

HPLC ile

Gıdalarda ve Yemlerde Aflatoksin Analizi



Kim. Emrah KALYONCU
Ant Teknik Cihazlar Ltd. Şti.

Pribolabin “PriboFast® KRC Photochemical Reactor” kullanılmıştır. Analizden 5 dk. önce UV türevlendiricinin açılması gerekmektedir. İmmünoafinite kolonu (IAC) olarak “PriboFast® Aflatoksin kullanılmıştır.

EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ

1. 50 g fındığı veya fındık ezmesini ve 4 g sodyum klorürü (NaCl) bir blender haznesine koyun.
2. 100 mL su ekleyin ve waring blender kullanarak 1 dakika yüksek hızda karıştırın.
3. 150 mL metanol ekleyin ve 2 dakika daha yüksek hızda karıştırın.
4. Örneği Whatman No. 4 filtre kağıdı ile süzün ve filtratı 100 mL’lik erlende toplayın.
5. IAC’yi 5 mL/dk hızla 10 mL PBS çözeltisi geçirerek şartlandırın.
6. Filtratın 5 mL’sini (1 g numuneye eşdeğer) bir behere alın ve üzerine 15 mL PBS çözeltisi ekleyin.
7. 20 mL seyreltilmiş filtratı 3 mL/dk hızla IAC’den geçirin.
8. Kolonu yaklaşık 5 mL/dk hızla 20 mL distile su geçirerek yıkayın.
9. Kolonu yaklaşık 10 saniye şırınga ile hava geçirerek kurutun.
10. Aflatoksinleri kolondan saniyede 1 damla geçecek şekilde 1 mL metanol ile elue edin.
11. IAC’den 1 mL distile su geçirin ve toplam çözelti miktarı 2 mL olacak şekilde aynı balon jöjeye toplayın.
12. 100 µL’yi HPLC’ye enjekte edin.

KULLANILAN EKİPMAN VE KİMYASALLAR

1. HPLC
2. Floresans dedektör
3. Fotokimyasal reaktör
4. HPLC kolonu
5. IAC kolonu
6. Analitik terazi (0.0001 g hassasiyette)
7. Ultra saf su sistemi
8. Waring blender
9. Metanol
10. Otomatik pipet
11. Whatman filtre kağıdı
12. PBS çözeltisi
13. Potasyumbromür (KBr)
14. Nitrik asit
15. Vakum manifold ve vakum pompası
16. Sodyum Klorür (NaCl)
17. Asetonitril (ACN)



SHIMADZU
Excellence in Science

Prominence LC-20A
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi



ÇALIŞMANIN AMACI

Mikotoksin, pek çok işlenmiş veya işlenmemiş gıdada bulunan, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden bazı küf türlerinin metabolitleri için kullanılan bir terimdir. Hasat öncesi ve sonrası koşullarda tarımsal ürünleri kontamine edebilen bu toksik metabolitler insan ve hayvanlarda kanserojen, mutajenik, teratojenik, aterojenik ve östrojenik etkiler gibi akut ve kronik etkilere neden olabilmektedirler. Bilinen mikotoksinler arasında aflatoksinler insan sağlığı açısından en tehlikeli olanlardır. Meyve ve işlenmiş meyve ürünlerinde görülen başlıca mikotoksinler ise aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin G1 (AFG1), aflatoksin G2 (AFG2) ve okratoksin A (OTA), patulin ve alternaria toksinleridir.

METOD VE MATERYALLER

Çalışmamız, Shimadzu marka Prominence LC-20A model HPLC ile yapılmıştır. Kolon sonrası UV türevlendirmede

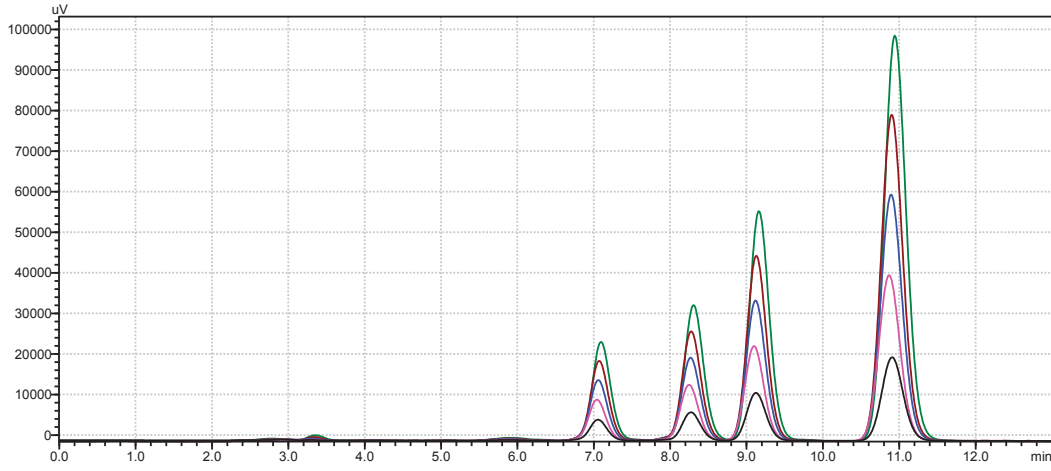
Analitik Koşullar

Cihaz : Shimadzu HPLC
 Model : Prominence LC-20A
 Kolon : GLScience Inertsil ODS-3
 (150mm x 4.6mm x 5µm)
 Kolon Fırın Sıcaklığı : 22°C
 Enjeksiyon Hacmi : 100 µL
 Dedektör : RF-20A (Ex:360 Em:430)

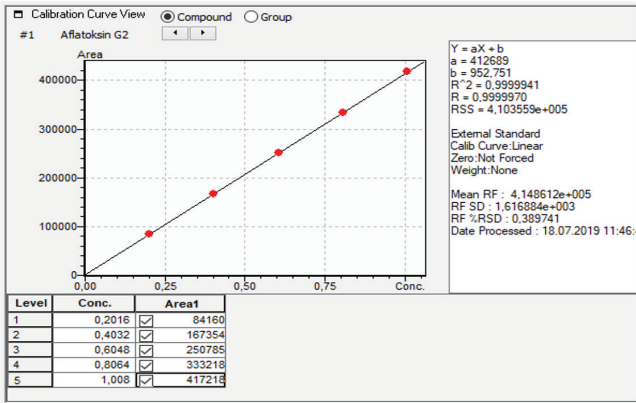
Akış Hızı : 1 mL/dk
 Süre : 13 dk
 Mobil Faz A : % 27.3 Metanol
 Mobil Faz B : % 54.5 Tampon
 (0.23 g KBr + 190 µL 4 N HNO₃ + 1 L ultra saf su)
 Mobil Faz C : % 18.2 Asetonitril

Sonuçlar ve Değerlendirme

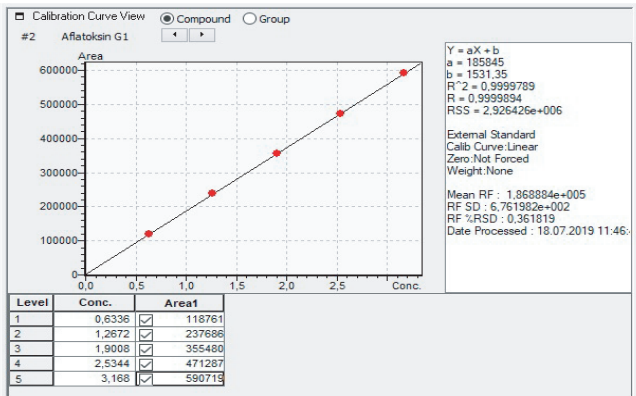
1. Kromatogramlar



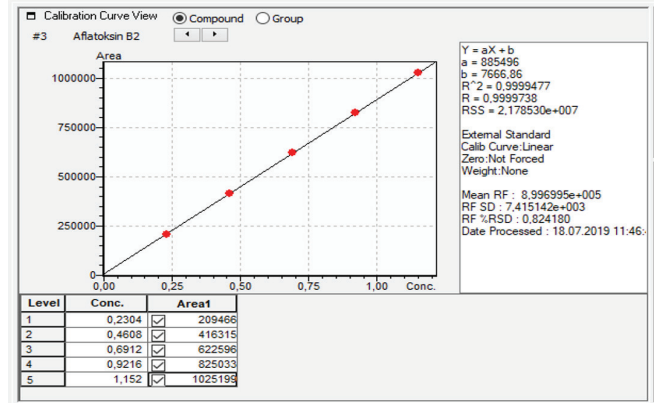
Şekil 1. Kalibrasyon Standart Pikleri (Aflatoxin G2, G1, B2, B1)



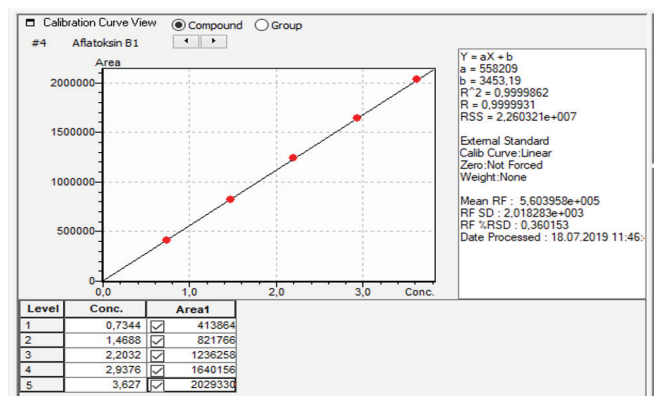
Şekil 2. Aflatoxin G2



Şekil 3. Aflatoxin G1

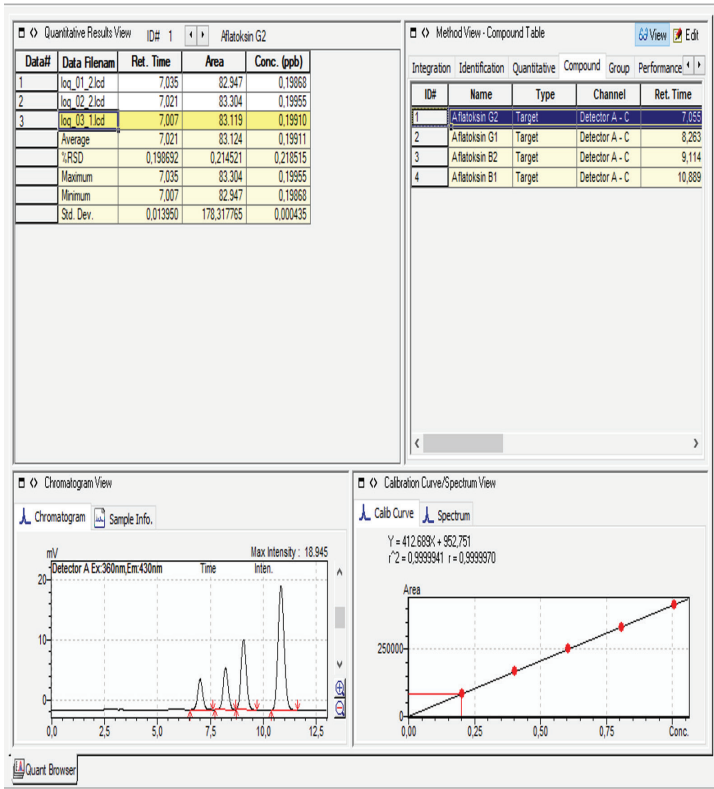
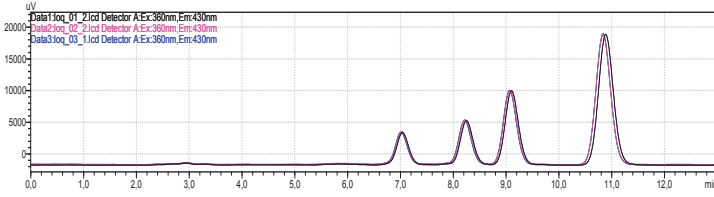


Şekil 4. Aflatoxin B2

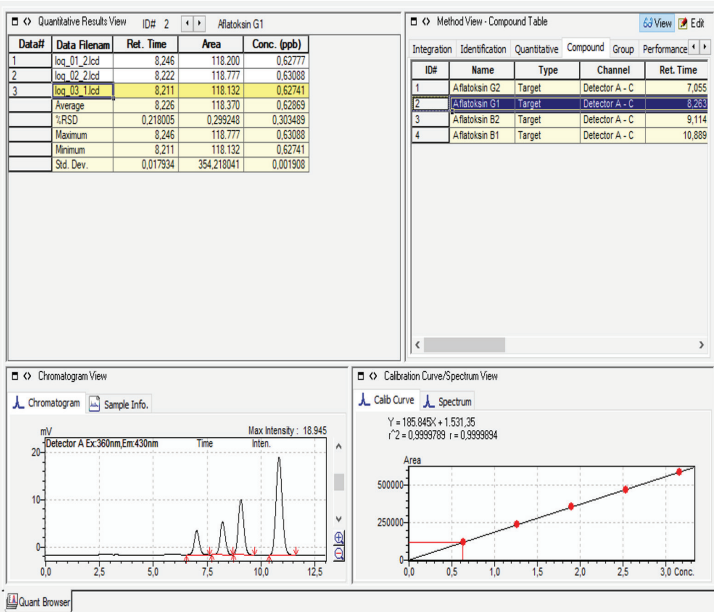


Şekil 5. Aflatoxin B1

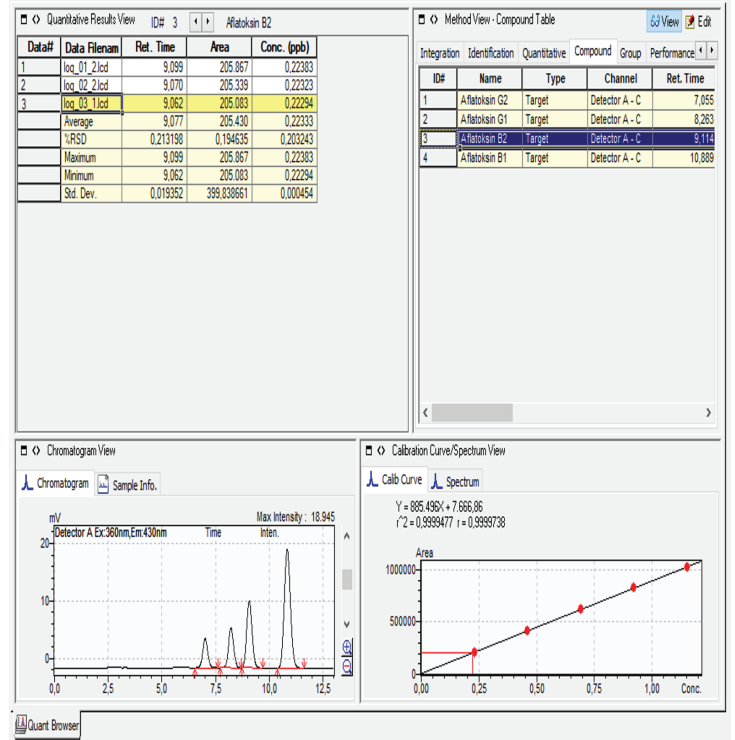
Tekrarlanabilirlik kontrolü



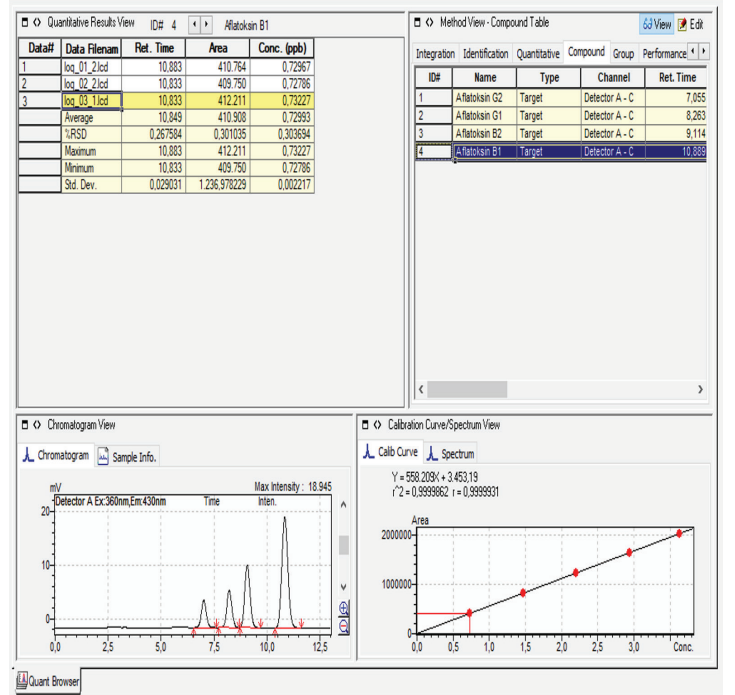
Şekil 6. Aflatoxin G2



Şekil 7. Aflatoxin G1



Şekil 8. Aflatoxin B2



Şekil 9. Aflatoxin B1

REFERANSLAR

1. AOCS Recommended Practice Aa 11-05 Reapproved 2017 Aflatoxins by HPLC Using Postcolumn Photochemical Derivatization
2. European Pharmacopoeia 2.8.18 standard analytical methods.
3. Journal of AOAC International Vol.88, No.2, 2005