ LOQ değeri kullanıldı.

^bLB: Lower Bound Estimate, Tahmini alt sınır: Konsantrasyon <LOD olanlar için "sıfır" değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için LOD değeri kullanıldı. UB: Upper Bound Estimate, Tahmini üst sınır: Konsantrasyon <LOD olanlar için LOD değeri kullanıldı; Konsantrasyon <LOQ olanlar için LOQ değeri kullanıldı.

^cBMDL: Benchmark dose, Kıyaslama dozu alt limiti: OTA için BMDL (14,5 µg/kg v.a./gün), hesaplamada 14,500 ng/kg v.a./gün kullanılmıştır.

^dMOE: Margin of exposure, Maruziyet marjı: BMDL'nin, tahmini ortalama alıma (EDI) bölünmesi ile bulunur.

7. TARTIŞMA

Mikotoksinler ile ilgili dünyada ilk çalışmalar hububatlar üzerine yapılmıştır. 1900'lü yılların başında küflerin ürettiği penisilinlerin keşfinden sonra, araştırmacılar antibiyotik konusundaki çalışmalarını da arttırmışlardır (Çelik, 2008). Başlangıçta antibiyotik olarak kabul edilen bazı küf metabolitleri sonradan toksik madde olarak kabul edilmiş ve toksinler olarak sınıflandırılmışlardır (Peraica ve ark., 1999). Ülkemizde mikotoksin sorunu ilk olarak Kanada'ya 1967 yılında ihraç edilen fındıkların aflatoksin miktarının limitlerin üzerinde olması tespitiyle geri çevrilmesiyle raporlanmıştır (Artık, 2007).

Çalışmamız sonucunda 96 adet hububat örneğinin HPLC ile analizi sonucunda 25 adet örnekte (0,13-1,16 µg/kg) DON tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 0,28-0,92 µg/kg). Analizi yapılan örneklerden; 7 adet aşurelik buğday, 8 adet pirinç, 8 adet mısır unu ve 2 adet tam buğday ununda DON saptanmıştır. En yüksek DON düzeyi açıkta satılan mısır unu örneğinde (1,16 µg/kg) tespit edilmiştir. 2002 yılında Türkiye'de ilk hububatlarda DON maruziyeti üzerine yapılan, 68 tane hububat ve 15 tane bakliyat örneğinin incelendiği çalışmada; hububat örneklerinin %8,82'sinde DON tespit edilmiştir ve en yüksek DON düzeyi bizim çalışmamızda olduğu gibi pazardan alınan mısır unu örneğinde (2,67 ppm) saptanmıştır (Omurtag ve Beyoglu, 2003). Bakırcı'nın 2014 yılında yaptığı çalışmada toplam 381 tane hububat bazlı örnekte HPLC yöntemi kullanarak DON miktarları araştırılmıştır. Bu yapılan çalışmada 144 örneğin 13 tanesinde 132,4-9589,4 µg/kg aralığında DON tespit edilmiştir (Bakirci, 2014). 2020 yılında yayımlanan ve İstanbul'da çeşitli fırın ve marketlerden toplanan 112 farklı un örneği ile yapılan çalışmada; 41 örnekte 0,06-70,04 µg/kg arasında DON tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 2,22-7,40 ppb) (Turkessiz ve Bostan, 2020). Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan 240 hububat ve hububat bazlı örnekte HPLC yöntemi ile yapılan bir başka çalışmada ise; 13 buğday (58–1092 µg/kg), 2 mısır (313–331 µg/kg), 3 arpa (138–973 µg/kg), 7 çeltik (136-256 µg/kg), 3

buğday unu (92–151 µg/kg), 2 bisküvi (31.2–71.3 µg/kg) ve sadece 1 makarnada (49.3 µg/kg) DON tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 46,9-72,3 µg/kg) (Golge ve Kabak, 2020). Katar’da marketlerden alınmış 106 adet hububat ve hububat bazlı örnekler içeren çalışmanın sonucunda; örneklerin %4’ünde (86.43-182.94 µg/kg) DON kontaminasyonu tespit edilmiştir (Abdulkadar ve ark., 2004). Ontario’da 2008-2009 yılları arasında toplanan 100 adet hububat örneğinde (25 kışlık buğday, 15 baharlık buğday, 15 mısır, 10 yulaf, 20 arpa, 15 çavdar) DON kontaminasyonu araştırılmıştır. Araştırma sonucu; 25 adet kışlık buğdayın tamamında (1,044-982 ng/g), 15 adet baharlık buğdayın tamamında (1,207-122 ng/g), 15 mısır örneğinin 14’ünde (1,041-989 ng/g), yulaf örneklerinin 6’sında (22-71 g/g), arpa örneklerinin tamamında (1,071-973 ng/g), çavdar örneklerinin tamamında (87-500 ng/g) DON tespit edilmiştir (Martos ve ark., 2010). Güney Afrika’da yapılan bir çalışma sonucunda 18 mısır örneğinden 16’sının (%89) ortalama 294 µg/kg seviyesinde DON ile kontamine olduğunu saptamıştır (Shephard ve ark., 2010). İtalya’da 2006 ve 2007 yılındaki mısır örneklerini inceleyen bir çalışmada; 2006 yılındaki 47 örneğin tümünde 197-3980 µg/kg seviyelerinde DON tespit edilmiştir. Çalışmanın 2007 yılına ait bölümünde 36 adet mısır örneğinin %89’unda 14 µg/kg ulaşan düzeylerde DON tespit edilmiştir (Covarelli ve ark., 2011). Litvanya’da 2006-2007 dönemi hasat zamanlarında kışlık ve baharlık toplam 125 adet buğday, arpa ve çavdar numuneleri ELİSA metodu ile DON açısından incelenmiştir. 2006 yılı kışlık 32 adet örnekte 223 µg/kg, baharlık 32 örnekte 100-231 µg/kg arası, 2007 kışlık 28 örnekte 146,3-171,3 µg/kg arası, baharlık 33 örnekte 138-445 µg/kg arası düzeylerde DON kontaminasyonu tespit edilmiştir (Mankevičienė ve ark., 2011). Brezilya’nın Parana Eyaleti’nde 2008-2009 hasat yıllarında temin edilen 113 buğday örneğinin 75’inde (%66,4) 206-4732 µg/kg seviyelerinde DON tespit edilmiştir (Sfuentes dos Santos ve ark., 2013). Blesa ve arkadaşları 2014 yılında 80 tane durum buğdayını DON açısından araştırmıştır. Çalışmada 80 örneğin 4’ünde 121-1480 µg/kg seviyelerinde DON belirlenmiştir (Blesa ve ark., 2014). İspanya’nın çeşitli bölgelerinde bulunan marketler ve perakendecilerden temin edilen farklı markalardaki 182 adet hububat bazlı ve glutensiz ürünler DON yönünden analiz edilmiştir. Buğday bazlı 119 ürünün %79,8’inde DON

kontaminasyonuna maksimum 83,2 µg/kg'a ulaşan düzeylerde rastlanmıştır. 23 adet pirinç örneğinin %13'ünde DON tespit edilmiştir ve maksimum 5,5 µg/kg'a ulaşan düzeyde ölçülmüştür. Aynı araştırmada 17 mısır örneğinin %29,4'ünde maksimum 22,1 µg/kg'a ulaşan DON tespit edilmiştir (Rodríguez ve ark., 2014). İran'da 34 buğday örneği ile yapılan bir araştırmada; örneklerin 8'inde DON (1,2-1746,5 µg/kg), 3'ünde OTA (1,9-41,5 µg/kg) tespit edilmiştir (Sadhasivam ve ark., 2017). Romanya'da hasat mevsimi 2014 yılı olan 31 tane işlenmemiş buğday ve 35 tane beyaz buğday unu örnekleri ile yapılan çalışmada; 8 buğday örneğinde 110-1787 µg/kg, 1 buğday unu örneğinde ise 190 µg/kg seviyelerinde DON tespit edilmiştir (Stanciu ve ark., 2017). Yapmış olduğumuz çalışma ve dünya genelinde yapılan benzer çalışmaların sonucunda; DON maruziyetinin hububatlarda, özellikle mısır/mısır ununda sık görüldüğü söylenebilmektedir. Bahsi geçen çalışmaların hepsi HPLC analizi sonucu DON seviyelerini göstermektedir. 2016 yılında IARC/WHO ortak basın açıklamasında, gelişmekte olan ülkelerde yaygın mikotoksin kontaminasyonuna karşı önlem alınması çağrısında bulunulmuştur: "Dünya çapında, beş yaşından küçük 160 milyondan fazla çocuk bodur durumda. Mikotoksin kontrolünün iyileştirilmesi, geniş kapsamlı bir sağlık yararına sahip olabilir. Düşük gelirli ülkelerde mikotoksin gıda kontaminasyonunu kontrol etmek için mevcut bilgi ve teknolojiyi harekete geçirmenin zamanı geldi" (IARC, WHO 2016). Bu nedenle, gelişmekte olan ülkelerde ve özellikle çocuklarda, DON maruziyeti riskini değerlendirmek için düzenli olarak hububat ve hububat kaynaklı gıdalarda çalışmalar gerekmektedir.

Hububat ve hububat bazlı ürünlerin OTA üretimi için oldukça uygun substratlar olduğu düşünülmektedir (González-Osnaya ve ark., 2007). OTA tarım ürünlerinden ilk olarak 1969 yılında mısırdaki saptanmıştır (Shotwell ve ark., 1969). Çoğunlukla mısır, buğday, yulaf, arpa, çavdar, pirinç, kuru meyveler, şarap, bira, bebek maması gibi çeşitli ürünlerde OTA bulunmaktadır (Nguyen ve Ryu, 2014). Bulgaristan, Romanya ve Tuna Nehri kıyı bölgelerinde görülen Balkan Endemik Nefropatisi ile ilişkili OTA'nın, bu bölgelerde incelenen hububat örneklerinde (n=765) OTA kontaminasyon sıklığı %3,1 ve OTA konsantrasyonu 11,8 µg/kg'a ulaşan seviyelerde bulunmuştur (Tunail, 2000).

Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'nın da bulunduğu 13 ülkede okratoksinlerin dağılımı ile ilgili yapılan bir araştırmada, okratoksinlerin besin ve yemlerdeki kontaminasyon oranının %1'den %30'a kadar değişen oranlarda bulunduğu bildirilmiştir. Kanada ve ABD'de kontaminasyon oranlarının %1 ile %14,2 arasında değişen oranlar olduğu saptanmıştır. OTA konsantrasyonunun 1979 ile 1987 yılları arasında 1,035 µg/kg olduğu, %83 oranındaki numunenin 200 µg/kg'dan daha küçük oranda OTA içerdiği, %3 oranındaki numunenin ise 20.000 ile 30.000 µg/kg düzeyinde kontamine olduğu, hayvan yemlerindeki kontaminasyonun oranının, besinlere göre çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Krogh ve ark., 1977).

Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda; 96 adet hububat örneğinin HPLC ile analizi sonucunda 11 adet örnekte (0,87-6,97 µg/kg) OTA tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 0,029-0,097 µg/kg). Analizi yapılan örneklerden; 3 adet mısır ununda (1,51-2,23 µg/kg) ve 8 adet tam buğday ununda (0,87-6,97 µg/kg), OTA saptanmıştır. En yüksek OTA düzeyi marketten alınan paketli tam buğday unu örneğinde (6,97 µg/kg) saptanmıştır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada buğday, mısır, mısır unu, yulaf gevreği, yulaf ezmesi ve müsli örneklerini içeren 100 adet örnekte OTA incelenmiştir. Örneklerden 1 adet aşurelik buğday (0,27 µg/kg), 2 adet mısır (1,79 ve 9,84 µg/kg) ve 1 adet yulaf ezmesinde (4,19 µg/kg) OTA tespit edilmiştir (Karagözlü ve Karapınar, 2000). Bursa'da çeşitli market ve fırınlardan alınan 34 adet buğday unu, 14 adet tam buğday unu, 10 adet mısır unu örneğinde OTA analizi sonucunda; buğday unu 6,89±0,46 µg/kg, tam buğday unu 9,3±1,33 µg/kg ve mısır unu 6,93 ±1,10 µg/kg seviyelerinde OTA tespit edilmiştir (Cengiz ve ark., 2007). Erzurum'da tüketilmekte olan 50 buğday unu örneğinde OTA analizi yapılan bir çalışmada; örneklerin %90'ında OTA saptanmıştır. 0,625-3 µg/kg değerleri arasında bulunan 5 pozitif örneğin Türk Gıda Kodeksi'ne göre kabul edilebilir sınırların (3 µg/kg) altında olduğu belirtilmiştir (Özturan ve ark., 2007). Yine ülkemizin Kayseri ilinde çeşitli hububat ürünlerinde (25 adet tam buğday unu, 25 adet pirinç ve 25 adet bulgur) OTA kontaminasyonu araştırılmıştır. Araştırma sonucunda; buğday unu örneklerinde 1011,84-14,66 g/kg, pirinç örneklerinde 381,93-153,76 g/kg, bulgur örneklerinde 548,80-158,53 g/kg değerleri arasında OTA tespit edilmiştir

(Şeviktürk ve Gönülalan, 2007). Adana’da marketler ve küçük dükkanlardan sağlanan 24 kahvaltılık gevrek, 24 hububat bazlı bebek maması ve 35 bira örneğinde HPLC-FD yöntemiyle OTA varlığı incelenmiştir. Kahvaltılık gevreklerin %38’inde (0,172-1,84 ng/ml), hububat bazlı bebek mamalarının %17’sinde (0,122-0,374 ng/ml) ve bira örneklerinin %14’ünde (0,012-0,045 ng/ml) OTA tespit edilmiştir (Özden ve ark., 2012). 60 adet buğday unu, 24 adet mısır unu ve 16 adet pirinç unu ile yapılan başka bir çalışmada; buğday unlarının %27’sinde 0,11-0,92 µg/kg, mısır unlarının %42’sinde 0,06-0,59 µg/kg, pirinç unlarının ise %19’unda 0,06-0,21 µg/kg seviyelerinde OTA tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 1-20 ng/ml) (Kara ve ark., 2015). 811 bitki bazlı örnekten 456 tanesi hububat ve hububat bazlı ürünleri içeren ve bu örneklerde OTA analizi yapılan bir başka çalışmada; hububat ve hububat bazlı örneklerin %37,5’inin ortalama 0,77 µg/kg düzeyinde OTA içerdiği tespit edilmiştir (Jiao ve ark., 1994). Slovakya’da hububatlarda yapılan bir çalışmada; 92 adet buğday örneğinin %75,8’inde (0,02-160 µg/kg) ve 51 adet mısır örneğinin %33,3’ünde (0,02-40 µg/kg) OTA saptanmıştır (Puntarić ve ark., 2001). Katar’da marketlerden alınmış 106 adet hububat ve hububat bazlı örnekler içeren daha önce bahsettiğimiz çalışmanın sonucunda; örneklerin %11’inde (0,18-6,81 µg/kg) OTA kontaminasyonu tespit edilmiştir (Abdulkadar ve ark., 2004). 60 adet hububat ve hububat bazlı marketlerden alınmış örnekler ile yapılan bir başka çalışmada, sırasıyla mısır, buğday ve arpada ortalama 1,08, 0,42 ve 0,17 µg/kg seviyelerinde OTA bulunmuştur (LOD-LOQ, 0,01-0,02 µg/kg) (Zinedine ve ark., 2006). İspanya ve Portekiz’den temin edilen 83 adet organik ve organik olmayan pirinç, buğday, arpa, çavdar, mısır ve yulaf örneklerinde yapılan OTA analizi sonucunda, örneklerin %22’sinde 0,2-27,10 µg/kg seviyelerinde OTA içerdiği saptanmıştır (Juan ve ark., 2008). Çin’de yapılan bir başka çalışmada 65 adet hububat örneğinde OTA varlığı araştırılmıştır. Buğday örneklerinin %36,36’sında (4,248 ng/g), mısır örneklerinin %26,08’inde (7,366 ng/g), pirinç örneklerinin %15’inde (3,382 ng/g) OTA bulunmuştur (Zhang ve ark., 2011). 2007-2008 hasat yılları arasında İspanya’nın kuzey bölgesi Navarra’da 123 arpa örneği ile yapılan bir çalışmada; örneklerin %58’inde maksimum 3,53 µg/kg’a ulaşan düzeyde OTA tespit edildiği bildirilmiştir (Ibáñez-Vea ve ark., 2012).

İspanya’da yapılan bir araştırmada mısır, buğday, pirinç ve arpa örneklerinde sırasıyla %4,7 (ortalama 0,1 µg/kg), %64,2 (ortalama 0,43 µg/kg), %87,5 (ortalama 0,16 µg/kg) ve %57,7 (ortalama 0,1 µg/kg) OTA saptanmıştır (Vidal ve ark., 2013). Kumar ve arkadaşları Hindistan’da 50 buğday örneğini OTA açasından araştırmıştır. Örneklein 29 tanesinin 1,36-21,17 µg/kg seviyeleri arasında OTA iğerdiği ve 13 örneğin Avrupa Birliği tarafından belirlenen sınırı (5 µg/kg) aştığı tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 3,3-10 ng/ml) (Kumar ve ark., 2012). Polonya’da yapılan ve 2019 yılında yayımlanan bir çalışmada, 113 buğday unundan 13 tanesinde (0,7-5,8 µg/kg), 45 mısır ununun 3 tanesinde (0,7-1,6 µg/kg) OTA tespit edilmiştir (Hajok ve ark., 2019). Hububatlarda yapılan farklı çalışmalar da bizim çalışmamızda olduğu gibi tam buğday unu ve mısır ununda OTA maruziyeti sıklığını göstermektedir. Bu nedenle, OTA maruziyeti riskini değerlendirmek için düzenli olarak hububat ve hububat kaynaklı gıdalarda çalışmaların daha sıklıkla yapılması gerekmektedir.

8. SONUÇ

Mısır, buğday ve arpa gibi hububatlar, dünyadaki çoğu insan tarafından birincil enerji ve besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, zengin protein, yağ ve mineral içeriklerine sahip ürünler; uygun koşullarda küflerin gelişimine ortam oluştururlar. Hasat öncesi ve hasat sonrası aşamalarda mahsullerin, özellikle hububatların küflerle kirlenmesi, mikotoksinler olarak bilinen ikincil toksik metabolitlerin üretimine yol açabilmektedir. Gıdalarda mikotoksin maruziyetinden kaçınmak neredeyse imkansızdır. Ancak, bu gıda ürünlerinde mikotoksin yaygınlığının ve düzeylerinin tespiti, alınacak önlemlerle ülkelerin belirlediği mikotoksin düzeylerinin altına düşürülmesi ve tüketicilerin sağlık risklerinin önlenmesine imkân sağlamaktadır.

Ülkemizde nüfusun en yoğun olduğu şehir olan İstanbul'da, farklı şehirlerden temin edilip satışa sunulan aşurelik buğday, pirinç, mısır unu ve tam buğday unu örneklerinde deoksinivalenol ve okratoksin A varlığı ve miktarının HPLC ile tayinini ve risk analizini belirlemeye yönelik yapılan bu çalışmamızda elde edilen sonuçlar şu şekildedir;

- 96 adet hububat örneğinin HPLC ile analizi sonucu;
- 25 adet örnekte (0,13-1,16 µg/kg) DON tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 0,28-0,92 µg/kg).
- Analizi yapılan örneklerden; 7 adet aşurelik buğday, 8 adet pirinç, 8 adet mısır unu ve 2 adet tam buğday ununda DON saptanmıştır.
- En yüksek DON düzeyi açıkta satılan mısır unu örneğinde (1,16 µg/kg) tespit edilmiştir.
- 11 adet örnekte (0,87-6,97 µg/kg) OTA tespit edilmiştir (LOD-LOQ, 0,029-0,097 µg/kg).
- Örneklerden; 3 adet mısır ununda (1,51-2,23 µg/kg) ve 8 adet tam buğday ununda (0,87-6,97 µg/kg), OTA saptanmıştır.
- En yüksek OTA düzeyi marketten alınan paketli tam buğday unu örneğinde (6,97 µg/kg) saptanmıştır.

- Çalışmamızda aşurelik buğday, pirinç, mısır unu ve tam buğday unu örneklerinin her birinde yetişkin bireyler için değerlendirilen DON ve OTA'nın tahmini diyetsel maruziyet risk karakterizasyonu (MoE)>10,000 olarak bulunduğu İstanbul'da satışı yapılan bu hububat ürünlerinin tüketicilerinin DON ve OTA'ya maruz kalma açısından bir sağlık riski taşımadığı görülmüştür.

Analizler sonucunda örneklerde önemli oranlarda hem deoksinivalenol hem de okratoksin A kontaminasyonuna rastlanmıştır. Paketli ve açıkta satılan dökme ürün farketmeksizin hububatlarında toksin kontaminasyon riskinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu kontaminasyonların hasat öncesi mi yoksa hasat sonrası mı gerçekleştiğine yönelik bilgiler çalışmamızda belirlenmemiştir. Hububat ürünlerinin her aşaması için sıcaklık ve neme dikkat edilmekle birlikte kontaminasyon kaynaklarının tespit edilmesi ve gerekli önlemlerin alınarak tedbirlere uyulması önem arz etmektedir. Ürünlerin, saklanma koşulları ve paketleme malzemeleri hem dökme hem de ambalajlı ürünlerde, gıdaların cinsine ve raf ömrüne dikkat edilerek toksin oluşma riski düşürülmelidir. Tüm bu konularda çiftçilere, işletmecilere, satıcılara ve ayrıca tüketicilere bilinç düzeyini arttırmaya yönelik eğitimler gerçekleştirilmesi, mikotoksinlerle mücadelede ve sağlığın korunmasında olumlu katkılar sağlayacaktır.

İstanbul piyasasında satışa sunulan hububat örnekleri için DON ve OTA kontaminasyonunun yanı sıra risk analizinde bilgi sağlamakla birlikte; örnek toplanacak semt sayısının ve örnek sayısının artırılması, aynı örneklerin hasat öncesi ve hasat sonrası dönemlerinin takip edilerek her aşamada analizlerinin yapılması ve hangi aşamada daha fazla bulaş riskinin olduğu tespit edilmesi, ürünlerin besin içerikleri ve görünümünde kayıplar olmayacak şekilde uygulanacak farklı koruma yöntemleri ile potansiyel bulaş riskinin minimuma indirilmesi ile ilgili daha çok çalışma ile gözden geçirilmesi gerek görülmektedir.

9. KAYNAKLAR

Abdulkadar AHW, Al-Ali AA, Al-Kildi AM, AlJedah JH. Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control* 15: 543-548, 2004.

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

Anfossi L, Giovannoli C, Baggiani C. Mycotoxin detection. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 120-126, 2016.

Anonim. Mycotoxins, Ochratoxin A. Chapter 5: 39-71, 2015.

Artık N. Gıda Mikotoksinleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı, Gıda Serisi, (6), 2007.

Atumo S. A Review of Ochratoxin A. Occurrence, Condition for the Formation and Analytical Methods. *Int J Agric Sci Food Technol*. 6(2):180-5, 2020.

Bakirci G. Determination of Aflatoxin, Ochratoxin A, Zearalenone, Fumonisin and Deoxynivalenol. *Mycotoxins in Cereals and Cereal Based Products*. *Academic Food Journal*. 12 (2): 46-56, 2014.

Bbosa GS, Kitya D, Lubega A, Ogwal-Okeng J, Anokbonggo WW, Kyegombe DB. Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. *Aflatoxins-recent advances and future prospects*. 12:239-65, 2013.

Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger SD, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J. Masked mycotoxins: a review. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57 (1): 165–186, 2013.

Berthiller F, Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 33-37, 2007.

Blesa J, Moltó JC, El Akhdari S, Mañes J, Zinedine A. Simultaneous determination of Fusarium mycotoxins in wheat grain from Morocco by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Control*, 46, 1-5, 2014.

Bui-Klimke TR, Wu F. Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 55(13):1860-9, 2015.

Bullerman LB, & Bianchini A. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 140-146, 2007.

Cano-Sancho G, Valle-Algarra F, Jiménez M, Burdaspal P, Legarda T, Ramos A, Sanchis V, & Marín S. Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). *Food Control*, 22, 490-495, 2011.

Capraro J, Rossi F. The effects of ochratoxin A on liver metabolism. *Med J Nutrition Metab*. 5(3):177-85, 2012.

Cengiz M, Oruç HH, Uzunoglu İ, Sonal S. Ochratoxin A levels in different types of bread and flour. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 26(1-2), 7-10, 2007.

Coppa CFSC, Khaneghah AM, Alvito P, Assunção R, Martins C, Eş I, Gonçalves BL, de Neeff DV, Sant'Ana AS, & Corassin CH. The occurrence of mycotoxins in breast milk, fruit products and cereal-based infant formula: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2019.

Coppock RW, Swanson SP, Gelberg HB, Koritz GD, Hoffman WE, Buck WB and Vesonder RF. 1985. Preliminary study of the pharmacokinetics and toxicopathy of deoxynivalenol (vomitoxin) in swine. *Amer. J. Vet. Res.* 46, 169-174, 1985.

Covarelli L, Beccari G, Salvi S. Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2365-2369, 2011.

Çelik C. Adana’da bazı marketlerde satışı sunulan çekirdeksiz kuru üzümelerde okratoksin A varlığının HPLC yöntemi ile araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye, 2008.

Daou R, Joubrane K, Maroun RG, Khabbaz LR, Ismail A, El Khoury A. Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. *AIMS Agric Food*. 6(1):416-47, 2021.

Davies RW. Nutrients separating the wheat from the chaff: nutritional value of plant proteins and their potential contribution to human health. *Nutrients*. 12:10–14, 2020.

Doohan FM, Brennan J, Cooke BM. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur J Plant Pathol*. 109:755–68, 2003.

EEC, Council Regulation (EEC), No 315/93 of 8 February 1993 laying down community procedures for contaminants in food. *Off. J. Eur. Union*, 37, 1–3, 1993.

EC, Commission Regulation (EC), No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, 49, 5–24, 2006.

EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. Question No EFSA-Q-2003-037, *The EFSA Journal*, 89, 1–35, 2004.

EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on the contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *EFSA J*. 365:1–56, 2006.

EFSA. European Food Safety Authority. Guidance on selected default values to be used by the EFSA scientific committee, scientific panels and units in the absence of actual measured data. EFSA J. 10:2579, 2012.

EFSA. European Food Safety Authority. Statement on the risks for public health related to a possible increase of the maximum level of deoxynivalenol for certain semi-processed cereal products. Question No EFSA-Q-2013-00703. EFSA J. 11, 1–56, 2013.

EFSA. European Food Safety Authority. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. Question No EFSA-Q-2013-00721. EFSA J. 15, 1–345, 2017.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. EFSA J. 12:1–107, 2014.

EFSA. European Food Safety Authority. Experimental study of deoxynivalenol biomarkers in urine. External scientific report, Question No EFSA-Q-2013-00717, The EFSA Supporting Publication EN-818, 136 p, 2015.

EFSA. European Food Safety Authority. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. Question No EFSA-Q 2013-00721, The EFSA Journal, 15(8), 1–345, 2017b.

Elgün A, Ertuğay Z. Tahıl İşleme Teknolojisi, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 2002.

Fandohan P, Zoumenou D, Hounhouigan DJ, Marasas WFO, Wingfield MJ & Hell K. Fate of aflatoxins and fumonisins during the processing of maize into food products in Benin. International Journal of Food Microbiology, 98(3), 249-259, 2005.

FDA. Guidance for Industry and FDA: Advisory Levels for Deoxynivalenol (DON) in Finished Wheat Products for Human Consumption and Grains and Grain By-Products used for Animal Feed, 2010.

Froquet R, Sibiril Y, Parent-Massin D. Trichotecene toxicity on human megakaryocyte progenitors (CFU-MK). *Human and Experimental Toxicology*, 20, 84–89, 2001.

Galbenu-Morvay PL, Alexandra T, Damiescu L & Simion G. T-2 Toxin Occurrence in Cereals and Cereal-Based Foods. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 68, 2011.

Gilbert J, Anklam E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuff. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21, 468–486, 2002.

Gilbert J, Brule-Babel A, Guerrieri AT, Clear RM, Patrick S, Slusarenko K, Wolfe C. Ratio of 3-ADON and 15-ADON isolates of *Fusarium graminearum* recovered from wheat kernels in Manitoba from 2008 to 2012. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36, 54–63, 2014.

Girelli AM, Mattei E. Application of immobilized enzyme reactor in online high performance liquid chromatography: a review. *Journal of Chromatography B*, 819(1), 3-16, 2005.

Golge O, Kabak B. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals and cereal products from Turkey. *Food Control*, 110, 106982, 2020.

González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. Dietary intake of ochratoxin A from conventional and organic bread. *International journal of food microbiology*, 118(1), 87-91, 2007.

Gupta RC, Srivastava A, Lall R. Ochratoxins and citrinin. pp. In *Veterinary Toxicology*. Academic Press. 1019-27, 2018.

Hajihashemi P, Haghghatdoost F. Effects of whole-grain consumption on selected biomarkers of systematic inflammation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Nutr.* 38:275–285, 2019.

Hajok I, Kowalska A, Piekut A, Drabek MĆ. A risk assessment of dietary exposure to ochratoxin A for the Polish population. *Food Chemistry*, 284, 264–269, 2019.

Herrera CC, Chacon A, Artavia G, Chincilla G. F. Simultaneous LC/MS Analysis of Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Costa Rican Avocados. *Molecules* 24, 4517, 2019.

Heshmati A, Zohrevand T, Khaneghah AM, Nejad ASM & Sant'Ana A. S. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 202-208, 2017.

Hollænder PL, Ross AB, Kristensen M. Whole-grain and blood lipid changes in apparently healthy adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled studies. *Am J Clin Nutr.* 102:556–572, 2015.

Hui S, Liu K, Lang H, et al. Comparative effects of different whole grains and brans on blood lipid: a network meta-analysis. *Eur J Nutr.* 58:2779–2787, 2019.

IARC, WHO. New IARC report urges action against widespread mycotoxin contamination in developing countries. In Press release, edited by World Health Organisation The International Agency for Research on Cancer, 2016.

Ibáñez-Vea M, González-Peñas E, Lizarraga E, De Cerain AL. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. *Food chemistry*, 132(1), 35-42, 2012.

Iqbal SZ, Mehmood Z, Asi MR, Shahid M, Sehar M, Malik N. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in nuts, dry fruits, and nuty products. *J Food Saf.* 38(4): e12462, 2018.

Ismail A, Riaz M, Akhtar S, Ismail T, Ahmad Z, Hashmi MS. Estimated daily intake and health risk of heavy metals by consumption of milk. *Food Addit Contam Part B*. 8(4):260-5, 2015.

Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, Stela M, Saluk-Bijak J, Siadkowski A, et al. Molecular aspects of mycotoxins—A serious problem for human health. *Int J Mol Sci*. 21(21):8187, 2020.

Jiao Y, Blaas W, Rühl C, Weber R. Ochratoxin A in foodstuffs (vegetables, cereals, cereal products and beer). *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 1994.

Juan C, Moltó JC, Lino CM, Mañes J. Determination of ochratoxin A in organic and non organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. *Food chemistry*, 107(1), 525-530, 2008.

Kara GN, Ozbey F, Kabak B. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey. *Food Control*. 54, 275–281, 2015.

Karagozlu N, Karapinar M. Fungal Contamination and the Incidence of Ochratoxin-A In Some Cereals and Products. *Turk J Biol*. 24 561–572, 2000.

Karlovsky P, Suman M, Berthiller F, De Meester J, Eisenbrand G, Perrin I, Oswald IP, Speijers G, Chiodini A, Recker T and Dussort P. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin research*, 32(4), 179-205, 2016.

Kockova M, Valik L. Potential of Cereals and Pseudocereals for Lactic Acid Fermentations. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 5(2), 27-40, 2011.

Köszegi T, Poór M. Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*. 8(4):111, 2016.

Köppen R, Koch M, Siegel D, Merkel S, Maul R, Nehl I. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1595–1612, 2010.

Krogh P, Hald B, Plestina R, Ceovic S. Balkan (endemic) nephropathy and food-borne ochratoxin A: Preliminary results of a survey of foodstuff. *Acta Path Microbiol Scand*. 85: 238-240, 1977.

Kumar R, Ansari KM, Saxena N, Dwivedi PD, Jain SK, Das M. Detection of ochratoxin A in wheat samples in different regions of India. *Food control*, 26(1), 63-67, 2012.

Kyei NN, Boakye D & Gabrysch S. Maternal mycotoxin exposure and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. *Mycotoxin Res*, 1-13, 2020.

Lancova K, Hajslova J, Kostelanska M, Kohoutkova J, Nedelnik J, Moravcova H & Vanova M. Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: milling and baking. *Food Additives and Contaminants*, 25(5), 650-659, 2008.

Lee HJ & Ryu D. Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: public health perspectives of their co-occurrence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 7034-7051, 2017.

Lu H, Leal MR, Míguez M, Fernández-Franzón M. Detection of seven trichothecene mycotoxins in infant cereal foods by QuEChERS extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Revista de Toxicología*, 30, 203-208, 2013.

Luo Y, Liu X, Li J. Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food Control* 2018, 89, 123-132.

Malir F, Ostry V, Novotna E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Rev*. 32(2):19-33, 2013.

Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*. 8(7):191, 2016.

Mankevičienė A, Butkutė B, Gaurilčikienė I, Dabkevičius Z, Supronienė S. Risk assessment of Fusarium mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. *Food Control*, 22(6), 970-976, 2011.

Maresca M. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins*, 5(4),784–820, 2013.

Martos P, Thompson W, Diaz G. Multiresidue mycotoxin analysis in wheat, barley, oats, rye and maize grain by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *World Mycotoxin Journal*, 3(3), 205-223, 2010.

Marventano S, Vetrani C, Vitale M, et al. Whole grain intake and glycaemic control in healthy subjects: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*. 9:769, 2017.

McKevith B. Nutritional aspects of cereals. *Nutr Bulletin*. 29:111–142, 2004.

Milani JM. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. *Veterinari Medicina*, 58 (8): 405–411, 2013.

Mishra S, Ansari KM, Dwivedi PD, Pandey HP, Das M. Occurrence of deoxynivalenol in cereals and exposure risk assessment in Indian population. *Food Control*, 30, 549-555, 2013.

Munkvold GP. Fusarium species and their associated mycotoxins. *Mycotoxigenic Fungi*. 51-106, 2017.

Naresh M, David A. Conditions of formation of Ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Addit Contam*. 22(1):10-16, 2005.

Nematollahi A, Kamankesh M, Hosseini H, Ghasemi J, Hosseini-Esfahani F, Mohammadi A. Investigation and determination of acrylamide in the main group of cereal products using advanced microextraction method coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Cereal Science*, 87, 157-164, 2019.

Neme K, Mohammed A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*, 78: 412-425, 2017.

Nguyen KTN, Ryu D. Concentration of ochratoxin A in breakfast cereals and snacks consumed in the United States. *Food Control*, 40, 140-144, 2014.

Omurtag GZ, Beyoglu D. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in processed cereals and pulses in Turkey. *Food Additives and Contaminants*, 20 (4), 405-409, 2003.

Ozden S, Akdeniz AS, Alpertunga B. Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey. *Food Control*, 25(1), 69-74, 2012.

Özcelik N, Kosar A, Soysal D. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicol Lett.* 121:9-13, 2001.

Özturan K, Ünsal C, Karakaya Y, Atasever M, Ceylan ZG, Atasever MA, Demirkaya AK. Erzurum'da Tüketime Sunulan Buğday Unlarının Toplam Aflatoksin, Aflatoksin. B1 ve Okratoksin A Yönünden İncelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2(4), 172-176, 2007.

Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9), 754-766, 1999.

Puntarić D, Bošnjir J, Šmit Z, Škes I, Baklaić Z. Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropathy. *Croat. Med. J.*, 42, 175-180, 2001.

Qi XX, Shen P. Associations of dietary protein intake with all-cause, cardiovascular disease, and cancer mortality: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 30:1094–1105, 2020.

Ran R, Wang C, Han Z, Wu A, Zhang D, Shi J. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. *Food Control*, 34, 138-148, 2013.

Rastegar H, Shoeibi S, Yazdanpanah H, Amirahmadi M, Khaneghah AM, Campagnollo FB, Sant'Ana AS. Removal of aflatoxin B1 by roasting with lemon juice and/or citric acid in contaminated pistachio nuts. *Food Control*, 71, 279-284, 2017.

Reynolds A, Mann J, Cummings J, et al. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet.* 393:434–445, 2019.

Ricciardi C, Castagna R, Ferrante I, Frascella F, Marasso SL, Ricci A, Canavese G, Lorè A, Prella A, Gullino ML, Spadaro D. Development of a microcantilever-based immunosensing method for mycotoxin detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 40 (1): 233–239, 2013.

Richard JL, Glenn A, Bennett PF, Ross and Nelsons PE. Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. *J. Anim. Sci.* 71:2563-2574, 1993.

Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem Biol Interact.* 19:18–46, 2006.

Rodríguez-Carrasco Y, Moltó JC, Berrada H, Mañes JA. survey of trichothecenes, zearalenone and patulin in milled grain-based products using GC–MS/MS. *Food chemistry*, 146, 212-219, 2014.

Rychlik M, Humpf HU, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H, Lorenz N. Proposal of a comprehensive definition of modified and

other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Research*, 30 (4): 197–205, 2014.

Sadhasivam S, Britzi M, Zakin V, Kostyukovsky M, Trostanetsky A, Quinn E, Sionov E. Rapid detection and identification of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in stored wheat grain. *Toxins*, 9(10), 302, 2017.

Sevikturk M, Gonulalan Z. The quantities of ochratoxin A of some cereal products consumed in Kayseri. *J Health Sci*, 16, 86-90, 2007.

Schrenk D, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, et al. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA J*. 18(5):06113, 2020.

Scudamore KA, Guy RC, Kelleher B, MacDonald SJ. Fate of Fusarium mycotoxins in maize flour and grits during extrusion cooking. *Food Additives and Contaminants*, 25(11), 1374-1384, 2008.

Scudamore K, Hazel CM, Patel S, Scriven F. Deoxynivalenol and other Fusarium mycotoxins in baking process in the bread, cake, and biscuits produced from UK-grown wheat under commercial and pilot scale conditions. *Food Additives and Contaminants*, 26, 1191-1198, 2009.

Sifuentes dos Santos J, Souza EY, Ono EH, Hashimoto MC, Bassoi MZ, de Miranda EN, Itano O, Kawamura EY. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Parana state, Brazil and estimated daily intake by wheat products. *Food Chemistry* 138 (1):90–5, 2013.

Shanahan JF, Brown WM, Blunt TD. Aflatoxins. Colorado State University Cooperative Extension, Crop Series Production, No. 0.306, 3 p, 2003.

Shephard GS, L. van der Westhuizen DR, Katerere M, Herbst and M. Pineiro. Preliminary exposure assessment of deoxynivalenol and patulin in South Africa. *Mycotoxin Research* 26 (3):181–5, 2010.

Sherif SO, Salama EE, Abdel-Wahhab MA. Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. *International Journal Hygiene and Environmental Health*, 212, 347–368, 2009.

Shotwell OL, Hesseltine CW, Goulden ML. Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Applied microbiology*, 17(5), 765, 1969.

Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, Beklova M, Zeman L, Kizek R. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, 3 (3): 94–99, 2010.

Song M, Fung TT, Hu FB, et al. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality. *JAMA Intern Med*. 176:1453–1463, 2016.

Stanciu O, Juan C, Miere D, Loghin F, Mañes J. Occurrence and co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat grains and wheat flour from Romania. *Food Control*, 73, 147-155, 2017.

Taydaş E, Aflatoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri. 2006.

Thanushree MP, Sailendri D, Yoha KS, Moses JA, Anandharamakrishnan C. Mycotoxin contamination in food: An exposition on spices. *Trends Food Sci Technol*. 93:69–80, 2019.

Thrane U. Development in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. *Fusarium*, Editors: B.A. Summerell and P.E. Nelson, Memorial Symposium, APS Press, USA, 29–49, 2001.

Tunail N. Mikrobiyal enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, 2000.

TGK. Türk Gıda Kodeksi. Bulaşanlar Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete, 28157, Ankara, Başbakanlık Basımevi. 29/12/2011.

TGK. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği. Tebliğ No:2018/10. Erişim linki: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2018/03/20180315-19-1.pdf> (Erişim 10.07.2022).

TÜİK. Türkiye İstatistik Kurumu. Bitkisel Ürün Denge Tabloları, 2019. Erişim linki: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=104&locale=tr> (Erişim 26.03.2022).

Tolosa J, Graziani G, Gaspari A, Chianese D, Ferrer E, Mañes J, Ritieni A. Multi-mycotoxin analysis in durum wheat pasta by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Toxins*, 9(2), 59, 2017.

TMO. Toprak Mahsulleri Ofisi. 2020 Yılı Hububat Sektör Raporu, 2020. Erişim linki: <https://www.tmo.gov.tr/> (Erişim 9.10.2022).

TMO. Toprak Mahsulleri Ofisi. Dünya Hububat ve Bakliyat Raporu, 2021. Erişim linki: <https://www.tmo.gov.tr/> (Erişim 9.10.2022).

Turkessiz K, Bostan K. Aflatoxin, Deoxynivalenol and Zearalenone Levels in Grain Flour Samples in İstanbul. *Turkish Journal of Nature and Science*, 9 (1):131-136, 2020.

Udovicki B, Audenaert K, De Saeger S, Rajkovic A. Overview on the mycotoxins incidence in Serbia in the period 2004–2016. *Toxins*, 10 (7): 279: 1–22, 2018.

Van Egmond HP. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Additives & Contaminants*, 6(2), 139-188, 1989.

Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205:1112-1113, 1965.

Vidal A, Marín S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 133-138, 2013.

Wang YJ, Nie JY, Zhen YAN, Li ZX, Cheng Y, Farooq S. Multi-mycotoxin exposure and risk assessments for Chinese consumption of nuts and dried fruits. *J Integr Agric*. 17(7):1676-90, 2018.

WHO. World Health Organization. FAO. Food and Organization. Codex Alimentarius, International Food Standards. General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed. 193-1995, 2019.

WHO. World Health Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2009. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Updated Chapter 6. Dietary Exposure Assessment of Chemicals in Food. Geneva, 2020.

WHO. World Health Organization. Mycotoxins. Newsroom, 2018. Erişim linki: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/mycotoxins> (Erişim 12.09.2022)

Wu Q, Dohnal V, Huang L, Kuca K, Wang X, Chen G, Yuan Z. Metabolic pathways of ochratoxin A. *Curr Drug Metab*. 12(1):1-10, 2011.

Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144, 2011.

Zhang A, Ma Y, Feng L, Wang Y, He C, Wang X, Zhang H. Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. *Food Control*, 22(11), 1723-1728, 2011.

Zinedine A, Brera C, Elakhdari S, Catano C, Debegnach F, Angelini S, et al. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control* 17: 868-874, 2006.