

Gıda ve Yemlerde Mikotoksin Riski ve LCMSMS ile Mikotoksin Analizi



Dr. Engin Bayram

Ant Teknik Cihazlar
Kimyager / MS Grubu Aplikasyon Şefi

İnsanlar ve hayvanlar için yüksek toksisiteye sahip olabilen mikotoksinler, gıda üretiminin bütün basamaklarında, üretim sonrası depolama aşamasında ortaya çıkabilir ve bunun da ekonomi, gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından oldukça kritik sonuçları olabilir. Aspergillus, Fusarium, Alternaria ve Penicillium Cladosporium gibi farklı mantar türleri tarafından üretilen mikotoksinler arasında en fazla dikkat çekenler; aflatoksinler(AFT), trikotesenler (T-2 toksin), okratoksin A (OTA), zearalenon (ZON), fumonisinler (fumonisin B1),

Tablo 1: Çeşitli Besinlerde Oluşabilen Mikotoksinler

BESİN	MIKOTOKSİN
Çilek, Şeftali, Kiraz, Soğan, Sarımsak, Kakao, Kahve	OTA
Kayısı, Armut, Ayva, Muz	PAT
İncir, Fındık, Badem, Fasulye, Pamuk tohumu	AFT
Domates	OTA, TA, AOH, AFT
Elma	OTA, PAT, TA, AOH
Üzüm	PAT, AOH, AFT, OTA
Biber, Portakal	AFT, TA
Yabanmersini, Limon, Mandalina, Lahana	TA
Zeytin	TA, PAT
Arpa	DON, NİV, ZEA, HT-2, T2, AFT, STR
Mısır	DON, FUM, ZEA, AFT, SRV
Pirinç	AFT, Sterig, OTA, SRV
Buğday	OTA, AFT, STR, DON, NİV, ZEA, Ergot, TA

moniliformin, deoksinivalenol (DON) ve patulindir. Bilinen mikotoksinlerin birçoğunun termal ve kimyasal kararlılığı oldukça yüksektir. Bu ise, mikotoksinlerin, işlenmiş gıdalardan geleneksel yöntemlerle sadece kısmen uzaklaştırılmasını mümkün kılmaktadır. Bu nedenle gıda maddeleri mikotoksinlerle kirlendikten sonra onları temizlemeye çalışmak yerine, ürünün hasat, depolama ve üretim aşamalarında kontrol altında tutulup küferin gelişimini engellemek

ve bütün bu aşamalar sırasında üründe mikotoksin varlığını takip etmek çok önemlidir. Bu ise ancak hassas, güvenilir ve nispeten düşük maliyetli analiz yöntemleri ile mümkün olabilir.

Aflatoksinler

Aflatoksinler Aspergillus türü küf mantarları tarafından üretilen mikotoksinler olup çoğunlukla, bu türün gelişmesi ve aflatoksin üretmesi için şartların oldukça uygun olduğu tropik ve

alt-tropik iklimlerde üretimi gerçekleştirilen; fındık, yer fıstığı, incir, baharat gibi gıda maddelerinde ortaya çıkarlar. Tanımlanmış yirmiden fazla aflatoksinin dört tanesi dikkate değer bir öneme sahiptir. Bunlar; aflatoksin G2 (AF G2), aflatoksin G1 (AF G1), aflatoksin B2 (AF B2), aflatoksin B1 (AF B1)'dir. Aflatoksinler, metabolitleri ve bu toksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri uzun süredir araştırılmakta ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bir alt kuruluşu olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından Grup 1 kanserojen maddeler olarak tanımlanmaktadır (Aflatoksin B1 ve metaboliti Aflatoksin M1).

Tüketiciler, aflatoksinler ile kirlenmiş bitkisel gıdaları tüketerek veya bu gıdalar ile beslenmiş olan hayvanlardan elde edilen gıda maddelerinin (et, süt, yumurta, bebek maması, peynir vb.) tüketimi sonucu aflatoksinlere (dolayısı ile de metabolitlerine) maruz kalabilirler.

Aflatoksinler İçin Belirlenen Limitler

Bugün dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan bütün ülkeler, aflatoksinlerin sebep olabileceği sosyal ve ekonomik tehditlerden korunmak amacıyla, gıdalarda ve hayvan yemlerinde bulunabilecek aflatoksin düzeyleri için sınır değerler belirlemektedirler.

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından belirlenen ve Resmi Gazete'nin 29 Aralık 2011 tarihli (28157 3. mükerrer) sayısı ile yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, Türkiye için gıdalarda bulunabilecek aflatoksin üst sınır değerlerini belirlemektedir. Tablo 2'de, ilgili yönetmelikte belirlenmiş olan değerler verilmektedir.

Aflatoksin Analiz Yöntemleri

Aflatoksin analizi, aflatoksinlerin gıda maddelerinden ekstraksiyonu ve bu ekstraktların uygun bir teknik ile analizini içeren iki aşama olarak ele alınabilir.

Ekstraksiyon amacı ile sıvı faz ekstraksiyon işlemi veya katı faz ekstraksiyon işlemi (SPE) kullanılabilir. İmmünoafinite kromatografisi, yüksek seçicilik ve uygulamadaki kolaylık gibi avantajları sayesinde örnek hazırlama amacı ile yaygın kullanılan tekniktir.

Ekstraksiyon aşamasının ardından örneklerin analizine geçilir, bu amaçla; ELISA, TLC, kapiler elektroforez (CE), HPLC, LCMS ve LC-MS/MS gibi teknikler kullanılır. Kantitatif ELISA özellikle düşük derişimlerde beklenen analit-antikor özgün etkileşimleri yerine yan etkileşimlerin (cross reactions) artması nedeni ile doğruluğun

Tablo 2: Gıdalarda İzin Verilen Aflatoksin Üst Sınır Değerleri (TÜRKİYE) "kısmi liste"

GIDA MADDESİ	Üst Sınır (ug/kg)		
	Aflatoksin		
	B1	B1+B2+G1+G2	M1
Yer Fıstığı ve Diğer yağlı tohumlar	8	15	-
Badem, Antep Fıstığı ve Kayısı Çekirdeği	12	15	-
Fındık ve Brezilya Fındığı	8	15	-
Sert kabuklu meyveler	8	15	-
Yer Fıstığı ve Diğer yağlı tohumlar	5	10	-
Badem, Antep Fıstığı ve Kayısı Çekirdeği	8	10	-
Kurutulmuş meyveler	8	10	-
Tahıllar, bunlardan elde edilen ve işlenmiş ürünler	2	4	-
Mısır ve Pirinç	5	10	-
Kırmızıbiber, Karabiber, Zencefil, Zerdeçal vb. baharat ve karışımları	5	10	-
Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,05
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,1	-	-

ve tekrarlanabilirliğin azalması sonucu güvenilirliğini yitirmektedir. TLC ve CE uygulama açısından uzmanlık ve tecrübe gerektiren tekniklerdir. Bu nedenle özellikle rutin analiz amaçlı olarak çok fazla tercih edilmemektedir. LC-MS, yine düşük derişimlerde iyon şiddetlerinin düşmesi ve artan girişim nedeni ile güvenilir sonuçlar vermemektedir. LC-MS/MS, iyon fragmentasyonu yapabilmesi ve bunun sonucu olarak da çoklu-reaksiyon izleme tekniğini (Multiple Reaction Monitoring-MRM) kullanabilmesi sayesinde oldukça düşük derişimlerde dahi güvenilirliğini yitirmemektedir. Mikotoksinleri üreten küf mantarlarının, çoğunlukla ilgili gıdaya özel olması, immünoafinite kromatografisi (numune hazırlık)-HPLC tekniklerinin, mikotoksinlerin birçoğunun (özellikle de aflatoksinlerin) analizlerinde, halihazırda

en yaygın olarak kullanılan teknikler olması sonucunu doğurmuştur. Eğer analizde, tekil bir gıda grubu hedefleniyorsa (sadece fındık, buğday, bebek devam sütü vb.) bahsedilen teknikler rahatlıkla tercih edilebilirler ancak konu kompleks gıdalara geldiğinde (bebek maması, tıbbi amaçlı bebek diyet ürünleri, kakaolu fındık kreması vb.) durum karmaşık bir hal alacaktır. Bu tür gıdalar, birer karışım olduğundan ve içerdikleri bitkisel/hayvansal gıdaların kaynakları da farklı olduğundan birer mikotoksin kokteyli olabilirler ve her bir mikotoksin grubunun analizi de ayrı bir numune hazırlık aşaması demektir. İmmünoafinite kromatografisi temelde antikor-antijen ilişkisine dayanmakta ve her bir kolonda ilgili mikotoksine özel antikorlar kullanılmaktadır, örnek olarak, kompleks bir gıda maddesinde aflatoksinler (B1, B2, G1, G2 ve M1), OTA, DON, ZON ve PAT analizi

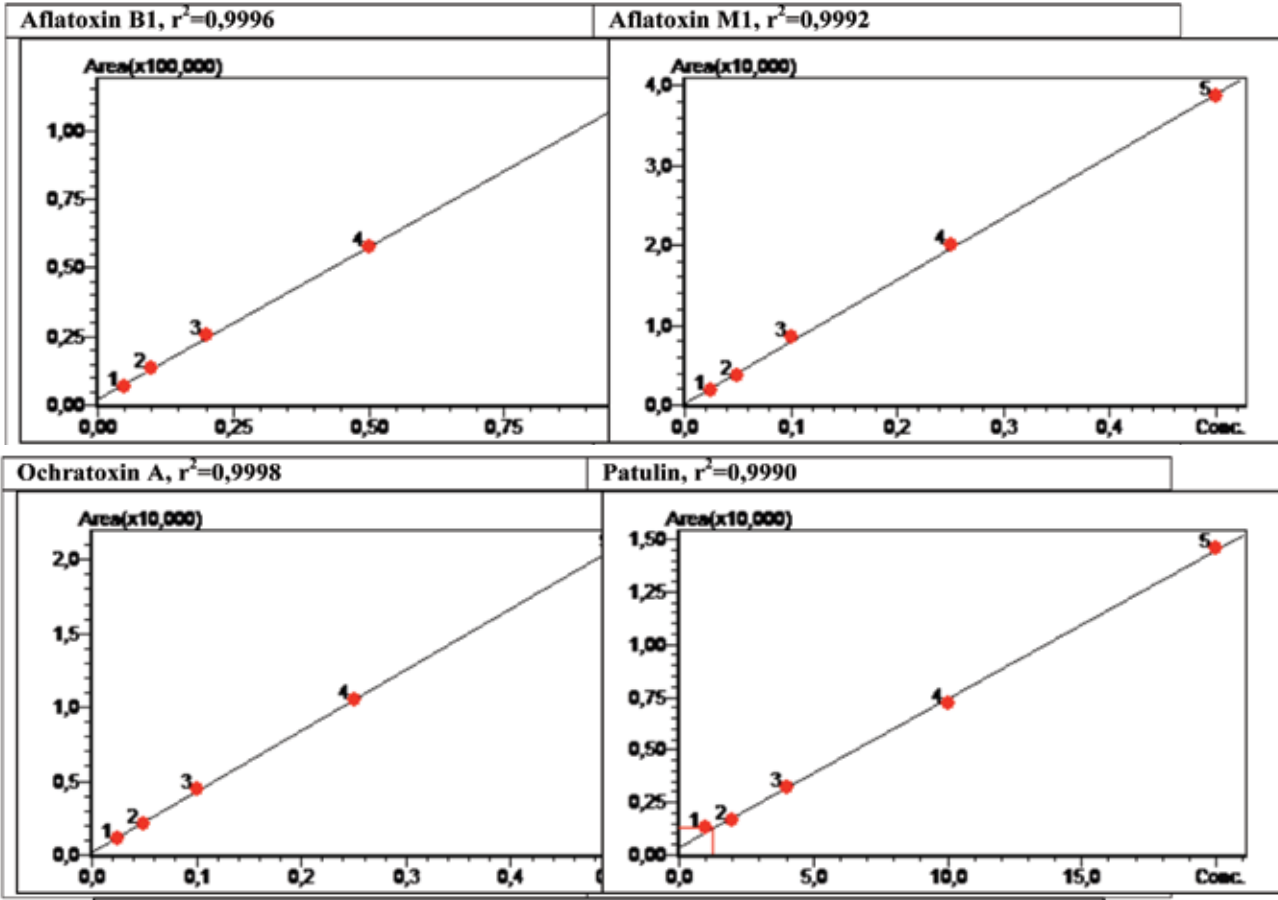
MS Koşulları:

Cihaz.....:	Shimadzu
Model.....:	LCMS-8040 TQ
Block Heater Temp.....:	500 °C
DL Temp.....:	250°C
Nebulizing Gas.....:	3.0 L/min
Drying Gas.....:	20L/min
Source/Polarity.....:	ESI(+), ESI(-)

LC Koşulları:

Cihaz.....:	UFLC
Model.....:	Shimadzu Nexera XR
Kolon.....:	Shimpack XR-ODS-II (2.2um, 75x3.0mm)
Mobil Phase A.....:	Water (20mM Ammonium acetate, 0.1% Acetic Acid)
Mobil Phase B.....:	Acetonitrile
Akış	0.5 ml/dk (Gradient Program)
Enjeksiyon Hacmi.....:	10 uL

Şekil 1: Seçilen Bazı Mikotoksinlerin Kalibrasyon Değerleri



yapılacaksa beş ayrı immunoafinite kolonu kullanmak gerekecektir. HPLC basamağında, aflatoksin B1, B2, G1, G2 kolon sonrası türevlendirme düzeneği kullanılırken diğer mikotoksinlerde böyle bir düzeneğe gerek duyulmaz.

Özetle kompleks gıda maddesi ile karşılaşıldığında analiz süresi uzayacak ve analiz maliyeti artacaktır. LC-MSMS yöntemi kullanılarak multi-bileşen içeren kompleks bir gıda maddesinin analizini, numune hazırlığı tek metoda indirgeyerek, tek enjeksiyon ile gerçekleştirmek mümkündür.

KAYNAKÇA

- Jalili M et al. Food Control 24:160-164, (2012)
 Jinap, S, et al. Mol Food Control 26(1):7 (2012),
 Cattaneo TM, et al. Journal of Chromatography A, 1218(29):4738-45, (2011).
 Devreese M, et al. Journal of Chromatography A, 1257:74-80, (2012).
 Kokkonen M, et al. Int J Food Microbiol. (2010)
 Pittet, A. et al. Rev. Med. Vet., 149 (6), 479-492. (1998)
 Zöllner P, J Chromatogr A. Dec 15;1136(2):123-69 (2006)
 Ghali, R; et al. Journal of Food Composition and Analysis, 22 7-8 751-755, (2009)
 IARC, A review of human carcinogens Volume 100 F, Lyon, France, (2012).
 Tang L, et al. Toxicol Appl Pharmacol. 15;219(1):10-7, 2006
 Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği Sayı: 28157, 2011

Tablo 2: Multitoksin Metodu LOQ Değerleri

Name	Conc. (ng/mL)	S/N	Name	Conc. (ng/mL)	S/N
Aflatoxin G2	0,0125	10,08	Deoxynivalenol (DON)	2	38,6
Aflatoxin G1	0,05	50,71	Zearalenone (ZON)	1	149,93
Aflatoxin B2	0,0125	16,37	Patulin	1	10,78
Aflatoxin B1	0,05	37,71	T2 Toxin	20	113.798
Aflatoxin M1	0,025	11,71	Fumonisin B1	25	63.054
Ochratoxin A	0,025	10,69	Fumonisin B2	25	296.768